

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Ambientali: tutela e gestione delle risorse naturali

Ciclo XXVII

Settore Concorsuale di afferenza: 05/D1

Settore Scientifico disciplinare: BIO/09-FISIOLOGIA

**RICERCA E APPLICAZIONE DI METODOLOGIE ECOTOSSICOLOGICHE
NEL MONITORAGGIO DI AMBIENTI MARINO-COSTIERI: SVILUPPO DI
NUOVI BIOASSAY E BIOMARKER**

Presentata da: Daniela Donadei

Coordinatore Dottorato

Prof. Enrico Dinelli

Relatore

Prof.ssa Elena Fabbri

Correlatore

Dott.ssa Maria Giulia Lionetto

Esame finale anno 2015

ABSTRACT

Obiettivo del lavoro è stato lo sviluppo e la validazione di nuovi bioassay e biomarker quali strumenti da utilizzare in un approccio ecotossicologico integrato per il biomonitoraggio di ambienti marino-costieri interessati da impatto antropico negli organismi che vivono in tali ambienti. L'ambiente reale impiegato per l'applicazione in campo è la Rada di Augusta (Siracusa, Italia). Una batteria di bioassay *in vivo* e *in vitro* è stata indagata quale strumento di screening per la misura della tossicità dei sedimenti. La batteria selezionata ha dimostrato di possedere i requisiti necessari ad un'applicazione di routine nel monitoraggio di ambienti marino costieri. L'approccio multimarker basato sull'impiego dell'organismo bioindicatore *Mytilus galloprovincialis* in esperimenti di traslocazione ha consentito di valutare il potenziale applicativo di nuovi biomarker citologici e molecolari di stress chimico parallelamente a biomarker standardizzati di danno genotossico ed esposizione a metalli pesanti. I mitili sono stati traslocati per 45 giorni nei siti di Brucoli (SR) e Rada di Augusta, rispettivamente sito di controllo e sito impattato. I risultati ottenuti supportano l'applicabilità delle alterazioni morfometriche dei granulociti quale biomarker di effetto, direttamente correlato allo stato di salute degli organismi che vivono in un dato ambiente. Il significativo incremento dell'area dei lisosomi osservato contestualmente potrebbe riflettere un incremento dei processi degradativi e dei processi autofagici. I dati sulla sensibilità in campo suggeriscono una valida applicazione della misura dell'attività di anidrasi carbonica in ghiandola digestiva come biomarker di stress in ambiente marino costiero.

L'utilizzo delle due metodologie d'indagine (bioassay e biomarker) in un approccio ecotossicologico integrato al biomonitoraggio di ambienti marino-costieri offre uno strumento sensibile e specifico per la valutazione dell'esposizione ad inquinanti e del danno potenziale esercitato dagli inquinanti sugli organismi che vivono in un dato ambiente, permettendo interventi a breve termine e la messa a punto di adeguati programmi di gestione sostenibile dell'ambiente.

The aim of the work was the development and validation of new bioassays and biomarkers as tools in an integrated ecotoxicological approach for the biomonitoring of impacted coastal marine environment environments. The Rada of Augusta (Syracuse, Sicily) was used as real environment for the field application of the proposed integrated approach. A battery of *in vivo* and *in vitro* bioassays was investigated as screening tool of the assessment of marine sediment toxicity. The battery has proven to have the necessary requirement for a routine application in marine coastal environment biomonitoring.

The multimarker approach based on the use of bioindicator organism *Mytilus galloprovincialis* in translocation experiments allowed to evaluate the field application potential of new cytological and molecular biomarkers in parallel to standardized biomarkers of genotoxicity and heavy metal exposure. Mussels were caged for 45 days in Brucoli (SR) and Rada di Augusta, reference site and impacted site respectively. Results support the applicability of granulocytes morphometric alterations as effect biomarker, directly correlated to the health of the organism. Morphometric alterations were accompanied by a significative increase of the lysosomal compartment, which in turn could reflect the pollutant induced increase of the degradative and autophagic processes. Carbonic anhydrase activity in digestive gland proved to be a valuable biomarker of chemical stress in marine coastal environment. The functional role of carbonic anhydrase in the lysosomal compartment functioning was evaluated.

The combined use of the two methodologies (bioassays and biomarkers) in an integrated ecotoxicological approach provides a sensitive and specific tool for the assessment of pollutant exposure and pollutant effects in biomonitoring of coastal marine environment, facilitating the application of monitoring data in risk-based decision making

ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE.....	9
1.1. BIOMONITORAGGIO DI AMBIENTI MARINO-COSTIERI.....	10
1.1.1. Monitoraggio delle aree marine costiere.....	10
1.2. I BIOASSAY IN ECOTOSSICOLOGIA	12
1.2.1. Significato interpretativo e ruolo dei bioassay nei programmi di gestione ambientale.....	12
1.2.2. Categorie di bioassay e ruolo applicativo	13
1.2.3. BIOASSAY IN VIVO.....	13
1.2.4. BIOASSAY IN VITRO.....	14
1.2.5. APPLICAZIONE DEI BIOASSAY ALLO STUDIO DELL'ECOTOSSICOLOGIA DEI SEDIMENTI	15
1.2.5.1. Composizione dei sedimenti	17
1.2.5.2. Vie di esposizione ai contaminanti nei sedimenti.....	17
1.2.5.3. Trasferimento lungo le catene trofiche acquatiche	18
1.2.5.4. Batterie di saggi ecotossicologici sui sedimenti	19
1.3. BIOMARKER	20
1.3.1. Categorie di biomarke e ruolo applicativo	21
1.3.2. Significato interpretativo e ruolo dei biomarker nei programmi di monitoraggio ambientale.....	24
1.3.3. Biomarker come strumenti diagnostici e prognostici di salute ambientale	26
1.4. ORGANISMO BIOINDICATORE.....	28
1.4.1. <i>Mytilus galloprovincialis</i> COME ORGANISMO SENTINELLA	30
1.4.1.1. I mitili nelle reti trofiche	30
1.4.1.2. La specie <i>Mytilus galloprovincialis</i>	31
1.6. APPROCCIO ECOTOSSICOLOGICO INTEGRATO.....	34
1.7. SCOPO DELLA RICERCA.....	36
1.8. I FASE	38
1.8. BATTERIA DI BIOASSAY in vivo e in vitro.....	39
1.8.1. SAGGIO DI TOSSICITA' ACUTA CON BATTERI BIOLUMINESCENTI: DETERMINAZIONE DELL'INIBIZIONE DELLA BIOLUMINESCENZA EMESSA DA <i>Vibrio fischeri</i>	39
1.8.1.1. Cenni di biologia ed ecologia della specie-test.....	39
1.8.1.2. Principio del metodo di saggio	40
1.8.1.3. SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA BIOLUMINESCENZA SU ELUTRIATO DI SEDIMENTI.....	41
1.8.1.4. SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA BIOLUMINESCENZA SU SEDIMENTO INTERO.....	41
1.8.2. SAGGIO DI MORTALITA' CON <i>Brachionus plicatilis</i> SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO.....	42
1.8.2.1. Cenni ed ecologia della specie.....	42
1.8.2.2. Principio del metodo di saggio	43
1.8.3. SAGGIO DI INIBIZIONE DELL'ATTIVITA' DELL'ENZIMA ANIDRASI CARBONICA SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO	43
1.8.3.1. Anidrase carbonica: caratteristiche generali	43
1.8.3.2. Struttura.....	44
1.8.3.3. Cinetica	45

1.8.3.4. <i>Inibizione dell'attività dell'enzima Anidrasi Carbonica</i>	46
1.8.3.5. <i>Principio del metodo di saggio</i>	47
1.9. II FASE.....	48
1.9.1. <i>BATTERIA DI BIOMARKER</i>	49
1.9.1. Emociti di molluschi bivalvi	49
1.9.1.2. Lisosomi.....	51
1.9.1.3. ALTERAZIONI MORFOMETRICHE DEI GRANULOCITI	53
1.9.1.4. TEST DEI MICRONUCLEI SU EMOCITI.....	53
1.9.1.5. CONCENTRAZIONE TISSUTALE DI METALLOTIONEINE IN GHIANDOLA DIGESTIVA	54
1.9.1.6. ATTIVITA' DELL'ENZIMA ANIDRASI CARBONICA	55
1.9.1.7. RUOLO FISILOGICO DI ANIDRASI CARBONICA IN GHIANDOLA DIGESTIVA DI MITILO	56
Principio del metodo	57
2. MATERIALI E METODI.....	58
2.1 MATERIALI	59
2.2. AMBIENTE REALE	60
2.3. FASI DI STUDIO	62
2.3.1. <i>I FASE</i>	62
2.3.1.1. Preparazione elutriato.....	63
2.3.1.2. SAGGIO INIBIZIONE DELLA BIOLUMINESCENZA SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO.....	64
2.3.1.3. SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA BIOLUMINESCENZA SU SEDIMENTO INTERO	67
2.3.1.4. SAGGIO DI MORTALITA' CON <i>Brachionus plicatilis</i> SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO.....	71
2.3.1.5. SAGGIO DI INIBIZIONE DELL'ATTIVITA' DELL'ENZIMA ANIDRASI CARBONICA SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO	72
2.3.2. <i>II FASE</i>	73
2.3.2.1. ESPERIMENTO DI TRASLOCAZIONE NEI SITI DI INTERESSE.....	73
2.3.2.1.1. <i>Campagna di traslocazione invernale (Time 1)</i>	73
2.3.2.1.2. <i>Campagna di traslocazione estiva (Time 2)</i>	73
2.3.2.1.3. <i>Prelievo tessuti</i>	74
2.3.2.1.4. <i>Prelievo emolinfa</i>	75
2.3.2.2. <i>BATTERIA DI BIOMARKER</i>	76
2.3.2.2.1. <i>CARATTERIZZAZIONE CITO-MORFOLOGICA DEI GRANULOCITI</i>	76
Colorazione dei campioni e analisi morfometrica	76
Analisi statistica	77
2.3.2.2.2. TEST DEI MICRONUCLEI SU EMOCITI	77
Analisi statistica	78
2.3.2.2.3. CONCENTRAZIONE TISSUTALE DI METALLOTIONEINE	78
Preparazione del campione	78
Determinazione spettrofotometrica delle Metallothioneine.....	79
Analisi statistica	80
2.3.2.2.4. ATTIVITA' DELL'ENZIMA ANIDRASI CARBONICA NEI TESSUTI GHIANDOLA DIGESTIVA, MANTELLO E BRANCIE	81
Preparazione del campione per la determinazione di AC nei tessuti ghiandola digestiva, mantello e branchie	81
Analisi statistica	82

2.3.2.2.5. STUDIO DEL RUOLO FISILOGICO DI ANIDRASI CARBONICA IN GHIANDOLA DIGESTIVA DI MITILO.....	82
2.3.2.2.5. STUDIO <i>in vivo</i> IN CONDIZIONI CONTROLLATE DI LABORATORIO	82
<i>Dissociazione delle cellule della ghiandola digestiva</i>	83
<i>Lecture fluorimetriche</i>	83
<i>Analisi statistica</i>	84
2.4. ABBREVIAZIONI.....	84
2. RISULTATI.....	85
3.1. FASI DI STUDIO.....	86
3.2 I FASE.....	87
3.2.1. BATTERIA DI BIOASSAY.....	88
3.2.1.1. SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA BIOLUMINESCENZA SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO.....	88
3.2.1.2. SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA BIOLUMINESCENZA SU SEDIMENTO INTERO	89
3.2.1.3. SAGGIO DI MORTALITA' CON <i>Brachionus plicatilis</i> SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO.....	92
3.2.1.4. SAGGIO DI INIBIZIONE DELL' ATTIVITA' DELL' ENZIMA ANIDRASI CARBONICA SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO	93
3.3. II FASE.....	94
3.3.1. BATTERIA DI BIOMARKER	95
3.3.1.1. ALTERAZIONI MORFOMETRICHE DEI GRANULOCITI	95
3.3.1.1.1. Area dei granulociti.....	96
3.3.1.1.2. Area lisosomiale.....	98
3.3.1.1.3. Rapporto area lisosomiale/area cellulare dei granulociti	99
3.3.1.2. TEST DEI MICRONUCLEI SU EMOCITI.....	100
3.3.1.3. CONCENTRAZIONE TISSUTALE DI METALLOTIONEINE	102
3.3.1.4. ATTIVITA' DI ANIDRASI CARBONICA	104
3.3.1.4.1. ATTIVITA' DI ANIDRASI CARBONICA IN GHIANDOLA DIGESTIVA	104
3.3.1.4.2. ATTIVITA' DI ANIDRASI CARBONICA NEL MANTELLO	105
3.3.1.4.3. ATTIVITA' DI ANIDRASI CARBONICA NELLE BRANCIE.....	107
3.3.1.5. STUDIO DEL RUOLO FISILOGICO DI ANIDRASI CARBONICA IN GHIANDOLA DIGESTIVA DI MITILO	109
3.3.1.5.1. STUDIO <i>in vivo</i> IN CONDIZIONI CONTROLLATE DI LABORATORIO	109
4. DISCUSSIONE.....	112
4.1 BATTERIA DI BIOASSAY <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	114
4.2 BATTERIA DI BIOMARKER MOLECOLARI E CELLULARI.....	121
5. CONCLUSIONI	136
6. BIBLIOGRAFIA.....	140

1. INTRODUZIONE

1.1. BIOMONITORAGGIO DI AMBIENTI MARINO-COSTIERI

Il costante aumento dello sfruttamento delle risorse naturali da parte dell'uomo si riflette, insieme alla progressiva modifica del territorio, sulla qualità dei sistemi naturali, minacciandone beni e servizi essenziali per le società (quali ad esempio produzione di risorse alimentari, depurazione delle acque e ciclizzazione dei nutrienti).

Se distruzione e frammentazione degli habitat sono effetti evidenti dell'azione dell'uomo negli ecosistemi terrestri, negli ecosistemi acquatici a questa azione diretta si somma una forte azione indiretta sulla qualità chimica delle acque e, conseguentemente, sulle popolazioni e corporazioni di piante ed animali che le colonizzano.

Gli ecosistemi marino-costieri sono ambienti estremamente produttivi, con un'elevata produzione primaria e secondaria, caratterizzati da ricchezza e diversità di habitat e di biocenosi. Storicamente importanti per la pesca, l'acquacoltura, il turismo, attività industriali e portuali, tali ambienti sono sottoposti a forti pressioni antropiche che ne minacciano gli equilibri ecologici, tra cui l'immissione di contaminanti di varia natura.

Gli effetti negativi di questo modello di sviluppo si riflettono oggi in una varietà di alterazioni delle caratteristiche naturali delle coste, un progressivo inquinamento delle acque marine, soprattutto costiere, e in una varietà di impatti che interessano scale geografiche sempre più ampie.

La tutela della naturalità degli ecosistemi marino-costieri si basa sulla capacità di riconoscere in modo quantitativo i limiti entro cui le attività umane sono compatibili con la loro conservazione e implica l'adozione di sistemi di controllo adeguati. Da qui la necessità di definire modelli concettuali e strumenti metodologici che permettano di distinguere tra le variazioni delle caratteristiche strutturali e funzionali degli ecosistemi che si verificano indipendentemente dalle attività umane e quelle che si verificano come risposta ad esse.

1.1.1. Monitoraggio delle aree marine costiere

Obiettivo del monitoraggio delle aree marine costiere è stabilire un quadro generale coerente ed esauriente dello stato ecologico in rapporto alle possibili fonti di inquinamento, come base per la loro gestione.

Il monitoraggio ambientale si effettua attraverso sistemi e metodologie di indicizzazione fondati sull'utilizzo di un numero limitato di fattori chiave che possano utilmente riassumere le caratteristiche ed il comportamento del sistema complesso che si intende rappresentare (Vismara e Zavatti, 1996).

L'utilizzo di metodiche tradizionali incentrate sull'analisi di parametri chimico-fisici presenta una serie di difficoltà pratiche amplificate, quando l'oggetto di studio è un ambiente acquatico, da una serie di fattori: le alterazioni ambientali si verificano di frequente in presenza di basse concentrazioni di inquinanti, propagati da sorgenti puntiformi o diffuse spesso discontinue; le sostanze inquinanti immesse nell'ambiente subiscono spesso trasformazioni difficilmente prevedibili; le masse d'acqua sono in continuo movimento e le caratteristiche dell'ambiente in esame subiscono repentine modifiche.

Metodiche scientifiche basate sull'impiego di specie animali o vegetali per misurare l'impatto degli agenti inquinanti su specifiche matrici ambientali forniscono, a differenza di quelle tradizionali, una valutazione globale degli effetti dannosi esercitati sugli organismi viventi e permettono di considerare gli eventuali effetti di sinergia che possono instaurarsi per la presenza contemporanea di più sostanze o effetti a lungo termine anche a basse concentrazioni di esposizione. La regolare e sistematica valutazione delle condizioni dell'ambiente mediante tali metodiche prende il nome di biomonitoraggio.

L'ecotossicologia studia gli effetti tossici degli agenti chimici e fisici su popolazioni o comunità all'interno di un ecosistema definito, individuando i diversi tipi di trasporto di questi agenti e la loro interazione con l'ambiente (Butler, 1978). Le valutazioni ecotossicologiche sono complementari e devono essere integrate ai controlli chimico-fisici convenzionali.

La valutazione della qualità di ambienti marino-costieri è diventata di importanza prioritaria negli ultimi anni. In Europa la protezione delle acque costiere è regolamentata dalla Water Framework Directive (WFD) e in generale quella del mare dalla Marine Strategy Framework Directive (MSFD). Nell'ambito della MSFD agli stati membri si richiede come obiettivo il raggiungimento di un "good environmental status" entro il 2020.

Esiste consenso a livello internazionale che determinati obiettivi specifici debbano essere raggiunti: ridurre la concentrazione di composti chimici prioritari, non eccedere la concentrazione soglia per una serie di contaminanti chimici, ridurre gli impatti dell'inquinamento chimico sugli individui e le popolazioni (Laane *et al.*, 2012).

Il raggiungimento di tali obiettivi passa necessariamente attraverso il monitoraggio della qualità delle acque. Notevole sviluppo stanno ricevendo negli ultimi decenni in campo ecotossicologico metodologie biologiche volte ad evidenziare l'impatto degli inquinanti sugli organismi al fine di sviluppare sistemi di allerta di alterate condizioni ambientali. A tal riguardo in campo

ecotossicologico bioassay e biomarker rappresentano strumenti metodologici di notevole interesse, come dimostrato dalla notevole crescita di studi volti al loro sviluppo e applicazione.

1.2. I BIOASSAY IN ECOTOSSICOLOGIA

Lo scopo della sperimentazione tossicologica, nel campo dell'ecotossicologia, è quello di definire le quantità massime di sostanze potenzialmente pericolose accettabili ai fini della difesa degli ecosistemi naturali o più in generale della biosfera nel suo complesso.

Studi mediante saggi biologici possono essere effettuati con finalità di ricerca scientifica di base, quali lo studio dei meccanismi di azione tossica o la ricerca delle relazioni tra la struttura delle molecole e la loro attività biologica, o per scopi applicativi più o meno diretti, quali la classificazione delle sostanze in funzione del loro effetto o l'adempimento di norme legislative nazionali o internazionali.

I bioassay sono saggi effettuati in condizioni standardizzate di laboratorio nei quali individui appartenenti ad una specie-target vengono esposti, in condizioni controllate, a campioni naturali (acqua, reflui urbani, sedimento, suolo, ecc.) al fine di valutarne gli eventuali effetti tossicologici, ovvero l'alterazione o la compromissione di una o più funzioni come sopravvivenza, crescita, riproduzione, motilità, fotosintesi o comportamento (Maffiotti and Bona, 1997).

Perché si manifesti un effetto è necessario che la sostanza penetri nell'organismo e rimanga in contatto, in quantità e per un tempo sufficiente, con le strutture cellulari ed eventualmente con uno specifico bersaglio.

1.2.1. Significato interpretativo e ruolo dei bioassay nei programmi di gestione ambientale

La sperimentazione può però essere condotta su un numero limitato di specie e da queste deve essere estrapolata all'enorme numero di specie viventi conosciute.

Aree di intensa ricerca sono l'estrapolazione dei risultati alle condizioni naturali e la comprensione della loro utilità nella valutazione del rischio ecologico.

Una componente critica dell'applicazione dei saggi ecotossicologici è l'integrazione dei risultati che essi restituiscono in condizioni standardizzate di laboratorio con quanto realmente accade nell'ambiente naturale (Kendall and Akerman, 1992). I saggi biologici effettuati in laboratorio forniscono l'impatto tossicologico delle sostanze inquinanti sulla biochimica e fisiologia dei singoli organismi. Le conoscenze acquisite in laboratorio, integrate con quanto si verifica in condizioni naturali, sono d'importanza critica per comprendere la complessa serie di parametri con i quali, in

caso di esposizione a sostanze tossiche, un organismo si deve confrontare per riprodursi o per sopravvivere.

1.2.2. Categorie di bioassay e ruolo applicativo

I principali requisiti di un test ecotossicologico sono: standardizzazione, riproducibilità, semplicità di esecuzione, potere discriminatorio nei confronti dei diversi livelli di tossicità, costi relativamente contenuti, rapidità di esecuzione.

A seconda della tipologia dell'organismo, della entità degli effetti misurabili e in funzione dell'*endpoint* considerato (ad es. mortalità, alterazione di funzioni fisiologiche essenziali quali fecondazione, schiusa delle uova, bioluminescenza, crescita, motilità, ecc.) i saggi possono essere letali o subletali.

In funzione della durata della prova rispetto al ciclo vitale dell'organismo i saggi ecotossicologici sono inoltre suddivisibili in tre categorie:

- Saggi di tossicità acuta, con l'obiettivo di misurare l'effetto dovuto all'esposizione a sostanze pure o a miscele per un intervallo di tempo compreso, di norma, tra 15 minuti e 98 ore.

I risultati ricavati da tali saggi vengono impiegati per la valutazione degli effetti tossici dovuti a fenomeni di contaminazione temporanei o nelle classificazioni di tossicità.

- Saggi di tossicità cronica, finalizzati a determinare una soglia di tossicità, ovvero quel livello di esposizione massimo che traccia il confine tra livelli efficaci e livelli non efficaci a tempo indeterminato. Per la misura delle risposte a lungo termine vengono impiegate esposizioni lunghe, relativamente alla durata del ciclo vitale delle specie in esame.
- Test di tossicità sub-cronici. Evidenziano effetti dovuti all'esposizione ad una sostanza per un periodo inferiore o uguale ad un decimo della vita dell'organismo.

In base alla tipologia di saggio è possibile distinguere i bioassay in due tipologie. bioassay *in vivo* e bioassay *in vitro*.

1.2.3. BIOASSAY IN VIVO

I bioassay *in vivo* prevedono l'esposizione di un gruppo omogeneo di organismi appartenenti alla stessa specie campionati in un ambiente non contaminato alla sostanza o matrice test per periodi variabili in funzione del tipo di tossicità indagata, acuta o cronica,. I risultati ottenuti vengono confrontati con quelli ricavati su organismi di controllo, stabulati nelle medesime condizioni di saggio, ma in assenza della sostanza o matrice test.

Gli svantaggi di questo tipo di test sono di natura etica, per l'impiego di organismi viventi, e pratica, poiché richiedono personale specializzato e comportano un maggiore dispendio in termini di costi e di tempi richiesti per l'analisi.

1.2.4. BIOASSAY *IN VITRO*

L'ecotossicologia, diversamente dalla tossicologia, incentrata sull'individuo e su singole specie, ha come obiettivo primario la valutazione degli effetti delle sostanze chimiche a livello di popolazioni, comunità ed ecosistemi. Un sistema *in vitro*, sviluppato in ambito ecotossicologico, dovrebbe essere in grado non solo di estrapolare gli effetti tossici *in vivo*, ma anche di fornire informazioni sulle risposte biologiche a livello di popolazione.

Con il termine *in vitro* si fa riferimento al modo in cui le componenti di un organismo vivente (cellule, tessuti, organi) sono mantenute al di fuori dell'organismo stesso, in un ambiente artificiale, controllato, isolate dai molteplici sistemi fisiologici che regolano le loro attività *in vivo*.

I bioassay *in vitro* oltre al potenziale di sostituzione e/o riduzione del numero di animali nei saggi di tossicità, offrono una serie di vantaggi:

- soddisfano la necessità di disporre di metodi facilmente standardizzabili, rapidi e a basso costo per il pre-screening di campioni ambientali e per la valutazione ecotossicologica di sostanze chimiche,
- permettono la comparazione inter-specie in condizioni equivalenti di esposizione ai composti tossici;
- offrono la possibilità di fare sperimentazione su molecole o sistemi di molecole estratte dagli organismi, facilmente reperibili in commercio (Babín and Tarazona, 1995) e disponibili presso Enti certificati che ne garantiscono rigorosi controlli di qualità (caratteristiche morfologiche e genotipiche) e l'assenza di contaminazioni;
- consentono di studiare i meccanismi d'azione cellulari e molecolari delle sostanze tossiche;
- consentono di saggiare effetti e rapporti dose-risposta misurabili in un ampio intervallo di dosi;
- consentono la valutazione rapida di un elevato numero di sostanze potenzialmente tossiche mediante analisi spettrofluorimetrica in piastre multipozzetto;
- garantiscono il controllo delle condizioni sperimentali;

- garantiscono uniformità e facile standardizzazione del modello/test (cellule di un solo tipo).
- consentono di ridurre la quantità di sostanza potenzialmente tossica impiegata nell'esecuzione dei saggi e, di conseguenza, dei rifiuti prodotti dalla sperimentazione;
- permettono di limitare i costi di analisi.

Queste caratteristiche rendono questo tipo di bioassay strumenti adatti all'impiego in analisi di routine nell'ambito di programmi di monitoraggio ambientale.

Gli svantaggi dell'impiego dei metodi di indagine *in vitro* sono rappresentati dall'assenza, nei sistemi di saggio, delle interazioni cellula-cellula-tessuto e delle attività fisiologiche caratteristiche dei sistemi complessi. Inoltre questo tipo di saggi trascura i processi biocinetici (assorbimento, distribuzione, eliminazione).

1.2.5. APPLICAZIONE DEI BIOASSAY ALLO STUDIO DELL'ECOTOSSICOLOGIA DEI SEDIMENTI

L'analisi ecotossicologica dei sedimenti rappresenta un aspetto molto importante nel monitoraggio di aree marino-costiere.

Il sedimento è un sistema complesso costituito da materiale alloctono e autoctono, minerale (argille, frammenti di roccia, minerali formati in acqua) e organico (sostanze organiche flocculate e detrito organico alloctono) che si deposita sul fondo dei corpi idrici. La sua composizione e la velocità con cui si accumula esprimono l'attività del corpo idrico come recettore del bacino idrografico e come centro di attività biologica. Riflette pertanto le vicissitudini del corpo idrico e può essere considerato come una sorta di sua memoria.

Il monitoraggio della presenza di contaminanti nei sedimenti dovrebbe costituire parte integrante di ogni piano di gestione della qualità delle acque (Davoren *et al.*, 2005) e la corretta valutazione del grado di contaminazione e della distribuzione degli inquinanti nella matrice dovrebbe rappresentare la necessaria premessa di ogni serio intervento di risanamento e ripristino di qualsiasi ambiente acquatico contaminato.

La valutazione della tossicità dei sedimenti è complessa per via della natura della matrice da analizzare e delle molteplici vie di contaminazione con cui le sostanze raggiungono la comunità biotica dall'ecosistema. Per lungo tempo l'approccio tradizionalmente seguito è stato quello della valutazione chimica, che ha il limite di non consentire di caratterizzare completamente il sedimento

sotto il profilo chimico, valutare la frazione biodisponibile delle sostanze potenzialmente tossiche e considerare gli effetti additivi, sinergici e antagonisti esercitati da una miscela complessa di sostanze chimiche nei confronti di organismi viventi.

La matrice è costituita da tre componenti principali:

- una fase liquida, ovvero l'acqua interstiziale, in una frazione variabile dal 20 al 30 % nei sedimenti profondi al 90% del volume totale negli strati superficiali non consolidati;
- una fase inorganica, costituita da granuli minerali derivanti dall'erosione del bacino imbrifero e dalla precipitazione/coprecipitazione di sali;
- una fase solida organica, costituita da particellato organico autoctono e alloctono.

A livello dell'interfaccia acqua/sedimento si creano equilibri dinamici che giocano un ruolo determinante negli scambi tra i vari comparti, nella messa in gioco di concentrazioni piuttosto elevate, nella capacità più o meno marcata di fungere da *sink* per un certo composto quando le caratteristiche chimico-fisiche sono compatibili, così pure, nel caso opposto, di fungere da comparto di minimo ma continuativo passaggio.

I delicati equilibri che si instaurano tra sostanze aventi un coefficiente di ripartizione favorevole all'adsorbimento nel sedimento (e che quindi difficilmente in linea teorica vengono rilasciate ad una soluzione acquosa) possono essere continuamente spostati anche nella direzione meno probabile per continuo ricambio della colonna d'acqua, per movimenti improvvisi e alteranti la matrice del sedimento o per la semplice bioturbazione ad opera di animali detritivori o fossori o scavatori.

La particolare dinamica delle maree facilita infatti la sedimentazione e la mineralizzazione della materia organica ad opera dei batteri e crea situazioni di rimescolamento delle acque che facilitano un veloce scambio e smaltimento dei residui del metabolismo.

A livello dell'interfaccia con il comparto acqua, il sedimento si trova sotto forma di uno strato composto soprattutto da acqua (per circa il 95%) e particelle molto ricche in materia organica, condizione che permette un'intensa attività animale con relativa forte bioturbazione. Lo strato che si definisce più attivo di un sedimento, dove cioè avviene la maggior parte dei fenomeni degradativi, interessa sempre i primi 5 cm. I nutrienti e altri elementi indispensabili per la vita e allo stesso modo eventuali sostanze inquinanti, vengono trattenuti con facilità per motivi fisici, ad esempio a causa della facilità di sedimentazione, e biologici, come la presenza di moltissimi animali filtratori.

Il sedimento tende poi a comprimersi mano a mano che si scende in profondità, con una riduzione nel contenuto di acqua che può arrivare al 50% entro poche decine di centimetri, in funzione della granulometria e del tipo di litologia proprio della matrice, oltre che del contenuto in materia organica (acidi umici, acidi fulvici ed umina). Fenomeno importante dal punto di vista ecotossicologico perché tanto più il sedimento risulta compattato e meno ricco in umidità, tanto più lenta sarà la mobilità delle sostanze in esso contenute e tanto più lento e difficile sarà il rilascio alla colonna d'acqua.

1.2.5.1. Composizione dei sedimenti

Il sedimento è costituito da una matrice inorganica minerale, da componenti organici (acidi umici ma anche polisaccaridi, lignina, cellulosa, zuccheri in genere, proteine), dagli ubiquitari ossidi ed idrossidi di manganese e ferro e, nel caso di condizioni totali o parziali di anossia, dal solfuro di idrogeno, la cui dissociazione sotto forma di ioni HS^- e S^{2-} dipende dal pH.

L'acqua superficiale del sedimento può essere ricca di solfati, fosfati e carbonati che possono complessare e/o precipitare molti metalli per formazione di composti insolubili.

Un sedimento che si trovi al di sotto di un corpo d'acqua è, nei primissimi strati, saturo d'acqua. La saturazione identifica due tipi di acqua di interesse nelle cinetiche ambientali: la cosiddetta pore water e l'acqua superficiale. La prima è fortemente legata ai granuli di sedimento attraverso meccanismi di indovamento nei granuli, la seconda è blandamente legata e adesa alla superficie del granulo mediante meccanismi di legame analoghi a quelli dell'acqua interstiziale, ma molto più deboli. L'acqua interstiziale è quindi poco disponibile e ottenibile solo dopo elevate centrifugazioni del sedimento ($15000 \text{ giri min}^{-1}$) o con elevate pressioni. La differenza in forza di legame implica anche una differenza significativa nel chimismo delle due acque, essendo quella interstiziale ben più concentrata di quella superficiale. L'acqua che entra realmente in gioco ai fini eco tossicologici è solo quella di superficie, a parte il caso dell'ingestione dei granuli di sedimento da parte di un organismo.

Le informazioni sulla partizione dei chimici tra la fase solida e la fase liquida dei sedimenti sono utili per stabilire le concentrazioni d'effetto.

1.2.5.2. Vie di esposizione ai contaminanti nei sedimenti

Un eventuale inquinamento comporta solitamente un arricchimento di sostanze inquinanti nella frazione particellata inorganica e organica. Gli inquinanti organici ed inorganici, una volta adsorbiti o incorporati al materiale particellato sospeso (biotico e/o abiotico) ne seguono il destino e vengono

trasferiti per sedimentazione sul fondo, dove si stabilisce un equilibrio dinamico solido/liquido che, generalmente, comporta un arricchimento in elementi e composti tossici nell'acqua interstiziale.

Gli organismi risultano esposti a sostanze tossiche in soluzione, sostanze tossiche adsorbite sulle particelle e sostanze tossiche incorporate in tali particelle.

L'esposizione può avvenire per contatto o per ingestione, il che significa che il percorso metabolico di un inquinante e il suo effetto possono variare in funzione della ripartizione dell'inquinante nelle diverse fasi del sedimento, della biodisponibilità e dei fenomeni di sinergia o antagonismo con altri composti eventualmente presenti.

La contaminazione può interessare direttamente gli organismi bentonici o indirettamente, attraverso la catena alimentare o per fenomeni di risospensione e rilascio che rendono nuovamente biodisponibili gli inquinanti, altri organismi.

Non è del tutto chiaro in che misura gli inquinanti possano essere assunti dagli organismi direttamente nella loro forma adsorbita, o se sia necessario che le molecole vengano trasferite al mezzo acquoso perché diventino disponibili. L'assunzione diretta di un composto inquinante adsorbito è certamente influenzata dalla natura del composto, dal tipo di superficie alla quale è legato, dalla forza di legame, dalla specie dell'organismo e, almeno in alcuni casi, dalle caratteristiche dell'acqua ambiente (temperatura, pH, contenuto di ossigeno). Disponibilità e tipologia di cibo, tassi di alimentazione, efficienza di assimilazione sono tra i fattori in grado di influenzare i tassi di input che, assieme ai tassi di escrezione, controllano la rete di uptake dei contaminanti dai sedimenti (Wang, 2002).

1.2.5.3. Trasferimento lungo le catene trofiche acquatiche

Negli ecosistemi acquatici, a differenza di quelli terrestri, i trasferimenti lungo la catena alimentare sono condizionati dallo scambio per diffusione tra organismi e mezzo acquoso nel quale sono immersi.

In generale i composti persistenti presentano una significativa correlazione tra il logaritmo della concentrazione dei residui nei tessuti degli organismi e la loro posizione nella catena trofica. Le concentrazioni aumentano cioè progressivamente passando dai produttori primari ai consumatori primari e da questi ai consumatori secondari. L'incremento è poi più marcato per i composti che vengono metabolizzati più lentamente ed hanno emivita biologica più lunga.

Il processo di biomagnificazione si applica apparentemente a tutti i livelli trofici, ma con qualche differenza: gli invertebrati acquatici e i pesci ricavano infatti una certa razione degli inquinanti

direttamente dall'acqua e/o dai sedimenti, e non dal cibo. Nei predatori un fattore di biomagnificazione superiore all'unità suggerisce che la maggior parte del carico inquinante, se non il totale, viene assunto tramite il cibo.

Gli inquinanti lipofili con emivite relativamente brevi, come gli idrocarburi policiclici aromatici, non presentano invece questa tendenza alla biomagnificazione. Gli invertebrati dei livelli trofici inferiori (ad esempio i molluschi) possono bioconcentrarli e/o bioaccumularli, non avendo una grande capacità di metabolizzarli. I loro predatori sono in grado di metabolizzarli velocemente per mezzo dell'attacco delle monossigenasi.. I composti prontamente degradabili possono costituire un pericolo per l'attivazione dei loro prodotti di biotrasformazione.

1.2.5.4. Batterie di saggi ecotossicologici sui sedimenti

Considerato che la sensibilità di ciascun saggio ecotossicologico alle diverse classi di contaminanti chimici è diversa in relazione alla specifica sensibilità della specie test considerata, l'utilizzo di batterie di saggi ecotossicologici basati su diversi organismi test, possibilmente appartenenti a livelli trofici differenti, è da preferire rispetto all'utilizzo del singolo test, incrementando la comprensione del grado di inquinamento di un sedimento. L'allestimento di una batteria deve inoltre essere modulato a seconda della specifica applicazione: tipologia dell'ambiente oggetto dell'indagine, livelli quantitativi e qualitativi presunti di contaminanti, caratteristiche chimico-fisiche delle sostanze coinvolte, finalità dello studio ecotossicologico, risorse disponibili.

I criteri di scelta degli organismi di una batteria di saggi ecotossicologici sono in parte sovrapponibili a quelli propri dei saggi monospecifici. ASTM (2003) indica i seguenti criteri da adottare nella selezione di organismi test in batterie finalizzate alla valutazione della tossicità dei contaminanti associati ai sedimenti:

- Disponibilità di un database tossicologico che supporti informazioni circa la sensibilità ad un range di contaminanti di interesse nei sedimenti;
- Disponibilità di un database per la comparazione interlaboratorio delle procedure operative;
- Stile di vita dell'organismo test che preveda il contatto diretto con i sedimenti;
- Facilità di allevamento e manipolazione dell'organismo test. L'ASTM contempla anche la possibilità di una raccolta in natura, perché molte specie possono essere mantenute in laboratorio per il tempo necessario alla preparazione ed esecuzione dei saggi, ma non tutte sono allevabili (es. sopravvivono, ma non si riproducono);
- Facilità di identificazione;
- Disponibilità nell'arco dell'intero anno solare;

- Sensibilità (capacità di rilevare i tossici);
- Riconoscimento come specie di riferimento in metodi standardizzati;
- Ampia distribuzione geografica nell'area oggetto di studio;
- Importanza ecologica e/o economica;
- Tolleranza ad un ampio range di caratteristiche fisico-chimiche dei sedimenti (ad esempio granulometria);
- Compatibilità con gli *endpoint* e al tipo di esposizione selezionati;
- Capacità di fornire risposte confermate in studi condotti con popolazioni naturali di organismi bentonici.

Gli organismi selezionati dovrebbero essere filogeneticamente ed ecologicamente vicini alle specie dominanti nell'area oggetto di studio. ASTM (2003) indica l'utilizzo di specie indigene del sito da controllare, ma ammette che possano in alternativa essere utilizzate specie che abbiano una simile nicchia ecologica e la stessa modalità di alimentazione, o un comportamento simile.

Ciclo vitale, strategia riproduttiva e dimensioni della specie possono avere rilevanza nel determinare vie di esposizione, meccanismi di tossicità, cinetica e bioaccumulo.

Gli stadi vitali delle specie selezionate devono essere ben distinti dal punto di vista filogenetico.

1.3. BIOMARKER

Depledge (1994) definisce biomarker “quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo (individuo o popolazione) che dà evidenza di esposizione e/o effetto ad uno o più composti inquinanti (e/o radiazioni).

Tale approccio metodologico trova fondamento sul concetto della intercorrelabilità degli effetti di un contaminante ai vari livelli di complessità strutturale.

La tossicità primaria di un contaminante si esercita a livello biochimico e molecolare (modificazioni delle attività enzimatiche, danni al DNA, alterazione prodotti metabolici, ecc.) e solo successivamente gli effetti si possono riscontrare, mediante un meccanismo a cascata, ai gradini superiori dell'organizzazione gerarchica, vale a dire a livello di organello, cellula, tessuto, organismo, fino a giungere al livello di popolazione. Parallelamente all'impatto negativo della sostanza inquinante ai diversi livelli di organizzazione biologica si sviluppano delle risposte adattative allo stress chimico che tendono a riportare il sistema ad uno stato di omeostasi. In

particolare le risposte omeostatiche molecolari tendono a diminuire l'effetto tossico del composto inquinante. Quando però il meccanismo omeostatico difensivo, ad un determinato livello funzionale, non è sufficiente a bilanciare l'azione del tossico, l'effetto negativo si manifesta ai gradini strutturalmente e funzionalmente più elevati.

Possono rappresentare dei “potenziali markers” di contaminazione ambientale tutte le risposte, omeostatiche e non, messe in atto dall'organismo nei confronti dell'insulto chimico (Fossi, 2000; Bayne, 1985) (Fig.1).

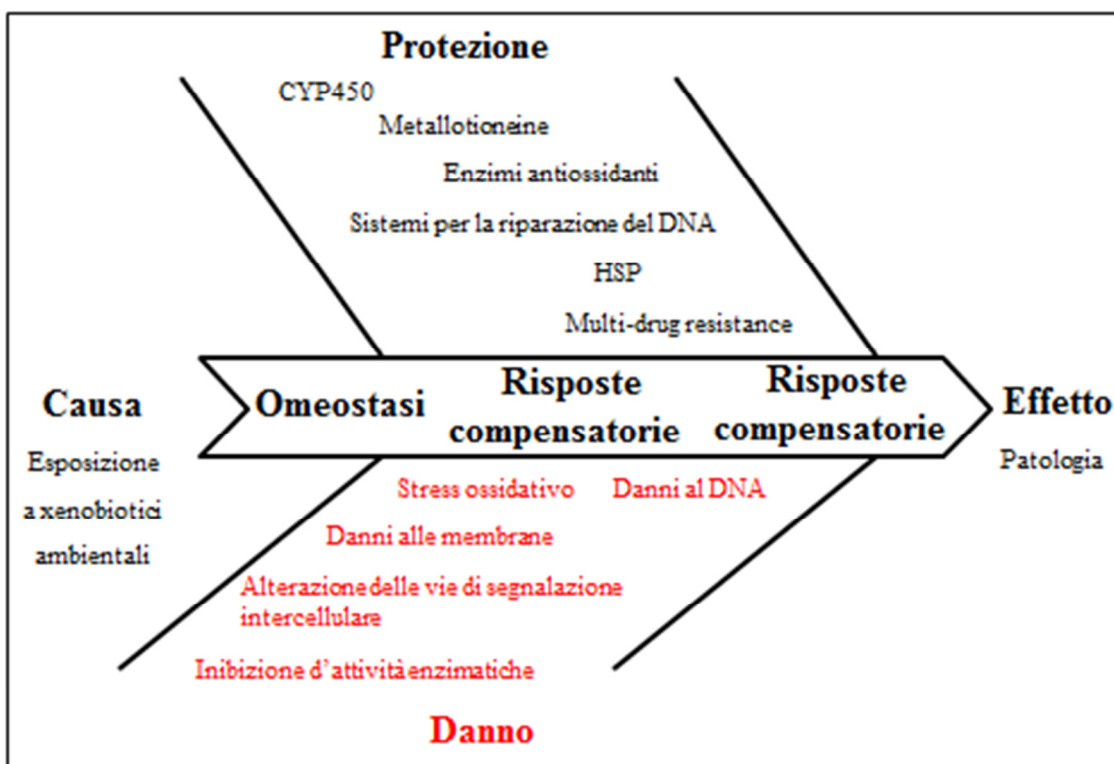


Figura 1. Modificata da Moore (1985).

1.3.1. Categorie di biomarke e ruolo applicativo

I biomarker vengono comunemente classificati in funzione della diversa risposta a livello gerarchico nelle seguenti categorie (Fossi, 2000).

- **Alterazioni del DNA:** Molecole genotossiche (ad esempio benzo(a)pirene) si legano stabilmente al DNA formando degli addotti. La comparsa di tali alterazioni strutturali del DNA fornisce evidenza dell'avvenuta esposizione ad un inquinante. La formazione degli addotti può causare rotture sulla doppia elica del DNA., modificazioni strutturali

secondarie, che rappresentano delle risposte precoci. Aberrazioni cromosomiche e mutazioni sono eventi irreversibili, modificazioni secondarie che si generano quando viene superata la capacità di riparo degli organismi. Le aberrazioni cromosomiche sono valutate con test citologici come la determinazione dei micronuclei, il test della cometa o l'analisi cromosomica.

- **Risposte di proteine:** sono caratterizzate dall'inibizione, dall'induzione e dall'attività di proteine funzionali.

Appartiene a tale categoria il sistema multienzimatico delle monossigenasi a funzione mista MFO, il quale gioca un ruolo fondamentale nei processi iniziali (Fase I) di detossificazione di contaminanti ambientali di sintesi: lo xenobiotico idrofobo viene reso reattivo attraverso reazioni di ossidazione (con l'inserimento nella molecola gruppi polari -OH; -SH, -COOH), rendendo possibile l'attività degli enzimi coniuganti (Fase II) e la successiva eliminazione dall'organismo. L'induzione di tali enzimi rappresenta un segnale quantitativo dell'avvenuta esposizione a sostanze tossiche.

A questa tipologia di risposte appartengono le metallotioneine: caratterizzate da un ruolo fisiologico legato alla regolazione intracellulare di metalli essenziali, tali proteine sono indotte dall'esposizione a metalli pesanti e rappresentano un biomarker di esposizione a tale classe di contaminanti.

Rientrano inoltre nella categoria le proteine da stress, biomarker generali di effetto; le esterasi (distinte in esterasi di tipo A, responsabili della detossificazione dei composti organosforici ed esterasi di tipo B, inibite da tali sostanze); e le risposte di tipo ossidativo, quali l'incremento dell'attività di enzimi antiossidanti (superossidodismutasi, catalasi, perossidasi e glutatione riduttasi) o l'ossidazione di proteine, lipidi ed acidi nucleici.

- **Prodotti metabolici:** il metabolismo di alcuni composti biologici endogeni può essere alterato dalla presenza di inquinanti che provocano un accumulo anormale di prodotti di sintesi intermedi. Ne è un esempio l'alterazione del metabolismo delle porfirine, le quali possono essere utilizzate come biomarker di esposizione a composti tossici.
- **Variazioni a carico del sistema immunitario:** il sistema immunitario difende l'organismo da agenti patogeni e può essere utilizzato come indicatore dello stato di salute di un organismo stressato da fattori ambientali. Tra i biomarker immunologici maggiormente utilizzati possono essere ricordati l'attività di fagocitosi dei macrofagi, la chemiluminescenza e l'attività citotossica dei leucociti.

- **Alterazioni istopatologiche:** l'effetto tossico di molti inquinanti si traduce nel lungo periodo in alterazioni istopatologiche in organismi bersaglio quali ad esempio il fegato, (dove differenti tipi di alterazioni possono essere facilmente correlate alla presenza di contaminanti ambientali) la pelle, l'apparato muscolo-scheletrico, il tratto intestinale, gli organi riproduttivi.
- **Biomarker non specifici e fisiologici:** appartengono a questa categoria risposte endocrine (ad esempio l'alterazione del rilascio delle catecolamine e ormoni corticosteroidi), risposte riproduttive (ad esempio l'alterazione di ormoni steroidei), tassi di crescita (ad esempio concentrazione di RNA, sintesi proteica), risposte di tipo energetico (quali la valutazione delle riserve energetiche dell'organismo glicogeno, lipidi e proteine), biochimica del sangue (valutazioni condotte su enzimi ematici, lipidi, glucosio).
- **Biomarker comportamentali:** la possibilità di una relazione fra la variabilità di alcune attività comportamentali (mobilità, abitudini alimentari, aggressività, etc.) e i livelli crescenti di esposizione a contaminanti ambientali è stata indagata tramite studi di laboratorio, ma per ora l'applicabilità a studi ambientali presenta ancora notevoli difficoltà interpretative.

I biomarker vengono, inoltre, comunemente classificati in biomarker di esposizione e biomarker di effetto a seconda del significato del loro segnale tossicologico.

- Si definiscono *biomarker di esposizione* tutte le risposte di un organismo, ai diversi livelli di complessità strutturale, che indicano l'esposizione ad un composto chimico o ad una classe di composti chimici, ma non forniscono nessuna indicazione dei reali effetti tossicologici sull'organismo. Ad esempio l'inibizione delle esterasi plasmatiche, come la butirrilcolinesterasi (BChE) e le carbossilesterasi (CbE), ad opera degli insetticidi organofosforici.
- Rientrano nei cosiddetti *biomarker di effetto* tutte quelle risposte che indicano sia l'esposizione ad un composto tossico che il suo effetto tossicologico.

A seconda della loro specificità di risposta nei confronti di agenti inquinanti i marcatori biologici possono essere suddivisi in due grandi categorie: biomarker specifici e biomarker generali.

- Fanno parte dei *biomarker specifici* quelle risposte molecolari e biochimiche che si manifestano in un organismo a seguito dell'esposizione ad una specifica classe di contaminanti. La risposta è estremamente definita e indica chiaramente la classe molecolare responsabile del fenomeno di contaminazione. Ne sono esempi l'inibizione delle esterasi di tipo B (AChE, BChE e CbE) nei confronti di insetticidi neurotossici come organosfosforici o carbammati; l'induzione del sistema MFO, biomarker specifico della presenza di xenobiotici idrofobici come policlorobifenili, diossine, DDT o idrocarburi aromatici; l'induzione delle metallotioneine, indicatore di stress specifico della presenza di metalli pesanti come Cd, Hg, Zn e l'inibizione dell'ALA-D come indicatore specifico della contaminazione da Pb.
- Si definiscono invece *biomarker generali* le risposte dell'organismo a livello molecolare, cellulare e fisiologico, che non possono essere direttamente ricondotte ad una sola classe di contaminanti, ma che rappresentano lo stato generale di stress dell'organismo. Ad esempio danni del DNA, disordini immunitari, indici somatici (sopravvivenza all'aria dei mitili, stabilità della membrana lisosomiale, accumulo di lipofuscine e determinazione dei lipidi neutri nelle ghiandole digestive dei mitili).

Le due famiglie di biomarker appena descritte si collocano in due diverse fasi dell'attività conoscitiva nell'ambito del biomonitoraggio.

1.3.2. Significato interpretativo e ruolo dei biomarker nei programmi di monitoraggio ambientale

Il segnale che si ricava, a seconda del livello strutturale interessato, è dato dalla diversa risposta temporale dell'organismo che, in linea generale, è precoce (ore, giorni) nel caso delle risposte molecolari e richiede tempi maggiori (settimane, mesi, anni) nel caso delle risposte cellulari e fisiologiche.

Esiste, quindi, una serie di fattori che devono essere presi in considerazione nello studio e nella classificazione dei biomarker rappresentati, oltre che dalla classe di contaminanti responsabili della risposta biologica e dall'applicazione come biomarker di esposizione o di effetto appena considerate, dal tempo di risposta dell'organismo e dal significato interpretativo del "segnale".

Dalle risposte a livello molecolare sino alle risposte a livello di popolazione si verifica un aumento del tempo di risposta (da minuti a mesi ad anni), un aumento dell'importanza ecologica ed un aumento della difficoltà di individuazione degli effetti (Fossi, 2000).

In condizioni naturali non ci troviamo di fronte ad una singola relazione dose-risposta, ma ad una “famiglia” di relazioni dosi-risposta, che corrispondono alle diverse interazioni della miscela di contaminanti unitamente alle variazioni dei fattori ambientali (Vighi and Bacci, 1998).

L'interpretazione dei dati sperimentali si basa su un paradigma concettuale, *the multiple-response concept*, secondo cui “attraverso i biomarker si ottiene la determinazione del livello di salute in cui la popolazione si trova, nel suo passaggio dallo stato di omeostasi a quello di malattia”(Depledge, 1989; Vighi and Bacci, 1998). In Fig. 2 è riportato il paradigma concettuale dell'interpretazione dei biomarker. La parte superiore riporta la “curva di salute” di un organismo esposto a concentrazioni crescenti di un composto tossico: vengono riportate le diverse fasi di deterioramento delle condizioni fisiologiche, dallo stato di salute a quello di malattia. Nella parte inferiore B1-B5 rappresentano una serie di biomarker misurabili nelle diverse fasi temporali dello stress biochimico-fisiologico che permettono di individuare la posizione dell'organismo a livello della “curva di salute”(Vighi and Bacci, 1998)

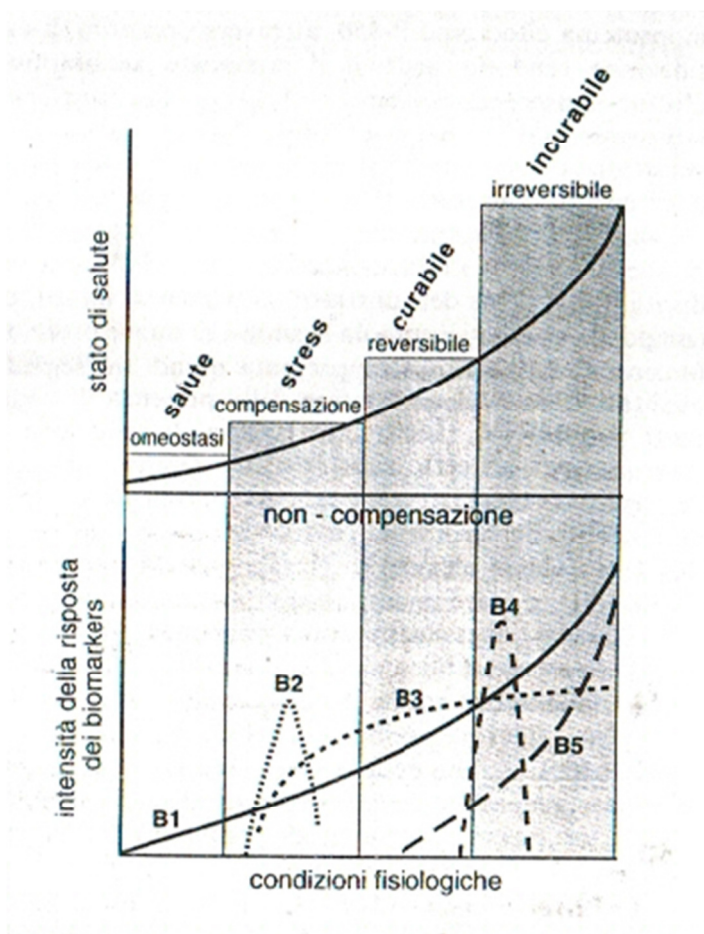


Figura 2. Paradigma concettuale dell'interpretazione dei biomarker. (da Vighi and Bacci, 1998).

Ciascuna delle risposte biochimiche e fisiologiche di un organismo sottoposto all'effetto di un tossico, ai diversi livelli di complessità strutturale, può essere definita come biomarker (NRC, 1989). Disponendo quindi di una serie di biomarker successivi, che permettono di individuare il livello in cui si trova l'individuo (omeostasi, risposte compensative, risposte di riparo, malattia) si può valutare il rischio cui la popolazione di provenienza è sottoposta fornendo quindi informazioni sia di tipo qualitativo che semi-quantitativo.

Al fine di individuare la posizione delle risposte dei biomarker a livello della "curva di salute" risulta in primo luogo essenziale la conoscenza dei livelli normali di ciascun biomarker misurato nelle diverse specie bioindicatrici. Sono essenziali la sensibilità e la riproducibilità delle metodiche adottate e la conoscenza dei "data-base" disponibili per ciascuna specie impiegata. Stabilito l'intervallo di variazione dei valori di riferimento, un individuo si trova in condizioni di salute quando la sua risposta cade entro un intervallo fiduciale al 95% ricavato dalla distribuzione dei valori di riferimento.

Un dato parametro può essere soggetto alla variabilità inter-individuale e può fornire talvolta risultati ambigui, causando sovrastime e sottostime degli effetti sulle biocenosi. Per una maggiore efficacia dei programmi di valutazione della qualità ambientale è necessario, quindi, l'impiego di una batteria di biomarker, che da un lato minimizzi gli effetti della variabilità biologica e dall'altro fornisca un dato confermato da più di un'indagine.

Gli individui "sani" all'interno della popolazione studiata sono quelli che hanno i valori di tutti i biomarker studiati nel range dell'intervallo dei valori dell'omeostasi.

I biomarker sono importanti strumenti di prognosi per indagare sul pericolo tossicologico di una comunità biologica: la valutazione dei cambiamenti a livello delle specie sensibili rappresenta un importante strumento per la stima della salute dell'intero ecosistema.

Il declino futuro di una popolazione può essere previsto impiegando i biomarker per valutare il rischio tossicologico per una o più specie sensibili.

1.3.3. Biomarker come strumenti diagnostici e prognostici di salute ambientale

L'approccio dei biomarker non fornisce una valutazione quantitativa dei livelli di esposizione di un organismo ad un dato inquinante, ma la determinazione del "livello di salute" della popolazione, come segnale potenziale di alterazioni ambientali.

L'impiego di tali strumenti nei programmi di biomonitoraggio comporta numerosi vantaggi:

- fornisce una risposta immediata dell'esposizione alla sostanza inquinante (ore-giorni) che può essere impiegata per prevedere effetti a lungo termine;
- offre una risposta integrata dell'insieme delle interazioni tossicologiche e farmacocinetiche della miscela di composti inquinanti ai quali è sottoposto l'organismo;
- fornisce una risposta integrata dell'esposizione complessiva della specie bioindicatrice ai composti tossici, considerando la sommatoria delle diverse vie di assunzione e delle esposizioni, nel tempo, entro un determinato ambito spaziale;
- fornisce indicazioni sulla suscettibilità inter- e intraspecifica ad un contaminante e/o ad una miscela di contaminanti;
- indica l'effetto ecologico a lungo termine di un contaminante a seconda che l'organismo sia esposto o meno ad un livello di contaminazione che eccede le sue capacità di detossificazione e riparo.

L'applicazione di tale approccio metodologico deve tenere conto, inoltre, dell'esistenza di fattori naturali che influiscono sullo stato fisiologico dell'organismo e quindi sono in grado di alterare in una certa maniera il segnale fornito dagli indici di stress. Questi fattori di disturbo, come lo stato ormonale, l'età e il sesso dell'organismo o fattori fisico-chimici come temperatura, salinità, ossigeno influenzano le risposte metaboliche dell'organismo, ad esempio possono influire su determinate reazioni enzimatiche (Fossi, 1991). Occorre, pertanto, una conoscenza approfondita dei cicli riproduttivi dell'organismo bioindicatore, delle sue caratteristiche fisiologiche e della variabilità naturale della risposta utilizzata come biomarker.

Ad esempio la distribuzione tissutale dei contaminanti negli organismi acquatici può essere influenzata dallo stato nutrizionale, dalla mancanza di cibo e dallo stress termico. I pesci e gli invertebrati acquatici sono pecilotermi, per cui il loro metabolismo dipende dalla temperatura ambientale e la tossicità, l'accumulo e il metabolismo degli inquinanti può essere influenzato da tale fattore.

Al contrario l'esposizione agli inquinanti può modificare la capacità di un organismo di tollerare le variabili ambientali naturali (ad esempio la concentrazione di ossigeno nell'acqua) (Casarett and Doull's, 2007).

Per lo svolgimento di una indagine ecotossicologica tramite l'utilizzo di biomarker è di importanza primaria la scelta a monte di un valido organismo bioindicatore.

1.4. ORGANISMO BIOINDICATORE

Le specie presenti in un dato sistema ambientale esprimono il risultato di processi adattativi. Una delle problematiche centrali della biologia e dell'ecologia è scoprire e verificare quali siano i legami tra la diversità biologica, l'evoluzione e la funzionalità degli ecosistemi.

Viene definito “organismo sentinella” o “biondicatore” ogni organismo vivente, animale o vegetale che, campionato in un determinato ambiente, sia in grado di fornire informazioni sul livello di contaminazione di quella determinata area. Bargagli definisce “bioindicatori” tutti quegli organismi (o parti di essi) che mediante reazioni identificabili (biochimiche, fisiologiche, morfologiche, corologiche) forniscono informazioni sulla qualità dell'ambiente (o di una parte di esso) e “bioaccumulatori” gli organismi in grado di assimilare dal suolo, dall'acqua o dall'atmosfera quantità misurabili di elementi chimici e/o di composti xenobiotici (Bargagli *et al.*, 1998).

La bioindicazione si basa su diverse scale di intervento: dalle variazioni di parametri biochimici, fisiologici e comportamentali, al bioaccumulo di contaminanti, sino alla presenza/ assenza delle specie.

L'organismo biondicatore funge da integratore dell'input tossicologico di una determinata area di studio, sia su scala spaziale che su scala temporale. Inoltre l'organismo presenta nei suoi tessuti livelli di contaminanti di diversi ordini di grandezza superiori rispetto al mezzo in cui si trova, il che permette di risolvere numerosi problemi di rilevabilità strumentale tipici delle matrici abiotiche.

Tale approccio permette pertanto, mediante una serie di risposte modulate e integrabili, una sorta di studio *in vivo* degli effetti dei contaminanti sull'ecosistema.

La scelta degli organismi bioindicatori permette valutazioni qualitative o semi-quantitative sugli effetti dell'inquinamento e dipende da diversi fattori, a partire dall'obiettivo dello studio.

In generale gli organismi biondicatori e bioaccumulatori devono possedere caratteristiche essenziali, quali:

- sensibilità agli inquinanti
- optimum ecologico ed ampia distribuzione nell'area di studio
- facile identificazione sistematica
- disponibilità di conoscenze adeguate su anatomia, fisiologia ed ecologia della specie;
- uniformità genetica;
- lungo ciclo vitale;
- scarsa mobilità e facile reperibilità in tutte le stagioni

- *home range* ben identificato.

Nella scelta del bioindicatore è necessario tenere presente una serie di caratteristiche relative alla sua fisiologia, al tipo di alimentazione, all'habitat, allo stile di vita, che insieme identificano la "nicchia trofica", ovvero l'insieme delle funzioni della specie nella comunità e delle interazioni con la componente biotica e abiotica (Bargagli *et al.*, 1998).

Nei sistemi naturali le specie tendono a differenziare le proprie nicchie determinando, nello stesso ambiente, differenti livelli e modalità di esposizione ai contaminanti. Nella formulazione di un programma di monitoraggio occorre, quindi, far seguire ad una prima fase finalizzata all'identificazione del "comparto ambientale critico" (nel quale risiedono o si accumulano i contaminanti), una seconda fase rivolta all'individuazione, nello stesso comparto, delle "nicchie ecologiche critiche" e delle specie corrispondenti.

L'informazione fornita dall'indicatore è relativa all'area vitale dove esso si muove e si alimenta (nicchia spaziale e trofica), per cui è necessario considerare caratteristiche relative alla mobilità e al tipo di assunzione.

Se le specie bioindicatrici sono in grado di rispondere agli stress ambientali in relazione all'estensione della loro nicchia spaziale e trofica, i bioindicatori possono essere considerati alla stregua di integratori di piccolo, medio e ampio raggio, a seconda che la nicchia interessi areali ristretti o estesi.

Di conseguenza, la scelta della scala dello strumento di bioindicazione sarà funzionale all'obiettivo dello studio.

Il complesso di organismi animali e vegetali che vivono nell'ambiente acquatico è indispensabile alla funzionalità dello stesso e dimostra un'evidente sensibilità al degrado dell'ecosistema acquatico ed alla conseguente diminuzione di qualità. Nella colonna d'acqua si verificano processi di decomposizione, di trasformazione che, in buona parte, sono mediati dagli organismi animali e vegetali che in esso vivono e che sono in grado di aumentare il turnover dei nutrienti e di intervenire attivamente sull'autodepurazione della colonna d'acqua, trasformandolo e rigenerandolo.

Lo sviluppo di indicatori basati su organismi marini che consentano di qualificare cambiamenti delle proprietà degli ecosistemi acquatici sta ricevendo notevole interesse. In tale ambito

l'approccio più innovativo è quello di considerare più gruppi funzionali e le complesse relazioni che tra essi intercorrono.

1.4.1. *Mytilus galloprovincialis* COME ORGANISMO SENTINELLA

Caratteristiche quali abbondanza e ampia distribuzione nelle aree costiere ed estuarine, tolleranza agli stress ambientali (variazioni di temperatura e di salinità), facile campionabilità, trasportabilità e maneggiabilità, adattamento alle condizioni di laboratorio, elevata sensibilità all'insulto chimico, oltre alla capacità di accumulare diverse classi di contaminanti e di attuare risposte adattative allo stress chimico misurabili ai fini del monitoraggio ambientale, fanno dei molluschi bivalvi, in particolare i mitili, validi "organismi sentinella" o "bioindicatori" nella valutazione dell'inquinamento chimico in ambiente acquatico, in grado di fornire un quadro integrato nel tempo della biodisponibilità degli inquinanti.

Sono infatti largamente impiegati nei programmi di monitoraggio Mussel Watch (Goldberg *et al.*, 1978), che prevedono l'integrazione delle analisi chimiche all'uso di biomarker molecolari, biochimiche e cellulari indotte dai contaminanti (Bocchetti e Regoli, 2006)

Alla base del loro impiego per la caratterizzazione e standardizzazione di risposte biologiche utilizzabili come biomarker di contaminazione chimica ambientale vi è inoltre il fatto che si prestano anche allo studio della variabilità naturale cui le proprie risposte possono andare incontro per cause biologiche o ambientali, indipendenti dalla presenza di contaminanti (Regoli, 2001).

1.4.1.1. I mitili nelle reti trofiche

I mitili sono organismi sessili e filtratori e svolgono un ruolo significativo sia come specie coinvolte nel monitoraggio ambientale che come risorsa alimentare.

Presentano una grande differenziazione in crescita e riproduzione, non solo tra specie diverse, ma anche all'interno della stessa specie, in particolare a livello stagionale alle latitudini temperate. La temperatura dell'acqua, la disponibilità alimentare e la combinazione dei fattori biotici e abiotici sono i principali fattori che ne influenzano la crescita.

I bivalvi sono onnivori, possono trarre nutrimento da sostanza organica disciolta, detrito, fitoplancton e, secondo quanto riportato da recenti studi (Wong *et al.*, 2003; Davenport *et al.*, 2000) esercitare un top-down-control e predare diversi tipi di organismi micro- e mesozooplanctonici (inclusi nanoflagellati eterotrofi, ciliati, rotiferi). Nello stomaco e nelle feci di *Mytilus galloprovincialis* sono stati osservati organismi sia planctonici che bentonici appartenenti alle

dinofitee, alle bacillariofitee, ai tintinnidi e alle fasi larvali di mollusco e crostacei (Lock *et al.*, 2010).

1.4.1.2. La specie *Mytilus galloprovincialis*

M. galloprovincialis Lamark (Molluschi, bivalvi) è un mollusco bivalve lamellibranco, dotato di branchie e lamelle, attraverso le quali respira e si nutre.

Il genere *Mytilus* risulta ampiamente distribuito nelle acque boreali e temperate dei due emisferi ed in particolare la specie *Mytilus galloprovincialis* è tipica del Mar Mediterraneo, sebbene si ritrovi anche sulle coste atlantiche sino alle coste della Manica occidentale. E' presente in altre aree geografiche, come USA Sud Africa, Giappone, Hong Kong, Corea e Unione Sovietica, dove è considerato un aggressivo organismo invasore (Hockey and van Erkom Schurink, 1992; Griffiths *et al.*, 1992) e per questo motivo è stato inserito nella lista delle 100 peggiori aliene invasive (Lowe *et al.*, 2000).

I mitili vivono in golfi e vicino alla costa in aggregati molto numerosi. Vivono attaccati alle superfici dure alle quali si fissano per mezzo di filamenti cheratinacei prodotti dalla cosiddetta ghiandola del bisso, i quali solidificano a contatto con l'acqua. *Mytilus galloprovincialis* viene allevato e solo in piccola parte è pescato su banchi naturali.

La suddivisione tassonomica è la seguente:

Phylum: *Mollusca* (Cuvier, 1797)

Classe: *Bivalvia* (Buonanni, 1681)

Sottoclasse: *Pteritomorpha* (Beulen, 1944)

Ordine: *Mytiloida* (Ferussac, 1822)

Superfamiglia: *Mytiloidea* (Rafinesque, 1815)

Famiglia: *Mytilidae* (Rafinesque, 1815)

Sottofamiglia: *Mytilinae* (Rafinesque, 1815)

Genere: *Mytilus* (Linneo, 1758)

Mytilus galloprovincialis è caratterizzato da una conchiglia allungata, divisa in due valve, appuntita da un lato e arrotondata dall'altro. Le valve sono formate prevalentemente da carbonato di calcio, appaiono esternamente di color nero-violaceo ed internamente di color viola-madreperlaceo e

presentano dei cerchi di crescita annuale e, a volte, delle bande di microcrescita dovute ai periodi di marea quotidiani.

Nell'area nord adriatica difficilmente la taglia massima supera i 9 cm (di norma sul mercato si attesta sui 6 cm), ma può raggiungere e superare la lunghezza di 11 cm.

Le valve sono unite dorsalmente da un legamento elastico stretto, allungato, di colore brunastro e la chiusura delle valve avviene per mezzo di due muscoli adduttori: uno posteriore, sistemato in prossimità della parte larga della conchiglia, l'altro collocato sul lato opposto, dove la conchiglia diviene stretta e termina a cono. La funzione principale della conchiglia è di proteggere il corpo molle del bivalve, che è composto dagli organi interni, o visceri, dal mantello e dal piede.

Il mantello presenta una colorazione che varia dal grigio giallastro al marrone, è costituito da due lobi che si inseriscono dorsalmente sulle due valve, rivestendole internamente ed avvolgendo, come una sorta di sacco, l'intero animale. I margini del mantello si saldano per un breve tratto nella regione posteriore in modo da delimitare un'apertura dorsale detta sifone esalante, dalla quale esce l'acqua in precedenza aspirata, ed una ventrale detta sifone inalante, che consente l'aspirazione dell'acqua marina.



Figura 3. *Esemplare di Mytilus galloprovincialis Lamark (sezione frontale, laterale, dettaglio dell'architettura interna).*

Il bordo presenta dei prolungamenti che, all'atto di apertura delle valve, si intrecciano costituendo una sorta di filtro per evitare che penetrino al suo interno particelle di grandi dimensioni. In condizioni normali un mitilo di medie dimensioni filtra all'incirca da 4 a 5 litri di acqua all'ora ed è

in grado di trattenere il 90% delle particelle contenute in essa, a patto che rientrino nella gamma delle dimensioni filtrabili.

L'alimentazione dei mitili è microfaga. Infatti, tali organismi sono in grado di captare in modo efficiente le particelle con diametro compreso tra 2 e 5 μm . Questa gamma di misure comprende un gran numero di batteri liberi (le cui dimensioni sono comprese tra 0,5 e 1 μm), particelle di argilla, organismi planctonici, larve e uova di un gran numero di specie, resti di organismi animali e vegetali.

Ogni individuo presenta due branchie. L'acqua inalata viene convogliata attraverso il battito delle ciglia lungo le branchie e sino alla bocca, dove i palpi labiali selezionano le particelle sospese nell'acqua: parte del particellato viene ingerita e fornisce, attraverso il processo digestivo, l'energia necessaria al metabolismo dell'individuo, parte viene avvolta in una matrice mucosa ed espulsa come pseudofeci senza entrare nell'apparato digerente. Il residuo non assimilato viene espulso attraverso l'apertura anale.

Le particelle alimentari ingerite vengono convogliate attraverso un breve esofago cigliato che sbocca nello stomaco. Quest'ultimo è circondato da una grande massa ghiandolare, la ghiandola digestiva o epatoprancreas, che a sua volta è formata da diverticoli digestivi consistenti in tubuli collegati con lo stomaco grazie ad un sistema di dotti ramificati parzialmente ciliati. L'epitelio del tubulo contiene due tipi cellulari, uno acidofilo e vacuolata e l'altro piramidale e basofilo, facilmente riconoscibili al microscopio ottico. Le cellule acidofile sono responsabili della digestione intracellulare di cibo (Bayne, 1976).

La corrente alimentare inalante è creata dal battito delle ciglia laterali delle branchie. Il ritmo del battito è di 2-5 pulsazioni al secondo, che possono arrivare sino a 20 pulsazioni in acque calde e povere di ossigeno.

Tra i lobi del mantello è situato il piede, disposto lateralmente in mezzo alle branchie e costituito da tessuto muscolare, molto estensibile e appuntito, a forma di lingua.

Il ciclo biologico di questa specie prevede sessi separati salvo rari casi di ermafroditismo. Gli individui di sesso femminile e maschile sono riconoscibili nel periodo di maturità sessuale per la colorazione del mantello, giallo-arancio nella femmina e bianco-giallastra nel maschio.

La fase riproduttiva è notevolmente influenzata dalla temperatura dell'acqua e può variare spazialmente tra aree caratterizzate da condizioni climatiche differenti. In generale la gametogenesi avviene nel tardo autunno e in inverno, mentre in primavera, in concomitanza con l'incremento

della temperatura si verifica il rilascio in acqua dei gameti. Successivamente riprende la gametogenesi con un secondo evento riproduttivo agli inizi dell'estate. Nel corso della tarda estate e dell'autunno si verifica un accumulo di riserve energetiche per la successiva gametogenesi (Cáceres-Martínez and Figueras, 1998).

La riproduzione avviene attraverso l'emissione in acqua dei gameti, sperma ed uova, ed in acqua che avviene la fecondazione. Le femmine producono un feromone che, spargendosi nell'acqua di mare, provoca l'eiaculazione nei maschi vicini. A sua volta, lo sperma eiaculato nell'acqua scatena in altre femmine la deposizione delle uova.

La prima fase di vita larvale è planctonica, cui segue quella bentonica con l'attecchimento al substrato duro per organismi di circa mezzo millimetro.

1.6. APPROCCIO ECOTOSSICOLOGICO INTEGRATO

Alla scienza ecologica è chiesto di comprendere il funzionamento ed l'organizzazione degli ecosistemi acquatici e di studiare le variazioni degli equilibri ecologici a lungo termine, in modo da poter identificare quelle componenti di struttura e di processo in grado di descriverne lo stato ecologico ed il cambiamento di stato conseguente alle pressioni derivanti dalle attività dell'uomo (o dall'attuazione delle misure di recupero).

Obiettivo del monitoraggio ecotossicologico è l'identificazione e la prevenzione degli effetti degli inquinanti sulla struttura, le funzioni e la dinamica di popolazioni e comunità potenzialmente in grado di compromettere la stabilità, la sostenibilità e la produttività degli ecosistemi.

Diversi fattori concorrono a rendere la valutazione degli effetti dei contaminanti sulle comunità naturali estremamente complessa (Mc Carthy *et al.*, 1990):

- gli inquinanti presentano una diversa biodisponibilità a seconda dei comparti in cui sono localizzati;
- le concentrazioni degli inquinanti in atmosfera sono molto variabili nello spazio e nel tempo, il che implica studi condotti su base statistica, per lunghi periodi (Nimis, 2001);
- gli organismi sono generalmente esposti ad una miscela di sostanze che possono generare interazioni biochimiche e tossicologiche di vario tipo (sinergie, antagonismi);
- esistono diverse possibili vie di assunzione nell'organismo, anche in funzione dei diversi ecosistemi (acquatici o terrestri);
- esiste un periodo di latenza prima che si manifestino alterazioni a livello di popolazioni e comunità.

Rispondere alle necessità di percezione, protezione e prevenzione della contaminazione degli ambienti marino-costieri richiede un approccio integrato al monitoraggio ecotossicologico, basato sull'impiego di strumenti in grado di indagare risposte ai diversi livelli della gerarchica biologica (Fig. 4).

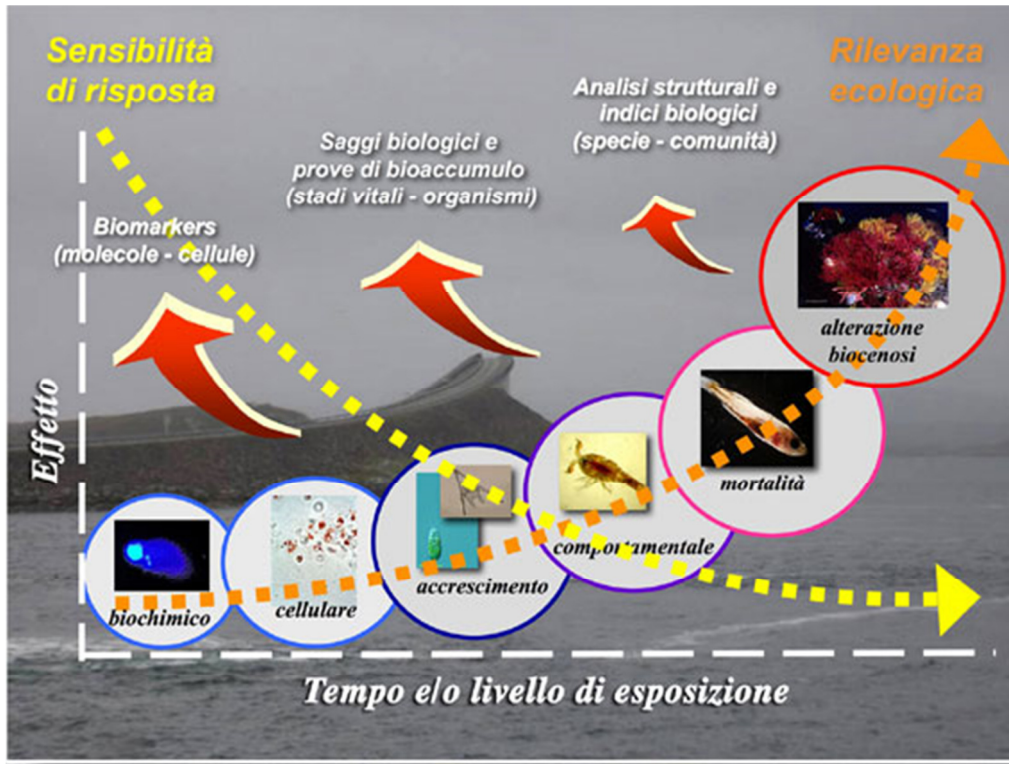


Figura 4. Sensibilità di risposta e rilevanza ecologica degli strumenti d'indagine ai diversi livelli di organizzazione biologica (da ISPRA, 2011).

1.7. SCOPO DELLA RICERCA

Gli ecosistemi marino-costieri giocano un ruolo cruciale nel funzionamento di processi ecologici, nella conservazione della biodiversità e nella mitigazione dell'inquinamento. Per l'importanza che storicamente assumono per la pesca, il turismo e per la presenza di zone portuali e insediamenti industriali nel sito e nell'indotto sono particolarmente sottoposti all'impatto delle attività antropiche con il conseguente input di inquinanti di varia natura.

Tali caratteristiche rendono necessaria, ai fini della valutazione dello stato di salute e dell'adozione di programmi di tutela e conservazione della biodiversità degli ecosistemi marino-costieri, la definizione di strategie di monitoraggio integrate in grado di indagare i processi nella colonna d'acqua e nei sedimenti, la loro evoluzione e le possibili risposte a fattori antropici.

Obiettivo del presente lavoro è la definizione di una batteria di bioassay *in vivo* e *in vitro* integrata allo studio di biomarker in organismi bioindicatori, quale strumento da utilizzare in un approccio ecotossicologico integrato per il biomonitoraggio di ambienti marino-costieri, in grado di fornire informazioni sull'effettiva disponibilità dei contaminanti e sui reali impatti di questi sulle comunità biologiche.

Tale strumento d'indagine si propone di fornire informazioni dirette sulla contaminazione chimica dell'ambiente marino-costiero oggetto di monitoraggio e informare in maniera precoce dell'avvenuta esposizione ad inquinanti, permettendo interventi a breve termine e la messa a punto di adeguati programmi di gestione sostenibile dell'ambiente.

I bioassay rappresentano un valido strumento in grado di fornire una misura diretta degli effetti avversi di una sostanza inquinante sull'ambiente.

L'impiego dell'approccio dei biomarker nel monitoraggio ambientale consente di diagnosticare, attraverso lo studio di risposte immediate, i livelli semi-quantitativi di esposizione e, in funzione dell'intercorrelabilità degli effetti ai vari livelli di complessità strutturale, di prognosticare e quindi prevedere il verificarsi di effetti negativi anche su scala ecologica. I biomarker offrono una risposta integrata dell'insieme delle interazioni tossicologiche e farmacocinetiche della miscela di composti inquinanti e dell'esposizione complessiva della specie bioindicatrice ai composti tossici, considerando la sommatoria delle diverse vie di assunzione e delle esposizioni, nel tempo, entro un

determinato ambito spaziale e forniscono indicazioni sulla suscettibilità inter- e intra-specifica ad un contaminante e/o ad una miscela di contaminanti. Lo studio integrato di molteplici effetti dello stress chimico nello stesso organismo sentinella consente di definire il reale impatto dei contaminanti sulla sua biologia riducendo al minimo la possibilità di interpretazioni equivocate di alcune sue risposte.

L'impiego di organismi esposti *in situ* consente di integrare nel tempo (per il periodo coperto dall'esposizione) gli effetti della presenza di eventuali sostanze tossiche e delle loro interazioni con altri fattori ambientali di stress. Tra gli organismi marini i molluschi bivalvi, in particolare i mitili, per via dello stile di vita da filtratori sessili, associato all'elevato fattore di bioaccumulo per i contaminanti organici e inorganici e ai bassi livelli di detossificazione metabolica, sono largamente impiegati come organismi sentinella nei programmi di monitoraggio e valutazione dell'ambiente marino.

Lo studio è stato articolato in due fasi:

- una prima fase volta all'identificazione e validazione di una batteria di saggi ecotossicologici, comprendente saggi *in vivo* e *in vitro*, che consenta di effettuare un rapido screening del livello di contaminazione chimica dei sedimenti marino-costieri
- una seconda fase di studio finalizzata allo sviluppo e alla validazione di nuovi biomarker citologici e molecolari di stress chimico in un approccio multimarker basato sull'impiego dell'organismo bioindicatore *Mytilus galloprovincialis*.

Le attività di ricerca sono state condotte presso il Laboratorio di Fisiologia e Biochimica Ambientale di Ravenna del Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali dell'Università di Bologna.

Una parte delle attività sperimentali svolte nel presente lavoro di tesi è stata condotta in collaborazione con il Laboratorio di Fisiologia Ambientale dell'Università del Salento e si inserisce nell'ambito delle attività scientifiche del Progetto PRIN 2010-2011- La "System Biology" nello studio degli effetti di xenobiotici in organismi marini per la valutazione dello stato di salute dell'ambiente: applicazioni biotecnologiche per potenziali strategie di ripristino (Coordinamento: Università di Messina) di cui l'Università del Salento è partner.

1.8. I FASE

In considerazione del ruolo svolto dai sedimenti marini quale luogo di raccolta e sorgente della maggior parte del carico inquinante in ogni ecosistema acquatico (Burgess and Scott, 1992), obiettivo della prima fase dello studio è stato proporre una batteria di saggi, applicabile al monitoraggio di routine, in grado di discriminare tra diversi livelli di contaminazione dei sedimenti marino-costieri e identificarne la capacità di cessione dei contaminanti associati.

Poiché un singolo organismo o modello test non è in grado di rappresentare la complessa varietà di risposte agli stressori né di garantire risultati attendibili per tutte le possibili tipologie di matrici, la valutazione ecotossicologica della qualità dei sedimenti necessita dell'utilizzo di batterie di saggi che impieghino organismi in grado di riflettere differenti vie di esposizione, in maniera da poter valutare tanto la tossicità esercitata dai contaminanti in soluzione quanto quella espressa dai contaminanti legati (Davoren *et al.*, 2005).

L'attenzione è stata rivolta ai saggi di tossicità acuta, che descrivono gli effetti avversi osservati in seguito ad esposizioni di breve durata con l'obiettivo di definire la tossicità intrinseca della matrice, valutare le specie suscettibili e fornire informazioni per la selezione dei livelli di dose per gli studi più prolungati.

La batteria ha previsto l'impiego di due tipologie di saggio, bioassay *in vivo* e i bioassay *in vitro*. I saggi *in vivo* consentono di valutare la biodisponibilità e le tossicocinetiche degli inquinanti, mentre gli *endpoint* saggiati, fornendo informazioni sulla performance e la fitness degli organismi test, presentano un'elevata rilevanza ecologica nel predire effetti a livello di popolazione. I saggi *in vitro* sono in grado di rispondere in maniera sensibile e specifica a contaminanti con meccanismi d'azione specifici e ben caratterizzati. Da qui la necessità di integrare nella batteria di saggi le informazioni complementari fornite dalle due linee di studio nella valutazione della tossicità dei sedimenti marini.

La valutazione delle tossicità associate a differenti *endpoints* incrementa il valore predittivo dei saggi impiegati in una batteria e permette di offrire un quadro il più possibile affidabile e completo della matrice indagata (Bierkens *et al.*, 1998): la batteria ha indagato risposte biochimiche e di sopravvivenza.

Un aspetto critico del monitoraggio degli ecosistemi marino-costieri è rappresentato dalla risospensione dei sedimenti contaminati, il cui impatto a livello ecologico è ancora poco noto.

La batteria selezionata si propone di saggiare la tossicità associata all'elutriato di sedimento, ovvero l'acqua e la porzione solubile dei sedimenti. L'impiego di elutriati fornisce informazioni sulla capacità di cessione dei contaminanti associati ai sedimenti e permette di ottenere informazioni sui potenziali effetti avversi della perturbazione e risospensione dei sedimenti sugli organismi della colonna d'acqua (Cheung *et al.*, 1997). Permette, inoltre, di simulare i processi di ambienti anossici e gli effetti delle attività di dragaggio. Tali caratteristiche, unite alla sensibilità dose-risposta, all'applicabilità ad ogni tipo di sedimento e al fatto che le frazioni solubili sono facilmente ottenibili con un metodo di elutriazione relativamente standardizzato, candidano l'elutriato come matrice test impiegabile in esami preliminari rapidi per applicazioni di routine.

E' stata inoltre saggiata la tossicità associata alla matrice sedimento intero, definito come il sedimento insieme all'acqua interstiziale che ha subito una manipolazione minima dopo il campionamento, potenzialmente in grado di offrire informazioni complementari.

La batteria proposta si compone di un saggio di inibizione della bioluminescenza con il batterio marino *Vibrio fischeri* condotto sulle matrice sedimento intero ed elutriato di sedimento e di un saggio di mortalità con il rotifero *Brachionus plicatilis* su elutriato di sedimento. La batteria è stata integrata con un bioassay *in vitro*, recentemente brevettato presso il Laboratorio di Fisiologia generale ed Ambientale dell'Università del Salento (brevetto n. MI2008A008813) basato sull'inibizione dell'attività dell'enzima anidraasi carbonica estratta da eritrociti bovini. Il bioassay è stato saggiato su elutriato di sedimento.

1.8. BATTERIA DI BIOASSAY *in vivo* e *in vitro*

1.8.1. SAGGIO DI TOSSICITA' ACUTA CON BATTERI BIOLUMINESCENTI: DETERMINAZIONE DELL'INIBIZIONE DELLA BIOLUMINESCENZA EMESSA DA *Vibrio fischeri*

1.8.1.1. Cenni di biologia ed ecologia della specie-test

I batteri rappresentano una componente essenziale di tutte le reti trofiche, sia in termini quantitativi per l'elevata biomassa, che per il ruolo di decompositori e la capacità di rendere nuovamente disponibili gli elementi biogeochimici, favorendo la loro ciclizzazione.

Vibrio fischeri è un batterio marino Gram-negativo eterotrofo appartenente alla famiglia delle Vibrionacee. E' cosmopolita, ma con maggior diffusione nelle fasce temperate e subtropicali. E' stato isolato nelle acque di mare, nelle pareti e nei contenuti intestinali di animali marini. Presenta

un ampio range di tolleranza alla salinità. In natura è presente allo stato planctonico, vive sulla superficie delle particelle sospese ed è noto come simbionte di pesci e seppie luminescenti. Colonizza organi specializzati nell'animale ospite (*Euprymna scolopes*, *Anomalops katoptron*, *Photoblepharon*) che usa la luminescenza di *Vibrio fischeri* come esca per le prede o come camuffamento dalla luce lunare. L'emissione di luce viene attivata quando il batterio entra in simbiosi con l'ospite (ad esempio la seppia *Euprymna scolopes*), le forme libere non presentano invece bioluminescenza. La funzione biochimica da cui deriva la bioluminescenza è guidata dal sistema enzimatico luciferina-transferasi, il cui funzionamento deriva dalla regolazione dell'espressione del cluster di geni denominato Lux-Operon.

1.8.1.2. Principio del metodo di saggio

Il test di tossicità acuta consente di valutare il grado di tossicità della sostanza da saggiare o di campioni naturali di acqua o sedimento utilizzando come risposta l'eventuale inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dai batteri marini della specie *Vibrio fischeri*. L'emissione di luce è il risultato di una via metabolica legata alla respirazione cellulare, per cui l'alterazione del normale metabolismo risulta in un rapido decremento della luminosità prodotta.

Rilevanza ecologica, sensibilità, potere discriminatorio, riproducibilità, standardizzazione, semplicità di utilizzo, nonché costi relativamente contenuti ne fanno uno dei saggi di tossicità acuta più diffusi a livello internazionale nel monitoraggio ambientale.

Sviluppato inizialmente per saggiare la tossicità acuta di campioni di acque naturali e di scarico e di estratti (Bulich, 1979), il test è applicabile a matrici liquide e solide per la valutazione della tossicità di composti puri, di matrici naturali solide (fanghi, suoli, sedimenti) o matrici liquide estratte (estratti organici o salini); per lo studio della tossicità delle sostanze rilasciate dalla degradazione dei materiali; per il controllo dell'efficacia di azioni di bonifica di suoli o sedimenti; per il monitoraggio di acque superficiali; per il controllo della qualità delle acque reflue di impianti di depurazione.

A livello internazionale è ampiamente utilizzato per la valutazione della qualità di sedimenti marini in aree costiere; in ambito nazionale nel D. Lgs. 152/99 è stato introdotto l'utilizzo del batterio tra le analisi supplementari non obbligatorie riportate in Allegato 3, mentre nelle linee guida recentemente pubblicate dall'ISPRA (2011) è indicato tra i saggi consigliati nel monitoraggio della qualità degli ambienti marino-costieri. Uno studio di Pastorok and Becker (1990) ha evidenziato come rappresenti uno dei saggi più sensibili ai fini della valutazione dei sedimenti marini contaminati.

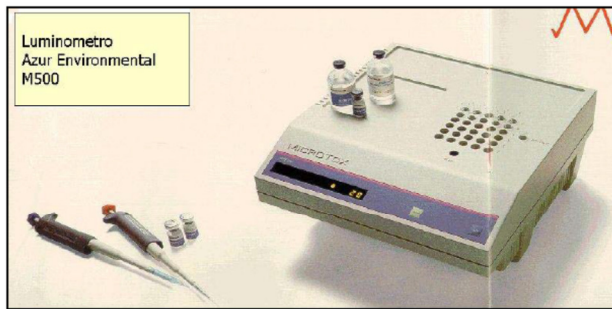


Figura 5. Luminometro M500 (foto Azur Environmental)

1.8.1.3. SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA BIOLUMINESCENZA SU ELUTRIATO DI SEDIMENTI

Il metodo può essere utilizzato per valutare gli effetti tossici acuti di campioni di scarichi afferenti in acque dolci, salmastre, marine o a salinità superiore a quella di mare, di campioni di acqua superficiale dolce, salmastra, marina o a salinità superiore a quella di mare, di eluati di fanghi, sedimenti o altri campioni solidi, di estratti di sedimenti e di sostanze chimicamente definite.

1.8.1.4. SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA BIOLUMINESCENZA SU SEDIMENTO INTERO

Nel 1990, Brouwer *et al.* (1990) e Tung *et al.* (1990) hanno proposto separatamente un protocollo che prevedeva il contatto tra i batteri e la fase solida. Oggi, questo protocollo, modificato dalla Microbics Corporation (1992) e Bulich *et al.* (1992) per migliorare la rappresentatività del campione e la precisione del saggio e denominato Microtox[®] Solid Phase test (SPT), viene proposto dalla Azur Environmental come standard per saggiare campioni solidi.

Il saggio Microtox[®] in fase solida è raccomandato come strumento di screening per matrici test quali suoli, fanghi e sedimenti (Ringwood *et al.*, 1997) ed è uno dei test ecotossicologici standardizzati più diffusi a livello internazionale per la valutazione della tossicità dei sedimenti.

Possiede il grande vantaggio di misurare la tossicità dell'intero sedimento e non di frazioni o estratti di esso (Brouwer *et al.*, 1990) ed è semplice, rapido e riproducibile (Stronkhorst *et al.*, 2004; Doe *et al.*, 2005). Nel saggio i batteri luminescenti possono entrare in contatto sia con le sostanze tossiche presenti sulla superficie delle particelle di sedimento sia con i tossici sospesi in acqua.

1.8.2. SAGGIO DI MORTALITA' CON *Brachionus plicatilis* SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO

1.8.2.1. Cenni ed ecologia della specie

I rotiferi della specie *Brachionus plicatilis* (O.F. Muller, 1786 – Brachionidae, classe Rotatoria) sono organismi cosmopoliti, ad ampia distribuzione geografica e sempre ben rappresentati da specie autoctone (esistendo in ben nove varietà). In particolare un ceppo riprodotto e stabulato in vari laboratori di ricerca europei ha origine dalle saline del mare di Azov.

La specie è euriterma ed eurialina (Fengqi, 1996), con un *optimum* di temperatura compreso tra i 10°C ed i 35°C ed una resistenza estrema alle variazioni di salinità (5-35 PSU) (Persoone *et al.*, 1989).

B. plicatilis è una specie chiave nei rapporti trofici della rete alimentare marino-costiera ed estuarina, si affianca allo zooplancton di dimensioni maggiori in qualità di consumatore primario di fitoplancton ed è alimento di base per numerosi consumatori secondari (Henrouth, 1983).

Dal punto di vista morfologico gli individui hanno generalmente una dimensione inferiore ad 1 mm (tra i 70 e i 700 µm), anche se si possono distinguere due gruppi, definiti tipo 'S-' (small) e 'L-' (large) (Snell and Carrillo, 1984).

Il ciclo vitale è breve: in condizioni ottimali la crescita da uovo ad adulto avviene in 2-5 giorni. In riproduzione il rotifero sviluppa sacche ovigere ben visibili, che consentono di valutare il tasso di rinnovamento della popolazione, condizionato dalla temperatura dell'acqua (inquinamento fisico), dall'abbondanza di cibo (effetto indiretto del degrado dell'habitat) oltre che dall'effetto diretto della presenza di composti tossici. La riproduzione avviene principalmente per via partenogenetica, il che permette l'osservazione degli effetti anche in caso di popolazioni ridotte.

I primi stadi embrionali possono bloccare il loro sviluppo e rinchiudersi in un involucro protettivo; le cisti possono rimanere dormienti per alcuni anni prima di schiudere.

La specie è di facile allevamento ed è utilizzata soprattutto per l'alimentazione dei primi stadi larvali di diverse specie ittiche in impianti di acquacoltura.

Normalmente *B. plicatilis* viene utilizzato nella caratterizzazione eco tossicologica di reflui caratterizzati da concentrazioni di sali elevate o matrici provenienti da acque di transizione (Francese and Traldi, 2001), ma può essere ben utilizzata per aree sulle quali insistono forti pressioni antropiche (Francese and Traldi 2003).

Il saggio si applicherebbe bene ad un comparto speciale costituito dal particolato sospeso, laddove un organismo sospensivoro decompositore come il rotifero è in grado di aggredire alla ricerca di alimento granuli di modeste dimensioni e venire a contatto con eventuali contaminanti ivi complessati.

1.8.2.2. Principio del metodo di saggio

Il test di tossicità acuta prevede la valutazione, quale *endpoint*, della mortalità o “incapacità natatoria” di un numero fisso di neonati di *Brachionus plicatilis* esposti per 24 ore + 24 ore alla matrice da saggiare in condizioni controllate di laboratorio. La norma ASTM E 1440 (1991 rev. 1998) considera come lettura di controllo quella alle 24 ore e come lettura definitiva quella a 48 ore, prossima al 70% del ciclo vitale. La tossicità viene quindi espressa in termini di percentuale di mortalità

1.8.3. SAGGIO DI INIBIZIONE DELL'ATTIVITA' DELL'ENZIMA ANIDRASI CARBONICA SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO

Il bioassay *in vitro*, recentemente brevettato presso il Laboratorio di Fisiologia generale ed Ambientale dell'Università del Salento (brevetto n. MI2008A008813), si basa sull'impiego dell'isoenzima II dell'enzima anidraasi carbonica estratta da eritrociti bovini.

1.8.3.1. Anidraasi carbonica: caratteristiche generali

L'anidraasi carbonica rappresenta un metallo-enzima ubiquitario che catalizzano la reazione di idratazione reversibile dell'anidride carbonica per produrre H^+ e HCO_3^- : secondo la reazione di seguito riportata:



Tale enzima è presente in batteri, piante, alghe e animali nei tessuti coinvolti nel rapido scambio di CO_2 e HCO_3^- .

La prima anidraasi carbonica fu purificata nel 1933 in eritrociti umani (Meldrum and Roughton, 1933) e ad oggi sono state caratterizzate diverse sue isoforme in mammiferi, piante e procarioti, classificate e raggruppate differentemente a seconda della loro origine filogenetica.

Al momento sono state caratterizzate cinque famiglie di anidraasi carbonica, denominate rispettivamente α -, β -, γ -CA, δ , and ζ -CAs (Hewett-Emmett and Tashian, 1991; Supuran, 2010). La famiglia α è presente nei vertebrati, in batteri, alghe e piante; la famiglia β è presente

prevalentemente in batteri, alghe e piante; la famiglia γ è presente principalmente in alcune specie di batteri e negli archeobatteri; le famiglie δ ed ζ sono state identificate in alcune diatomee marine. (Supuran, 2010).

Per quanto riguarda la famiglia α , presente nei vertebrati, sino ad oggi sono state caratterizzate 16 diverse forme isoenzimatiche (CA I-XIV).

L'anidrasi carbonica è un enzima multifunzionale, gioca un ruolo chiave in processi fisiologici quali respirazione, trasporto ionico, regolazione acido-base, urogenesi, sintesi di acidi grassi, trasporto ionico, contrazione muscolare, deposizione di sali di carbonato di calcio per la formazione della conchiglia dei molluschi e fotosintesi delle piante.

1.8.3.2. Struttura

Poiché il confronto delle sequenze e delle strutture dimostra che le isoforme di mammiferi e di piante si sono evolute indipendentemente, i due gruppi di isoenzimi sono stati inseriti in due classi distinte, α e β . Un'ulteriore classe, la classe γ , evolutasi indipendentemente e per la quale analisi filogenetiche indicano un'origine remota (Smith *et al.*, 1999) è stata riportata nel 1994 (Alber and Ferry, 1994).

Le tre classi non mostrano significative identità di sequenza e i propri avvolgimenti complessivi sottolineano la loro origine indipendente (Liljas and Lauberg, 2000). Nonostante le grosse differenze strutturali, i siti attivi delle tre classi funzionano grazie ad un singolo atomo di zinco essenziale (Lindskog, 1997; Christianson and Cox, 1999).

La struttura cristallina delle anidrasi carboniche di classe β è stata riportata per la prima volta nel 2000 (Mitsuhashi *et al.*, 2000). Sebbene inizialmente si pensasse che fosse composta da isoforme di AC presenti esclusivamente nei vegetali, di recente sono state isolate diverse isoforme di classe β appartenenti ad alghe (Hiltonen *et al.*, 1995; Eriksson *et al.*, 1996) e a batteri ed archeobatteri (Smith *et al.*, 1999).

La caratterizzazione degli enzimi di classe β ha rivelato caratteri di distinzione rispetto alle altre due classi. Mentre le classi α e γ sono costituite rispettivamente da enzimi monomerici e trimerici, la classe β risulta formata da isoenzimi che sono dimeri, tetrameri, esameri ed ottameri, il che suggerisce che un dimero sia l'elemento costitutivo di base (Kimber and Pai, 2000). Inoltre il confronto delle strutture cristalline ha evidenziato differenze nella struttura secondaria: nelle isoforme di classe β l'atomo di zinco è legato da due cisteine conservate e da un'istidina conservata, mentre nelle isoenzimi di classe α è legato da tre istidine.

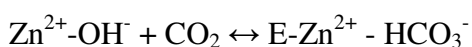
Si ritiene che la classe γ si sia evoluta circa 3-4,5 bilioni di anni fa (Smith *et al.*, 1999) e pertanto precede la comparsa della classe α che risale a 200-300 milioni di anni fa. L'unico enzima di classe γ caratterizzato è "Cam" isolato nell'archebatterio *Methanosarcina thermofila* (Alber and Ferry, 1994). Infine è da considerare che sino ad oggi potrebbe essere stata indagata solo la parte più superficiale della diversità delle anidrasi carboniche. Infatti, la recente purificazione di una AC monomeric (TWCA1) isolata nella diatomea marina *Thalassiosira weissflogii* (Robert *et al.*, 1997), la quale non mostrerebbe identità significative di sequenza rispetto alle sequenze geniche delle altre tre classi, ha portato Tripp *et al.* nel 2001 a proporre l'esistenza di una quarta classe di AC (la classe δ). Infine una quinta classe, ζ , è stata identificata in altre diatomee marine. Ciò suggerisce che l'anidra carbonica possa rivestire un ruolo molto più ampio rispetto a quello sino ad oggi ipotizzato.

L'enzima contiene, all'interno del suo sito attivo, un atomo di zinco coordinato con tre istidine e una molecola di acqua a formare un complesso tetraedrico. A pH fisiologico il quarto ligando dello zinco è un idrossile. Gli atomi di azoto di tre istidine (numerate 94, 96 e 119) legano direttamente lo zinco. Atomi della treonina 199 e del glutammato 106 interagiscono indirettamente attraverso una molecola di acqua legata. Questi residui oltre all'istidina 64 aiutano a portare sullo zinco uno ione idrossido (Dutta and Goodsell, 2004).

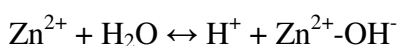
1.8.3.3. Cinetica

Studi cinetici indicano che le tre classi impiegano un meccanismo di reazione comune che si realizza in due fasi.

La prima fase consiste nell'attacco nucleofilo alla CO_2 da parte di uno ione ossidrile legato allo zinco.



La seconda fase consiste nella rigenerazione del sito attivo mediante la ionizzazione della molecola d'acqua legata allo zinco e la rimozione di un protone dal sito attivo. Tale passaggio determina la velocità di reazione (Papamichael *et al.*, 2002).



La velocità di reazione è influenzata sia dalla temperatura (aumenta 17-30 volte da 0°C a 28°C) sia dal pH. L'enzima è relativamente stabile e opera in un intervallo di pH che va da 6 a 10, ma presenta la massima attività a pH 8.

1.8.3.4. Inibizione dell'attività dell'enzima Anidraasi Carbonica

Una serie di sostanze sono in grado di inibire l'attività dell'enzima interagendo con il sito catalitico.

Le sulfonammidi e gli inibitori anionici dell'AC esercitano la loro inibizione non competitiva in quanto si legano allo Zn^{2+} sostituendo la molecola di solvente, impedendo così all'enzima di esercitare la sua funzione catalitica (Kannan *et al.*, 1977).

Nello studio e nella differenziazione delle forme isoenzimatiche è risultata estremamente vantaggiosa l'utilizzazione di inibitori dell'attività dell'enzima.

E' possibile effettuare una prima classificazione degli inibitori dell'AC distinguendo "inibitori inorganici" e "inibitori organici".

Gli "inibitori inorganici" sono sostanze di basso peso molecolare, anioniche o cationiche, che esercitano la loro azione sull'attività enzimatica in maniera meno efficace rispetto agli inibitori organici. Tra gli inibitori inorganici sono compresi gli alogeni Cl^- , I^- , Br^- , il cianuro (CN^-) e il solfuro (S^{2-}). Probabilmente, l'inibizione da parte di questi anioni è dovuta alla loro interazione con il sito attivo della forma non protonata dell'enzima, che ostacola il legame della CO_2 .

Gli "inibitori organici" dell'AC sono compresi tra le sulfonammidi aromatiche caratterizzate da una struttura $R-SO_2-NH_2$, dove R- è un residuo aromatico o eteroaromatico (Maren, 1987; Arslan, 2001). La reazione di inibizione è reversibile, non competitiva e fortemente specifica.

E' possibile notare come, quando lo Zn^{2+} sia assente o sostituito con ioni metallici diversi dal cobalto, l'attività dell'enzima non venga più inibita (Lindskog, 1963) e come le sulfonammidi non formino chelati forti con lo Zn^{2+} , il che permette di affermare che tali inibitori agiscono su un sito molto vicino allo ione metallico. Probabilmente tale sito corrisponde a quello determinato, mediante cristallografia ai raggi X, ad una distanza di circa 5Å dallo stesso ione.

Tra gli inibitori organici si annoverano l'acetazolamide, la benzenesulfonammide, la sulfanilammide e molte sulfonammidi sostituite (sulfonammidi alifatiche, eterocicliche, disulfonammidi saluretiche, etc.).

Il bioassay si basa sulla misura del grado di inibizione dell'attività dell'enzima anidraasi carbonica quando sia posto a contatto con matrici acquose ambientali quali acque interstiziali, acque reflue, percolati, elutriati di matrici solide come sedimento e terreni, rivelandone il grado di tossicità.

L'entità dell'inibizione enzimatica risulta proporzionale al grado di tossicità del campione.

1.8.3.5. Principio del metodo di saggio

Il test di inibizione di anidraasi carbonica consiste nella misura elettrometrica del decadimento del pH di una miscela di reazione contenente l'enzima e il substrato, CO₂. Una prova di controllo effettuata in assenza della matrice o sostanza da saggiare consente di confrontare l'attività dell'enzima in assenza e in presenza del contaminante.

I vantaggi offerti dal metodo risiedono nella sensibilità, semplicità e rapidità di esecuzione, nella possibilità di limitare i costi e i tempi di analisi ed evitare l'utilizzo di organismi vivi.

1.9. II FASE

La seconda fase del lavoro ha avuto per oggetto lo sviluppo di un approccio basato sulla bioindicazione e sull'impiego di risposte fisiologiche degli organismi, in grado di fornire un segnale precoce di esposizione a contaminanti in ambiente marino-costiero.

La comparazione tra le risposte osservate in organismi bioindicatori traslocati *in situ* in un'area a sospetta contaminazione chimica e le risposte osservate in gruppi di controllo traslocati in un sito di riferimento rende possibile la valutazione del potenziale rischio di esposizione delle comunità nell'area oggetto di studio.

In questi anni ha ricevuto un notevole impulso l'impiego di risposte biochimiche e cellulari indotte dall'esposizione a contaminanti chimici ambientali quali strumenti in grado di rivelare alterazioni a stadi precoci della risposta, prima che il danno cellulare integrato si manifesti a livello di organo o di processi fisiologici dell'intero animale.

Gli effetti avversi esercitati a bassi livelli di organizzazione biologica vengono definiti "early adverse effects" e possono rappresentare il primo campanello di allarme di situazioni a rischio ambientale.

Per una maggiore efficacia dell'impiego dei biomarker nella valutazione della qualità ambientale è necessario un approccio *multimarker* che minimizzi gli effetti della variabilità biologica degli organismi scongiurando sovrastime e sottostime degli effetti sulle biocenosi. Un altro importante aspetto è poi l'impiego, nell'ambito della batteria, di biomarker con differenti gradi di specificità

La batteria di biomarker individuata si propone di indagare il potenziale applicativo in campo di biomarker innovativi rappresentati da alterazioni morfometriche dei granulociti, attivazione lisosomiale e induzione dell'enzima anidrasi carbonica nei tessuti ghiandola digestiva, mantello e branchie, parallelamente a biomarker standardizzati quali concentrazione di metallotioneine in ghiandola digestiva e frequenza dei micronuclei in emociti.

1.9.1. BATTERIA DI BIOMARKER

La batteria ha previsto l'indagine in emociti dell'organismo bioindicatore *M.galloprovincialis* delle alterazioni morfometriche dei granulociti e della comparsa di micronuclei quali indicatori rispettivamente di danno cellulare e di danno genotossico.

1.9.1. Emociti di molluschi bivalvi

Come riportato da diversi autori gli emociti rappresentano uno dei primi target di azione tossica nei molluschi marini (Galloway *et al.*, 2001; Nigro *et al.*, 2006).

I bivalvi sono caratterizzati da un sistema vascolare aperto: i vasi principali che si dipartono dal cuore riversano il liquido circolante, l'emolinfa, in una grande cavità, l'emocele, che costituisce circa il 30% del volume corporeo totale.

L'emolinfa di mitilo, priva di pigmenti respiratori, è dotata di cellule circolanti dette emociti. Gli elementi cellulari dell'emolinfa sono coinvolti in diversi aspetti della fisiologia dell'organismo quali digestione e trasporto dei nutrienti, formazione e riparazione della conchiglia, secrezione, riparazione delle ferite (Cheng, 1981; Cheng, 1984) e svolgono un'importante ruolo nei meccanismi di difesa dell'organismo.

L'attività fagocitaria di tali cellule nei confronti di batteri, porzioni di cellule o intere cellule dell'organismo stesso (Bubel *et al.*, 1977) rappresenta la principale linea di difesa contro tutto ciò che viene riconosciuto come estraneo all'organismo (Bayne, 1990).

Nei molluschi bivalvi gli emociti si differenziano, in base alle specifiche caratteristiche morfologiche, in due tipi cellulari: agranulociti (o ialinociti) e granulociti (Cheng, 1981, Cajaraville *et al.*, 1994, Auffrett, 1988; Cheng 1984, Rasmussen *et al.*, 1985).

Gli **ialinociti** (Fig. 6) sono cellule di piccole dimensioni, dotate di proiezioni pseudopodiali sottili e lunghe. Contengono un ampio nucleo, scarso citoplasma, un reticolo endoplasmatico ed un apparato del Golgi ben sviluppato, scarsi granuli elettrodensi. La funzione degli ialinociti è dibattuta, alcuni autori ritengono siano cellule immature, precursori dei granulociti (Mix, 1976), altri cellule mature distinte dai granulociti. Recentemente è stato attribuito loro un ruolo nei processi di emostasi e di

formazione della matrice extracellulare.



Figura 6. Ialinocita di emolinfa di *Mytilus galloprovincialis* (colorazione con Diff Quick). Ingrandimento a 100X. La barra dimensionale è di 10 μm (da Calisi et al., 2008).

I **granulociti** (Fig 7) sono cellule di grandi dimensioni, possono presentare ampi e numerosi processi pseudopodiali.

Nelle cellule mature il nucleo è sferico, mentre nelle cellule immature si presenta generalmente di forma allungata. Il nucleo si trova sempre in posizione eccentrica e presenta cromatina elettrodensa. L'ectoplasma è abbastanza spesso, circonda i granuli endoplasmatici e mostra la presenza di zone elettrone-lucenti dotate di ampi depositi di glicogeno. Nella parte corticale della cellula si ritrovano frequentemente vescicole di endocitosi. Il reticolo endoplasmatico rugoso e il reticolo endoplasmatico liscio sono scarsi nei granulociti maturi; l'apparato del Golgi non è molto esteso ed è circondato da differenti piccole vescicole e granuli densi.

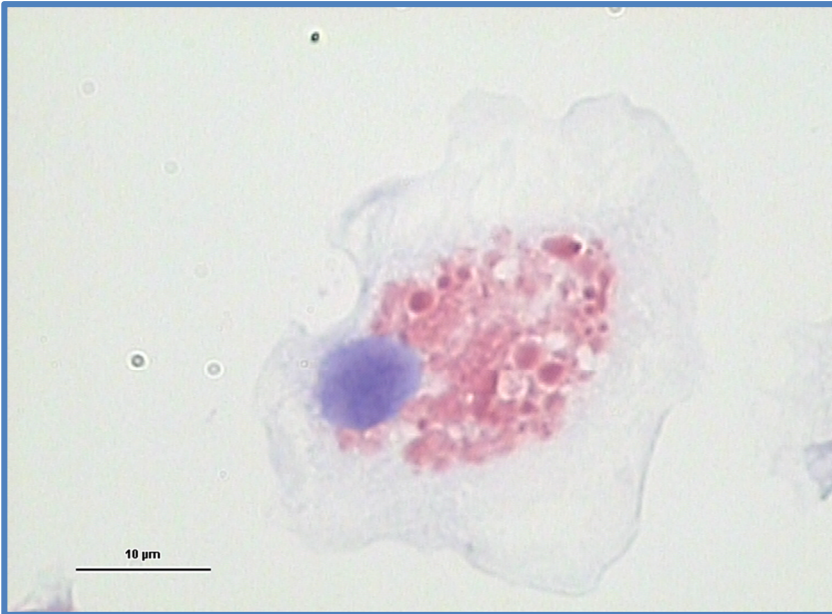


Figura 7. Granulocita di emolinfa di *Mytilus galloprovincialis* (colorazione con Diff Quick). Ingrandimento 100X. La barra dimensionale è di 10 μm (da Calisi *et al.*, 2008)

Osservati al microscopio i granulociti sono caratterizzati da una zona citoplasmatica libera da organelli e dalla presenza di numerosi granuli densi delimitati da membrana attribuiti a comparto lisosomiale, i quali appaiono acidofili. I granuli rappresentano la componente cellulare più numerosa e abbondante in termini di volume cellulare occupato.

I granuli lisosomiali presenti nei granulociti di mitilo sono densi e compatti, mentre taglia e forma appaiono estremamente variabili: i granuli più piccoli, che dominano le cellule più immature, hanno forma allungata e misurano da 0,1 a 0,3 micrometri di diametro, mentre i granuli più grandi presentano un diametro compreso tra 0,3 e 1,5 micrometri e sono di solito sferici. Alcuni granuli possono interconnettersi a formare reticoli apparenti.

Dal punto di vista funzionale i granulociti sono il tipo cellulare maggiormente implicato nella fagocitosi e sembra siano coinvolti nella generazione di radicali liberi dell'ossigeno sotto stimolazione di diversi tipi di agenti nocivi (Cajaraville *et al.*, 1994; Pipe, 1992; Takahashi *et al.*, 1993, Gomez-Mendikute *et al.*, 2002).

1.9.1.2. Lisosomi

I lisosomi sono organuli citoplasmatici contenenti circa 40 diversi enzimi idrolitici attivi a pH acido, noti come idrolasi acide, tra cui fosfatasi, nucleasi, lipasi e glucosidasi (Carballal *et al.*, 1997) in grado di degradare carboidrati, lipidi, proteine e acidi nucleici. Nei mitili giovani i granuli lisosomiali sono caratterizzati da elevate attività di lisozima (Carballal *et al.*, 1997). Tra le idrolasi

l'enzima più reattivo è la fosfatasi acida, la cui attività si riscontra prevalentemente nella periferia degli organelli (Cajaraville *et al.*, 1995b).

Hanno forma rotondeggiante e sono delimitati da una membrana lipoproteica che ha il compito di impedire la fuoriuscita degli enzimi idrolitici. Gli enzimi lisosomiali per essere attivi necessitano di un pH acido, per cui le membrane lisosomiali possiedono delle pompe protoniche in grado di trasportare H^+ dal citoplasma nel lume del lisosoma mantenendo il pH lisosomiale intorno a 5.0.

I lisosomi si originano dalla rete *trans* del Golgi in seguito alla fusione di vescicole idrolasiche del Golgi con endosomi. Nelle vescicole idrolasiche del Golgi (o lisosomi primari) sono già presenti gli enzimi litici, ma il pH non è sufficientemente acido perché questi si attivino. Gli endosomi sono dotati di pompe protoniche sulla propria membrana e quando le vescicole si fondono a questi ultimi, gli enzimi vengono attivati e si forma il vero e proprio lisosoma. Gli enzimi digestivi sono sintetizzati a livello di reticolo endoplasmatico granulare per poi essere trasportati all'apparato del Golgi dove vengono racchiusi nei lisosomi.

I lisosomi sono in grado di degradare molecole e strutture presenti all'interno della cellula nei loro costituenti fondamentali, in modo che siano espulsi o riutilizzati in altro modo.

Vengono impiegati sia nella fagocitosi di materiale estraneo che nel riciclaggio di componenti citoplasmatiche all'interno della cellula durante i normali processi di mantenimento e riparazione cellulare. Sono infatti coinvolti nella digestione intracellulare delle sostanze nutritive, nel turnover di proteine ed organelli, nella regolazione dei processi di secrezione e prendono parte ai processi di difesa cellulare, quali la detossificazione.

Manifestano un'elevata sensibilità all'azione tossica degli xenobiotici, per cui alterazioni a loro carico rappresentano un sensibile campanello d'allarme di condizioni di stress (Moore, 1988).

Le risposte indotte dall'esposizione a xenobiotici possono essere di tre tipi:

- aumento delle dimensioni dei lisosomi;
- cambiamenti nel contenuto dei lisosomi;
- riduzione della stabilità della membrana.

Le risposte fisiologiche e le reazioni patologiche agli stressor ambientali nelle cellule digestive dei molluschi bivalvi e negli emociti includono l'induzione dell'autofagia e la riduzione della stabilità della membrana lisosomiale. In studi condotti su cellule digestive dell'epatopancreas di molluschi

sono state descritte alterazioni dei lisosomi indotte dall'esposizione ai contaminanti quali swelling, accumulo di lipidi o lipofuscine.

I lisosomi sono coinvolti nel metabolismo dei metalli pesanti. Diversi studi hanno evidenziato la capacità di questi organelli di accumulare metalli pesanti e composti organici tossici, ai quali sono esposti per via del loro ruolo funzionale (Regoli, 1992; Franzellitti *et al.*, 2012).

Organi target di un ampio range di contaminanti, presenti in tutte le cellule nucleate e non specie-specifici (Viarengo *et al.*, 2007), i lisosomi sono negli ultimi anni oggetto di numerosi studi nell'ambito della tossicologia acquatica.

1.9.1.3. ALTERAZIONI MORFOMETRICHE DEI GRANULOCITI

Nel presente lavoro di tesi è stato indagato il potenziale applicativo in campo delle alterazioni morfometriche indotte dai contaminanti nei granulociti di *M. galloprovincialis*, proposte in recenti studi quale sensibile e rapido biomarker di stress chimico nel monitoraggio ambientale (Calisi *et al.*, 2008).

In ragione dell'importante ruolo immunologico svolto, la compromissione delle caratteristiche morfo-funzionali dei granulociti indotta dai contaminanti, può provocare un aumento della suscettibilità degli animali esposti alle affezioni e ridurre la loro capacità di sopravvivenza.

In esperimenti di esposizione al cadmio finalizzati all'indagine delle alterazioni indotte sui granulociti e sulle cellule responsabili della risposta immunitaria sono stati osservati un aumento nelle dimensioni dei granulociti con un arrotondamento degli stessi e perdita degli pseudopodi (Calisi *et al.*, 2008).

Lo studio delle alterazioni cito-morfologiche dei granulociti ha previsto l'applicazione della tecnica citologica Diff Quick, utilizzata in campo clinico e veterinario e solo recentemente utilizzata per analisi citologiche su cellule di invertebrato terrestre (Calisi *et al.*, 2008).

1.9.1.4. TEST DEI MICRONUCLEI SU EMOCITI

Agenti fisici e inquinanti ambientali cancerogenici e mutagenici (idrocarburi aromatici policiclici, diossine, metalli in grado di legarsi ai gruppi fosfati modificando il base-pairing, UV-B e radicali liberi) hanno la capacità di scatenare dei meccanismi di modificazione a cascata sul materiale

genetico che vanno dalle alterazioni primarie alle mutazioni genetiche. Ognuna di queste modificazioni può essere quantificata e definita come biomarker (Fossi, 2000).

Il rilevamento di danno genetico indotto in organismi sentinella costituisce un segnale d'allarme per le possibili conseguenze a lungo termine, come l'instaurarsi di cambiamenti nelle popolazioni, nelle specie e nelle comunità degli organismi esposti (Bolognesi and Venier, 2003).

La generazione di modificazioni secondarie, quando eccede la capacità di riparo dell'organismo, può causare fenomeni irreversibili di danno al patrimonio genetico, come ad esempio le aberrazioni cromosomiche.

Uno dei test di genotossicità maggiormente impiegati negli studi in ambienti acquatici per la misura di modificazioni secondarie è il test del micronucleo. A differenza di altri test citogenetici, non implica allestimento di colture cellulari, è indipendente dal numero cromosomico della specie, non presenta eccessive difficoltà di riconoscimento al microscopio ed è di facile esecuzione.

I micronuclei sono formazioni tondeggianti/ovalari prossime al nucleo delle cellule (non devono distare dal nucleo più di 4 volte la lunghezza del suo asse maggiore). Normalmente si formano durante la fase mitotica della divisione cellulare, derivano da frammenti di cromosomi o da cromosomi che non sono stati inclusi nei nuclei delle cellule figlie e rimangono nel citoplasma.

Con il test dei micronuclei si misura la frequenza di rotture cromosomiche grossolane, con perdita di frammenti dal fuso mitotico indotte dall'esposizione a composti tossici. Un aumento della loro comparsa è indice di un danno al DNA.

1.9.1.5. CONCENTRAZIONE TISSUTALE DI METALLOTIONEINE IN GHIANDOLA DIGESTIVA

Le risposte omeostatiche a livello molecolare e biochimico hanno lo scopo di diminuire l'effetto tossico del composto inquinante e comprendono la sintesi di proteine di legame, quali le metallotioneine (MT).

Risposte di questo tipo, caratterizzate dall'induzione dell'attività di proteine funzionali, rappresentano dei sistemi detossificanti nei confronti dei metalli pesanti che hanno la caratteristica di essere sia "substrato-inducibili" sia "substrato-specifici". In funzione di queste due caratteristiche tali biomarker risultano estremamente specifici dal punto di vista qualitativo. Forniscono, inoltre, un segnale "precoce" e semiquantitativo della presenza di una particolare classe di contaminanti.

L'incremento della concentrazione di metallotioneine nei tessuti degli organismi rappresenta un biomarker specifico di esposizione a metalli pesanti (Viarengo, 1989).

La batteria ha previsto la misura della concentrazione di metallotioneine nella ghiandola digestiva di mollusco, tessuto che rappresenta il maggior sito di accumulo di xenobiotici nell'organismo (Widdows *et al.*, 1983).

Le metallotioneine (MT) sono proteine citoplasmatiche a basso peso molecolare (6-8 kDa), monomeriche e dimeriche, termostabili, caratterizzate da un elevato contenuto di cisteina e da un'elevata affinità per alcuni ioni metallici.

Nei mammiferi queste proteine presentano in media 61 amminoacidi dei quali 20 sono rappresentati dalla cisteina, che costituisce il sito attivo della chelazione del metallo (Huggett *et al.*, 1992).

La presenza di metallotioneine è stata riscontrata in tutto il regno animale dagli invertebrati (echinodermi, anellidi, molluschi, artropodi) ai vertebrati (pesci, anfibi, rettili, uccelli, mammiferi). La loro presenza è stata inoltre riscontrata nelle piante e negli organismi procarioti ed eucarioti (Fossi, 2000).

Tali proteine svolgono un ruolo determinante nei processi di detossificazione da metalli pesanti (Cd, Hg, Zn, Cu, Ag). In condizioni normali le cellule dell'organismo sono dotate di livelli basali di metallotioneine, necessarie a mantenere l'omeostasi di metalli pesanti essenziali come Rame e Zinco. Possiedono un'elevata affinità anche per metalli non essenziali come Cadmio e Mercurio (Langston *et.al*, 1998)

Le metallotioneine sono "substrato-inducibili" in presenza di ioni metallici. Diversi studi hanno dimostrato come l'induzione della sintesi *de novo* di metallotioneine da parte dei metalli pesanti sia una risposta diretta all'aumento della concentrazione intracellulare dei cationi degli stessi (Olafson *et al.*, 1979; Lemoin *et al.*, 2000; Bebianno and Serafim, 1998).

1.9.1.6. ATTIVITA' DELL'ENZIMA ANIDRASI CARBONICA

E' stato poi condotto lo studio delle variazioni dei livelli dell'attività dell'enzima anidraasi carbonica nei tessuti ghiandola digestiva, mantello e branchie degli organismi sentinella traslocati allo scopo di valutarne l'applicabilità in batterie finalizzate alla valutazione di ambienti marino-costieri.

Come riportato sopra, l'enzima anidraasi carbonica è implicato negli organismi animali nella regolazione di importanti processi fisiologici che vanno dalla respirazione alla deposizione del bicarbonato di calcio per la formazione della conchiglia (Henry, 1988).

L'attività dell'enzima è stata riscontrata in alcune specie di molluschi (Nielsen and Frieden, 1972), celenterati, balani, anellidi, crostacei a livello di branchie, gonadi, cuore, ghiandola digestiva (Henry, 1987).

L'attività dell'enzima è stata indagata a livello dei tessuti direttamente coinvolti nelle interazioni tra l'organismo e il proprio ambiente esterno e per questo potenziali bersagli primari dell'azione dei contaminanti chimici ambientali: la ghiandola digestiva è infatti deputata alla digestione intracellulare di cibo, le branchie sono coinvolte nei processi di secrezione della CO₂ all'esterno e il mantello è responsabile dei materiali costitutivi della conchiglia tra cui il carbonato di calcio, per cui la presenza di anidrasi carbonica è da mettere in relazione alla deposizione di tale sale per la formazione degli strati calcarei delle valve.

Eventuali alterazioni dell'attività dell'enzima indotte dall'esposizione a contaminanti ambientali potrebbero, se non compensate, portare a manifestazioni di danno a livello di organismo.

L'attività di anidrasi carbonica è stata saggiata applicando un protocollo di dosaggio di tipo elettrometrico basato sul principio secondo cui l'attività di anidrasi carbonica in una soluzione debolmente tamponata di omogenato tissutale alla quale venga fornito costantemente il substrato dell'enzima può essere rilevata e quantificata attraverso la velocità di diminuzione di pH della soluzione stessa.

1.9.1.7. RUOLO FISIOLÓGICO DI ANIDRASI CARBONICA IN GHIANDOLA DIGESTIVA DI MITILO

È ampiamente documentato come in condizioni di stress da esposizione ai contaminanti chimici, per effetto del processo di detossificazione cui le cellule della ghiandola digestiva di mitilo sono deputate, si assista ad un maggiore sviluppo del sistema lisosomiale in termini di attività e dimensioni (Marigómez *et al.*, 1996).

I lisosomi sono organuli cellulari che accumulano e compartimentalizzano al loro interno una gran quantità di composti tossici sia organici che inorganici svolgendo pertanto un ruolo fondamentale nei processi di detossificazione (Moore *et al.*, 2004). Contengono circa 40 enzimi idrolitici, che per essere attivi richiedono un pH acido.

Al fine di indagare il ruolo fisiologico in ghiandola digestiva dell'enzima anidrasi carbonica nell'acidificazione del sistema lisosomiale nel corso dei processi di detossificazione indotti dall'esposizione a contaminanti, è stata adoperata una tecnica spettrofluorimetrica applicata in via sperimentale a sospensioni di cellule del tessuto.

Principio del metodo

La tecnica si basa sull'impiego di una sonda fluorescente per lo studio *in vivo* degli aspetti dinamici della biogenesi e della funzione dei lisosomi.

La sonda con nome commerciale LysoSensor™ Green DND-189 (“Molecular probes by life technologies”, Paisley, UK), acidotropica, viene accumulata in seguito a protonazione all'interno di organuli cellulari che presentano pH acido. La protonazione è responsabile dell'attenuazione del fenomeno del quenching di fluorescenza risultando in un complessivo incremento di fluorescenza emessa proporzionale alla diminuzione di pH del mezzo. L'acidificazione del sistema lisosomiale viene misurata in termini di aumento dell'intensità di fluorescenza emessa, che è proporzionale alla diminuzione del pH, rispetto ad un controllo trattato con acetazolamide, inibitore specifico dell'enzima.

2. MATERIALI E METODI

2.1 MATERIALI

L'inibitore Acetazolamide, la sonda DAPI, il Kit "QuantiPro BCA Assay Kit", l'isoenzima II di anidraasi carbonica estratta da eritrociti bovini e tutti i reagenti usati sono stati acquistati al massimo grado di purezza da Sigma (St. Louis, U.S.A.).

Il Microtox® Acute Reagent, lotto I3G4098 (part number AZF686018A, scad. 08/2015) è stato acquistato da Ecotox LDS s.r.l. (Cornaredo, Italia).

Le soluzioni di riattivazione dei batteri liofilizzati, il Diluente per la fase liquida e il Diluente per la fase solida sono stati acquistati da Strategic Diagnostics Inc.

Il ROTOXKIT M™ è stato acquistato da MicroBioTest Inc.(Gent, Belgium)

I mitili adulti della specie *M.galloprovincialis* impiegati per l'esperimento di esposizione in campo sono stati forniti dalla Divisione di Molluschicoltura dell'Istituto Delta Ecologia Applicata di Goro (FE).

I mitili della specie *M. galloprovincialis* impiegati per l'esperimento di esposizione in laboratorio sono stati reperiti presso l'impianto di mitilocoltura "Marevivo" di Castro (LE).

I campioni di sedimento marino-costiero sui quali è stata applicata la batteria di saggi ecotossicologici sono stati forniti dall'Istituto per l'ambiente marino-costiero IAMC-CNR di Messina.

Il kit "Diff Quick" utilizzato per le colorazioni citologiche dei campioni è stato acquistato da Dade Behering (Newark, U.S.A.).

LysoSensor™ Green DND-189 è stato acquistato da Molecular probes by life technologies™ (Paisley, UK).

2.2. AMBIENTE REALE

L'ambiente reale impiegato per l'applicazione in campo degli strumenti d'indagine in studio, la Rada di Augusta, è situato lungo la costa ionica siciliana ed è sede della più estesa zona industriale della regione.



Figura 8. Rada di Augusta (foto da Azzaro, 1993)

L'ampio Golfo di Augusta, per la sua peculiarità geografica, ha costituito da sempre un porto naturale con un'importanza militare considerevole, alla quale si è aggiunta quella commerciale acquisita nel secondo dopoguerra con il fenomeno dell'industrializzazione.

Dal 1949 il triangolo di territorio compreso tra i comuni di Augusta, Melilli e Priolo e su un litorale di circa 15 km di costa, è sede del più grande polo petrolchimico d'Europa, costituito da industrie petrolifere, petrolchimiche e chimiche. Il polo vanta l'impianto di cloroalcalinazione più importante in Italia la cui attività, che ha avuto inizio nel 1958 e si è protratta sino al 2005 è stata all'origine di scarichi incontrollati di mercurio nella Baia di Augusta verificatisi sino al 1978, anno in cui la legislazione italiana ha imposto delle restrizioni in materia.

Malgrado la presenza di un grosso impianto di depurazione, quantità significative di reflui prodotti dagli impianti petrolchimici, di reflui agricoli e di reflui urbani dai comuni di Melilli e Priolo vengono inoltre recapitate in Rada.

Oggi il territorio paga le conseguenze di questa industrializzazione non pianificata con problematiche legate sia all'ambiente che alla salute umana.

In ragione dell'elevato livello di degrado ambientale l'area è stata inclusa dal Ministero dell'Ambiente nella perimetrazione del Sito contaminato di Interesse Nazionale (SIN) di Priolo (Legge 426/98; D.M. 10.01.2000 e D.M. 10.03.2006).

Diversi studi negli ultimi 10 anni hanno fornito dettagliate informazioni circa i livelli di contaminazione dell'area e il relativo rischio per la salute umana (ICRAM; 2005; Ausili *et al.*, 2012; Di Leonardo *et al.*, 2007, 2008; ENVIRON International Team, 2008; Sprovieri *et al.*, 2011; Bonsignore *et al.*, 2013).

I sedimenti campionati nella zona costiera di Augusta hanno evidenziato, a varie profondità, una forte contaminazione da mercurio, idrocarburi, esaclorobenzene, diossine e furani e policlorobifenili (Ausili *et al.*, 2008; ICRAM, 2008). In particolare recenti studi (Di Leonardo *et al.*, 2007; 2008) hanno riportato livelli di mercurio e idrocarburi nei sedimenti superiori agli standard di qualità nazionali e internazionali (D.M. 56/09). Sprovieri *et al.* (2011) hanno sottolineato come i sedimenti della Rada di Augusta possano fungere da sorgente di mercurio per la colonna d'acqua sovrastante e per gli organismi che vivono all'interno della baia: le acque contaminate da mercurio in uscita dalla Rada vengono intercettate dalla circolazione superficiale di mesoscala, con ampi potenziali di distribuzione di mercurio sul bacino del Mediterraneo. La presenza di mercurio riscontrata in alcune specie ittiche campionate all'interno e al di fuori della Rada di Augusta sottolinea il rischio cruciale associato al trasferimento di mercurio dal bacino (Bonsignore *et al.*, 2013).

Nell'area è stato osservato un significativo impatto dei contaminanti sulle comunità di foraminiferi bentonici (Di Leonardo *et al.*, 2007), mentre elevate concentrazioni di idrocarburi sono state osservate nei tessuti di mitili traslocati per un mese nell'area di Priolo (Fasulo *et al.*, 2012).

L'area è inoltre interessata da un significativo fenomeno di eutrofizzazione associato alla presenza di significative quantità di N e P derivanti dai reflui delle attività industriali (produzione di fertilizzanti) e agricole (Azzaro, 1993).

2.3. FASI DI STUDIO

Il piano delle attività ha previsto una prima fase volta all'individuazione e validazione su campioni reali di una batteria di saggi ecotossicologici in grado di fornire uno screening del livello di contaminazione dei sedimenti marino costieri ed una seconda fase finalizzata allo sviluppo di nuovi biomarker citologici e molecolari di stress chimico in un approccio multimarker basato sull'impiego dell'organismo bioindicatore *Mytilus galloprovincialis*.

2.3.1. I FASE

I requisiti di valenza ecologica, praticità e fruibilità richiesti hanno portato alla proposta di una batteria basata sull'impiego di saggi acuti ampiamente standardizzati, basati sull'osservazione dell'effetto immediato della matrice test, e di due tipologie di saggio: saggi *in vivo* e saggio *in vitro*. La batteria proposta ha previsto l'indagine di due matrici differenti: il sedimento intero e l'elutriato di sedimento.

Sono stati selezionati:

- un saggio di inibizione della bioluminescenza con il batterio marino *Vibrio fischeri* condotto sulla matrice sedimento intero
- un saggio di inibizione della bioluminescenza con il batterio marino *Vibrio fischeri* condotto su elutriato estratto da sedimento
- un saggio di mortalità con il rotifero *Brachionus plicatilis* su elutriato di sedimento
- un bioassay *in vitro*, recentemente brevettato presso il Laboratorio di Fisiologia Generale e Ambientale dell'Università del Salento (brevetto n. MI2008A008813)

Al fine di valutarne la capacità di discriminare diversi gradi di inquinamento, la batteria individuata è stata applicata a campioni di sedimento prelevati da un'area a forte impatto antropico, la Rada di Augusta (Fig. 9), sottoposti a diversi processi di bioremediation. presso Istituto per l'ambiente marino-costiero IAMC-CNR di Messina.

Sulla base della tipologia di trattamento di bioremediation subito (fisico, chimico e biologico) e del livello di intervento, che hanno comportato un abbattimento della concentrazione di idrocarburi in una percentuale compresa tra il 30% e il 70%, i campioni di sedimento analizzati sono riconducibili al seguente gradiente decrescente di contaminazione: A (non trattato) > 1B-T30 (trattamento fisico) > 4B-T30 (trattamento fisico e aggiunta di nutrienti) > 2B-T30 (trattamento fisico, microbiologico e aggiunta di nutrienti) > 3B-T30 (trattamento fisico, microbiologico e aggiunta di nutrienti).



Figura 9. Sito di campionamento Rada di Augusta (SR).

2.3.1.1. Preparazione elutriato

L'estrazione dell'elutriato di sedimento è stata effettuata secondo la metodica EPA (2001) in acqua di mare sintetica di salinità pari a 33,3‰ preparata secondo la metodica EPA (1985) modificata per l'esclusione dell'EDTA.

L'acqua marina sintetica è stata preparata sciogliendo in 1 L di acqua distillata 20 mg di $\text{SrCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 30 mg di H_3BO_3 , 100 mg di KBr , 700 mg di KCl , 1,47 gr di $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 4gr Na_2SO_4 , 10,78 gr di $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 23,5 gr di NaCl ; 3 mg di NaF ; 20 gr di $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$, 200 mg di NaHCO_3 ; la soluzione è stata poi filtrata mediante pompa da vuoto attraverso una membrana di esteri di cellulosa di porosità nominale pari a 0,45 μm .

I sedimenti sono stati trasportati e conservati in contenitori di polietilene ad una temperatura di 4-6°C sino al momento dell'analisi.

Per la preparazione dell'elutriato una specifica aliquota di sedimento umido tal quale (precedentemente portato a temperatura ambiente e omogeneizzato manualmente) è stato posto in agitazione per 1 ora alla temperatura di 15-20°C con acqua marina sintetica osservando un rapporto 1:4 tra il peso secco del sedimento e il volume dell'acqua.

La frazione liquida ottenuta è stata centrifugata a 3200 g per 20 minuti a 12°C. Il surnatante

ottenuto è stato analizzato per la determinazione della conducibilità elettrica, del pH e della salinità. Parte del surnatante è stata aliquotata in contenitori di materiale chimicamente inerte in vetro scuro per il saggio Microtox in fase liquida e per per i saggi con *B. plicatilis* e AC (riempiti sino all'orlo per evitare eventuali perdite di sostanze volatili presenti nel campione).

L'elutriato è stato conservato a 4°C ed è stato saggiato entro 24 ore dalla preparazione (le aliquote in doppio sono state congelate a -20°C per un massimo di 2 settimane).

2.3.1.2. SAGGIO INIBIZIONE DELLA BIOLUMINESCENZA SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO

Metodo per la determinazione dell'inibizione della bioluminescenza emessa da *Vibrio fischeri*

Il saggio su elutriato di sedimento è stato eseguito secondo il protocollo Microtox ® Basic Test (AZUR Environmental, 1998).

Preparazione del campione

Per la preparazione del campione si rinvia al paragrafo "Preparazione elutriato". Il volume di campione necessario per il saggio è pari a circa 10 ml.

I campioni sono stati portati a temperatura ambiente e sottoposti alla misura di pH e salinità. Poiché il pH del campione è risultato compreso tra 6 e 9 unità, non è stato necessario effettuare modifiche del pH. Non è necessario alterare la salinità del campione poichè risultata nell'ambito del range di tolleranza dell'organismo.

Controllo di qualità dell'organismo di saggio

Per il saggio è stato utilizzato il ceppo NRRL-B-11177 della specie marina *Vibrio fischeri* acquistato come preparato commerciale (lotto I3G4098) presso Ecotox LDS s.r.l. (Cornaredo, Italia). In Tabella 1 sono riportate le condizioni certificate del lotto impiegato fornite da Ecotox LDS.

Tabella 1 Condizioni certificate del lotto di batteri I3G4098 impiegato nelle sperimentazioni fornite dal distributore (Ecotox LDS).

Lotto di batteri utilizzato	I3G4098
EC50 con fenolo a 5 minuti	23.3 mg/L (13.0-26.0) mg/L
EC50 con Zn ²⁺ a 15 minuti	0.8 mg/l (0.6-2.2)mg/L
EC50 con solfato di zinco a 15 minuti	3.5 mg/l (3.0-10.0)mg/L
Delta Tox Adjusted Light Reading	107 (≥30)
EC50 con 3,5 diclorofenolo a 30 minuti	4.2 mg/L (1.9-6.9) mg/L
Inibizione % con 3,5 diclorofenolo a 30 minuti	20%-80%

La tabella 2 riporta i valori di EC50 relativi al controllo di qualità effettuato in laboratorio all'apertura del lotto dei batteri utilizzato, con tossici di riferimento quali fenolo e zinco. In particolare per il controllo del batch di reazione è stata avviata, contestualmente al saggio, una prova di esposizione dei batteri per un intervallo di tempo di 30 minuti ad una concentrazione pari a 3,4 mg/L del tossico di riferimento 3,5 diclorofenolo.

Tali test preliminari e paralleli al saggio sono necessari per individuare la sensibilità del lotto impiegato a contaminanti noti.

Tabella 2. Controllo di qualità del lotto di batteri I3G4098 impiegato nelle sperimentazioni.

Controllo di qualità del lotto effettuato in laboratorio	
EC50 con solfato di zinco a 15 minuti	3 mg/L (3.0-10.0) mg/L
EC50 con fenolo a 5 minuti	17.2 mg/L (13.0-26.0) mg/L

Riattivazione della sospensione batterica

I batteri liofilizzati sono conservati a -20°C.

Le sospensioni congelate dei batteri sono state riattivate prima dell'uso mediante l'aggiunta di 1000 μl di soluzione ricostituente (Strategic Diagnostics Inc.) nel pozzetto di riattivazione a 5.5°C del luminometro. Dopo la riattivazione è necessario attendere circa 30 minuti prima di procedere al saggio per garantire che i batteri liofilizzati a -20°C si adattino al nuovo status. (La sospensione batterica può essere utilizzata nelle 3 ore successive alla riattivazione).

Test

La sospensione batterica diluita è stata preparata inoculando 300 μl di reagente in 2700 μl di diluente. La quantità di batteri da inoculare deve essere tale da ottenere una quantità di batteri nella cuvetta finale di saggio non inferiore a 10^6 cellule per cuvetta. L'esecuzione del test richiede una serie di accorgimenti poiché la via metabolica responsabile dell'emissione di luminescenza da parte del batterio è strettamente legata alla respirazione cellulare, per cui qualsiasi alterazione del normale metabolismo cellulare potrebbe determinare un decremento nella produzione di luminescenza.

Il test prevede la preparazione di una soluzione di controllo, rappresentata da 2500 μl di soluzione diluente (Diagnostics Inc.) e di soluzioni test rappresentate da 2500 μl di ciascun elutriato da analizzare. Le cuvette contenenti le soluzioni test sono state incubate per 15 minuti a 15°C .

In altre cuvette, due repliche per ciascuna soluzione test, sono state preparate aliquote pari a 100 μl della sospensione batterica diluita e sono state lasciate termostatare a 15°C per circa 15 minuti. Al termine dei 15 minuti è stata misurata al luminometro l'intensità luminosa I_0 emessa dai batteri per ciascuna di tali cuvette. Il luminometro consente di effettuare misure alla lunghezza d'onda di 490 nm.

Immediatamente dopo la determinazione dell' I_0 , 900 μl di soluzione di controllo e di ciascuna soluzione test sono stati trasferiti nelle cuvette contenenti la sospensione batterica. Ciascun campione di elutriato, essendo stato diluito con la sospensione batterica, è stato quindi saggiato alla concentrazione equivalente al 90%.

A 5, 15 e 30 minuti dall'aggiunta del campione è stata misurata per ciascuna cuvetta l'intensità luminosa emessa dai batteri. I valori ottenuti corrispondono rispettivamente all' I_5 , all' I_{15} e all' I_{30} per ciascuna cuvetta.

L'elaborazione dei risultati ha previsto il calcolo del fattore di correzione fkt dei valori dell'intensità luminosa I_0 come rapporto tra l'intensità luminosa (I_{kt}) misurata dopo l'aggiunta della soluzione di controllo a 5, 15 o 30 minuti e l'intensità luminosa misurata prima dell'aggiunta della stessa soluzione.

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_0}$$

E' stata calcolata la media dei fattori di correzione per le 2 repliche del controllo (\bar{f}_{kt}) e sono stati calcolati per ciascuna cuvetta i nuovi valori dell'intensità luminosa I_0 corretti per il fattore F_{kt} , come prodotto (I_{ct}) tra l'intensità luminosa (I_0) e la media dei fattori di correzione (\bar{f}_{kt}).

L'inibizione percentuale di ciascuna campione (H_t) è stata calcolata come:

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_t}{I_{ct}} * 100$$

dove i valori di I_t rappresentano i valori di intensità luminosa a 5, 15 o 30 minuti misurati nelle cuvette dopo l'aggiunta del campione.

Poiché sono state saggiate repliche della stessa concentrazione, il test non potrà fornire una curva dose/effetto.

Il risultati, in termini di tossicità acuta, sono stati espressi come media delle inibizioni percentuali delle due repliche di ciascun campione per ciascun tempo di esposizione.

Criteri di validazione

Per il controllo del batch di reazione è stata avviata, contestualmente al saggio, una prova di esposizione dei batteri per un intervallo di tempo di 30 minuti ad una concentrazione pari a 3,4 mg/L del tossico di riferimento 3,5 diclorofenolo.

2.3.1.3. SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA BIOLUMINESCENZA SU SEDIMENTO INTERO

Metodo per la determinazione della dell'inibizione della bioluminescenza emessa da *Vibrio fischeri*

Il saggio Microtox in fase solida è stato eseguito secondo il protocollo operativo Microtox ® Solid-Phase Test (AZUR Environmental, 1998).

Preparazione del campione

L'esecuzione del test in fase solida secondo la Large Sample Procedure (Azur Environmental, 1998b) prevede l'allestimento di una sospensione di 7 gr di sedimento fresco mantenuto in agitazione in 35 mL di diluente Microtox ®SPT (Ecotox LDS) per 10 minuti. In un bagnetto termostato in grado di garantire una temperatura costante di 15 ± 1 °C vengono posizionati dei

tubi, in cui vengono distribuiti 1500 µl di diluente Microtox ®SPT che serviranno successivamente per la preparazione delle 13 diluizioni del campione.

Controllo di qualità dell'organismo di saggio

Per il saggio è stato utilizzato il ceppo NRRL-B-11177 della specie marina *Vibrio fischeri* acquistato come preparato commerciale (lotto I3G4098) presso Ecotox LDS s.r.l. (Cornaredo, Italia).

Tabella 3. Condizioni certificate del lotto di batteri I3G4098 impiegato nelle sperimentazioni (Ecotox LDS).

Lotto di batteri utilizzato	I3G4098
EC50 con fenolo a 5 minuti	23.3 mg/L (13.0-26.0) mg/L
EC50 con Zn ²⁺ a 15 minuti	0.8 mg/l (0.6-2.2)mg/L
EC50 con solfato di zinco a 15 minuti	3.5 mg/l (3.0-10.0)mg/L
Delta Tox Adjusted Light Reading	107 (≥30)
EC50 con 3,5 diclorofenolo a 30 minuti	4.2 mg/L (1.9-6.9) mg/L
Inibizione % con 3,5 diclorofenolo a 30 minuti	20-80%

Riattivazione della sospensione batterica

I batteri liofilizzati sono conservati a -20°C. Le sospensioni congelate dei batteri sono state riattivate prima dell'uso, mediante l'aggiunta di 1000 µl di soluzione ricostituente (Strategic Diagnostics Inc.) nel pozzetto di riattivazione a 5.5°C. Dopo la riattivazione è necessario attendere circa 30 minuti prima di procedere al saggio, per garantire che i batteri liofilizzati a -20°C si adattino al nuovo status. (La sospensione batterica può essere utilizzata sino a 3 ore dalla riattivazione).

Mediante micropipetta sono state prelevate dalla sospensione posta in agitazione due aliquote da 1,5 ml, sono state trasferite nei tubi dedicati posti nel termostato ed è stata eseguita una diluizione seriale 1:2 per ciascuna delle due repliche.

Il reagente diluito è stato preparato inoculando 150 µl di reagente in 1350 µl di diluente Microtox ® SPT. Anche in questo caso, la quantità di batteri da inoculare deve essere tale da ottenere una

quantità di batteri nella cuvetta finale del saggio non inferiore a 10^6 cellule per cuvetta. L'esecuzione del test richiede una serie di accorgimenti poiché la via metabolica responsabile dell'emissione di luminescenza da parte del batterio è strettamente legata alla respirazione cellulare, per cui qualsiasi alterazione del normale metabolismo cellulare potrebbe determinare un decremento nella produzione di luminescenza.

Trascorsi 20 minuti dalla preparazione del reagente diluito, ad ogni tubo è stata addizionata un'aliquota pari a 100 μ l di sospensione batterica. I tubi vengono incubati a 15°C per 20 minuti, trascorsi i quali il loro contenuto viene filtrato. La luminescenza viene misurata sulla fase liquida recuperata dopo un periodo di acclimatemento di 10 minuti nei pozzetti di incubazione. I risultati del saggio vengono espressi come IC₅₀, che rappresenta la diluizione del campione in grado di determinare un'inibizione del 50% della luminescenza rispetto ai controlli. Alcuni laboratori riportano la correzione da peso umido a peso secco. Le condizioni operative adottate sono riportate in tabella 1.

Tabella 4. Parametri e condizioni per sviluppare il saggio in fase solida con il batterio marino *Vibrio fischeri*.

Strumentazione	Fotometro (Analizzatore Microtox® Modello 500) in grado di leggere la luce emessa a 490±100 nm; provvisto di incubatore per singole cuvette a 5.5±1°C; termostato o incubatore a 15±0.5°C.
Soluzione ricostituente	Acqua pura, non tossica
Controllo/ acqua di diluizione	Diluyente o soluzione di NaCl al 3.5%
Temperatura test	15±0.5°C
pH, salinità e colore/torbidità	Alcun aggiustamento o correzione
Aerazione	Non richiesta

Subcampioni per il calcolo del peso secco	3 repliche of 5 ± 0.2 gr di sedimento fresco incubati a $100 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per 24 h.
Diluizione primaria	7.00 ± 0.05 gr di sedimento intero, omogeneizzato in 35 mL di acqua di diluzione in un beaker, miscelato per 10 minuti su un agitatore magnetico, ad una velocità tale che la profondità del vortice sia pari alla metà dell'altezza del livello del liquido
Concentrazione test	La massima concentrazione test è pari normalmente a 197000 mg/L (19.7%, peso fresco/volume) su peso fresco con diluizioni 1:2, per un totale di 12 concentrazioni test in tubi in polistirene; 4 soluzioni di controllo; incubate per 10 minuti
Organismo Test	<i>Vibrio fischeri</i> ceppo NRRL B-11177, acquistato in forma liofilizzata. Dopo la riattivazione è stato mantenuto ad una temperatura di $5.5 \pm 1^\circ\text{C}$.
Inoculo	100 μL per ciascuna concentrazione test
Incubazione	20 minuti alla temperature di esecuzione del saggio, filtrazione mediante appositi dispositivi
Filtrato per la lettura	500 μL in cuvette
Osservazioni	Light levels of all test filtrates and controls measured
Endpoint	IC_{50} (mg/L), calcolato dal software; % di effetto
Tossico di riferimento	Effettuato almeno una volta al mese, impiegando un sedimento di controllo positivo e le procedure e le condizioni per per la misura della tossicità dei sedimenti test

2.3.1.4. SAGGIO DI MORTALITA' CON *Brachionus plicatilis* SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO

Il saggio è stato condotto sugli elutriati ottenuti dal sedimento secondo la metodica riportata nel paragrafo “preparazione degli elutriati”.

Per l'esecuzione del test è stato impiegato il protocollo Rotoxkit messo a punto dalla MicroBiotest Inc. (Gent, Belgium) e basato sulla norma ASTM E 1440 (1991 rev. 1998), che consente di effettuare un rapido, semplice, sensibile ed economico screening della tossicità acuta di sostanze chimiche o effluenti rilasciati in ambienti d'acqua dolce, estuarini e marini.

Il kit fornisce l'organismo test, il rotifero eurialino *B.plicatilis*, sotto forma di cisti mantenute al buio a $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$, le quali devono essere riattivate 24-26 ore prima dell'esecuzione del saggio. La procedura di riattivazione prevede che le cisti siano incubate nel pozzetto di riattivazione in 10 ml di mezzo di riattivazione (acqua marina sintetica di salinità pari a 20‰) ad una temperatura costante di 25°C e in condizioni di illuminazione continua.

Dopo circa 28 ore le cisti si schiudono e i neonati (circa 50 individui) con l'ausilio di un microscopio ad ingrandimento 10-12X vengono trasferiti in pozzetti di stabulazione dedicati, uno per il controllo (contenente 0.7 ml di acqua marina sintetica di salinità pari a 35‰) e uno per ciascun campione (contenente 0.7 ml di elutriato). I neonati vengono incubati per 1 ora al fine di consentire l'adattamento alla variazione di salinità.

Nella piastra multipozzetto vengono allestite sei repliche del controllo (costituito da acqua marina sintetica) e sei repliche di ciascun campione di elutriato di sedimento. In ciascuno di tali pozzetti vengono allocati 5 organismi (prelevati dai pozzetti di stabulazione dedicati).

La piastra è stata, quindi, incubata al buio ad una temperatura costante di 25°C per 24 ore + 24 ore. Il test non prevede il rinnovo del mezzo né che gli organismi vengono alimentati.

Dopo 24 ore e 48 ore di incubazione viene contato in ciascun pozzetto il numero di individui morti o immobili e viene calcolata la percentuale di mortalità dei rotiferi.

Il test è ritenuto valido se la mortalità nei controlli non è superiore al 10%. I risultati sono espressi in termini di percentuale di effetto.

Controllo di qualità

Al fine di verificare la corretta esecuzione della procedura di saggio e che le condizioni fisiologiche

dell'organismo test siano ottimali è stato effettuato contestualmente al saggio un test con il tossico di riferimento bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$).

2.3.1.5. SAGGIO DI INIBIZIONE DELL'ATTIVITA' DELL'ENZIMA ANIDRASI CARBONICA SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO

Il saggio è stato condotto sugli elutriati ottenuti dal sedimento secondo la metodica riportata nel paragrafo "preparazione degli elutriati".

La valutazione dell'attività dell'anidrasi carbonica è stata effettuata mediante il metodo recentemente brevettato presso il Laboratorio di Fisiologia generale ed Ambientale dell'Università del Salento (brevetto n. MI2008A008813) basato sull'impiego dell'isoenzima II di anidrasi carbonica estratta da eritrociti bovini.

Il dosaggio dell'attività enzimatica si basa sulla misura elettrometrica del decadimento di pH di una miscela di reazione contenente l'enzima e il substrato, la CO_2 .

Per ogni dosaggio effettuato è stata prevista la rispettiva prova di controllo in assenza della matrice da testare, necessaria per la comparazione dell'attività enzimatica. Il dosaggio del campione è stato effettuato in quattro repliche, mentre per il controllo sono state effettuate tre repliche.

2.3.2. II FASE

Le risposte cellulari e molecolari indagate nell'ambito della batteria individuata sono:

- alterazioni morfometriche dei granulociti
- frequenza di micronuclei in emociti
- concentrazione di metallotioneine in ghiandola digestiva
- induzione dell'enzima anidrasi carbonica nei tessuti ghiandola digestiva, mantello e branchie

E' stato poi condotto un esperimento in vivo in condizioni controllate di laboratorio al fine di indagare il legame fisiologico tra attività dell'enzima anidrasi carbonica e sistema lisosomiale.

Gli esperimenti in campo sono stati condotti su mitili della specie *M. galloprovincialis* traslocati nei siti Brucoli (SR) e Rada di Augusta (SR), rispettivamente sito di controllo e sito impattato

2.3.2.1. ESPERIMENTO DI TRASLOCAZIONE NEI SITI DI INTERESSE

Sono state condotte una campagna di traslocazione invernale (novembre-dicembre 2013) ed una campagna di traslocazione estiva (giugno-luglio 2014).

2.3.2.1.1. Campagna di traslocazione invernale (Time 1)

Uno stock omogeneo di organismi (n=100) della stessa taglia (lunghezza media della valva: 6.5 ± 0.4 cm; larghezza media della valva: 3.5 ± 0.1) è stato reperito presso la Divisione Molluschicoltura dell'Istituto Delta Ecologia Applicata di Goro nel mese di ottobre 2013.

2.3.2.1.2. Campagna di traslocazione estiva (Time 2)

Uno stock omogeneo di organismi (n=100) della stessa taglia (lunghezza media della valva: $5.9 \pm 0,5$ cm; larghezza media della valva: 3 ± 0.1 cm) è stato reperito presso la Divisione Molluschicoltura dell'Istituto Delta Ecologia Applicata di Goro nel mese di maggio 2014.

Per ciascuna campagna, dopo un periodo di acclimatazione di 2 settimane presso l'Istituto per l'ambiente marino costiero (IAM-CNR) di Messina, lo stock è stato suddiviso in due gruppi ciascuno composto da 50 esemplari.

I due gruppi sono poi stati trasferiti con l'ausilio di sub professionisti nei siti di studio in apposite gabbie poste ad una profondità di 5 m e assicurate con un'ancora. Il primo gruppo è stato traslocato nel sito a forte impatto antropico, la Rada di Augusta (SR), e il secondo gruppo, che è servito come controllo, nel sito di riferimento di Brucoli (SR).

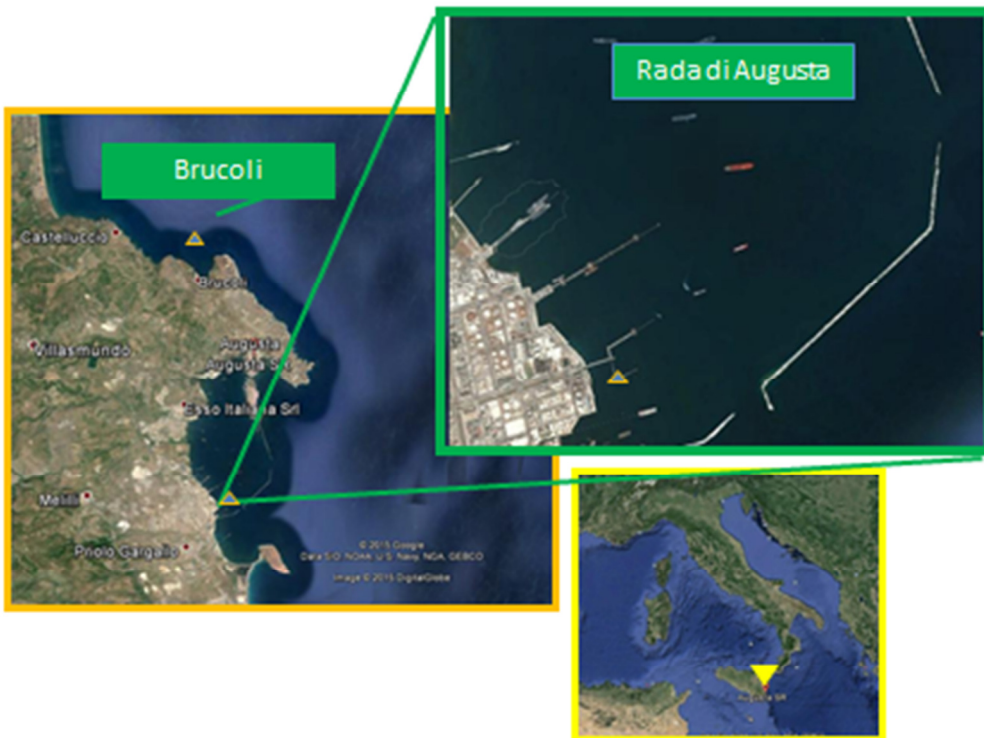


Figura 10. Ubicazione dei siti di traslocazione nel sito di riferimento Brucoli (SR) e nel sito Rada di Augusta (SR).

Gli organismi sono stati mantenuti in esposizione in campo per un intervallo di tempo di 45 giorni.

2.3.2.1.3. *Prelievo tessuti*

Per ciascuna delle due campagne al termine del periodo di traslocazione sono stati prelevati randomicamente da ogni gabbia circa 50 individui dai quali sono state dissezionate per il dosaggio dei biomarker:

- le ghiandole digestive (di 12 individui per sito) per il dosaggio dell'attività dell'enzima anidraasi carbonica e, limitatamente alla campagna estiva (Time 2), le ghiandole di 6 individui (3 pool da 3) per la determinazione dei livelli di metallotioneine;
- i mantelli (di 12 individui) per il dosaggio dell'attività di AC;
- le branchie (di 12 individui) per il dosaggio dell'attività di AC.

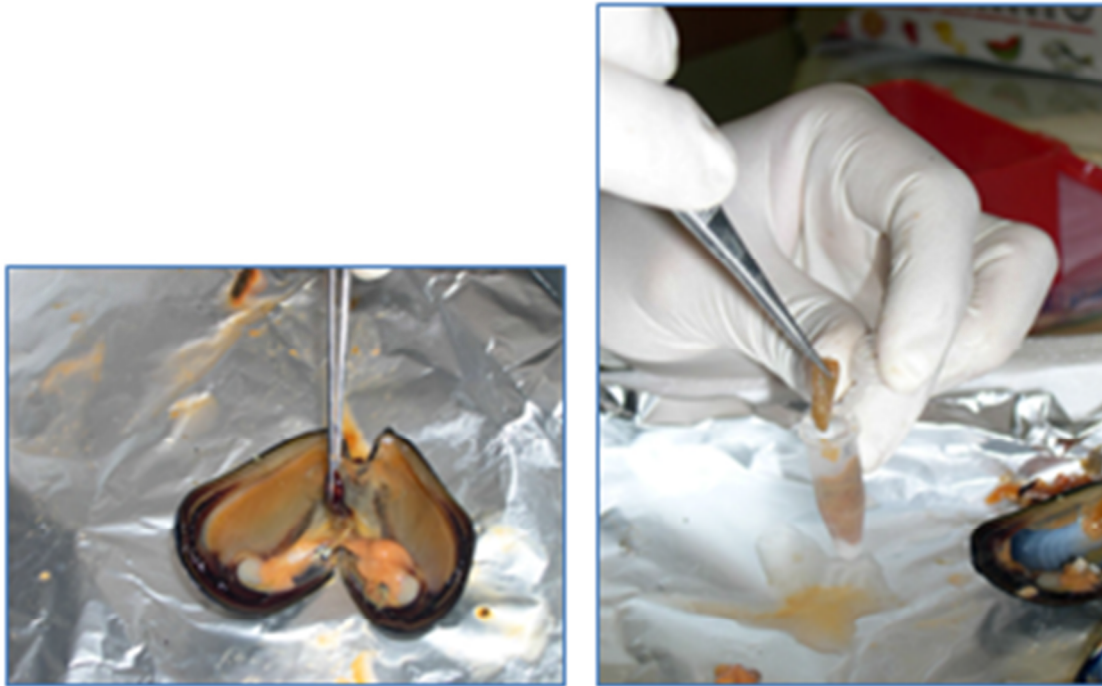


Figura 11. *Prelievo di ghiandole digestive da esemplare di Mytilus galloprovincialis.*

I tessuti di mitilo sono stati prelevati e conservati a -80°C sino al momento dell'analisi.

2.3.2.1.4. Prelievo emolinfa

Sui 50 individui prelevati da ogni gabbia dopo i 45 giorni di traslocazione è stato effettuato il prelievo dell'emolinfa per lo studio delle alterazioni morfometriche dei granulociti e per la determinazione della frequenza dei micronuclei.

L'emolinfa per la preparazione dei campioni è stata prelevata da 10 pool di 5 individui di *M. galloprovincialis* per ciascuna condizione sperimentale tramite una siringa sterile ipodermica inserita nel muscolo adduttore del mitilo. Sono stati prelevati mediamente $500\ \mu\text{l}$ di emolinfa da ogni esemplare di mitilo. Il campione di emolinfa è stato quindi diluito in rapporto 1:1 con una soluzione salina avente la seguente composizione: 20 mM HEPES, 436 mM NaCl, 53 mM MgSO_4 , 10 mM KCl, 10 mM CaCl_2 e pH 7.3.

I campioni di emolinfa sono stati immediatamente sottoposti ad analisi.

2.3.2.2. BATTERIA DI BIOMARKER

2.3.2.2.1. CARATTERIZZAZIONE CITO-MORFOLOGICA DEI GRANULOCITI

Lo studio di eventuali alterazioni cito-morfologiche degli emociti di *Mytilus galloprovincialis*, provocate dalla presenza di sostanze inquinanti ha previsto l'impiego di una tecnica citologica denominata Diff Quick, utilizzata in campo veterinario e solo recentemente per analisi citologiche su cellule di invertebrato terrestre (Calisi *et al.*, 2008).

Il kit è costituito da soluzioni per la rapida colorazione delle cellule: una soluzione di fissativo (Fast Green in metanolo), una soluzione di colorante n°1 (Stain solution 1: Eosina G in buffer fosfato a pH 6.5) ed una soluzione di colorante n°2 (Stain solution 2: Tintura di Tiazina in buffer fosfato a pH 6.5). I campioni possono essere colorati in 15 secondi attraverso brevi e consecutive immersioni in tali soluzioni. L'intensità della colorazione può essere variata aumentando o diminuendo il numero di immersioni nei coloranti.

L'analisi è stata condotta su 10 pool di emolinfa per ciascuna condizione.

Polilisinatura dei vetrini

E' stata preparata una stock solution di polilisina sciogliendo 25 mg di polilisina in 100 ml di acqua distillata. La soluzione, stoccata in aliquote da 10 ml, è stata conservata a -20°C. Al momento dell'utilizzo ad ogni aliquota di polilisina è stato aggiunto un volume di 90 ml di acqua distillata. I vetrini, dopo essere stati lavati con alcool etilico al 96% e successivamente con acqua distillata, sono stati incubati per 1 ora e poi fatti asciugare a temperatura ambiente.

Colorazione dei campioni e analisi morfometrica

Per effettuare la colorazione degli emociti un volume di emolinfa (40 µl) è stato posizionato su un vetrino precedentemente polilisinato. Per permettere alle cellule di aderire alla superficie del vetrino il vetrino è stato incubato in camera umida a 14°C per 20 minuti. La soluzione in eccesso è stata poi drenata con della carta assorbente. Il vetrino è stato immerso in metanolo per tre minuti per fissare il campione. Il fissativo è stato eliminato con acqua distillata.

A questo punto il vetrino è stato sottoposto ad immersioni consecutive di 1 secondo nei tre coloranti del kit, in sequenza circa 5 volte nel Fast Green (fissativo), 9 volte nel colorante acido (Stain solution1) e 3 volte nel colorante basico (Stain solution 2).

Il vetrino così colorato è stato sciacquato con acqua distillata ed è stato lasciato asciugare all'aria. E' stato poi fissato un vetrino coprioggetti con Eukitt. Il preparato è stato osservato in microscopia ottica con ingrandimenti a 20X, 40X e 100X per la caratterizzazione cito-morfologica dei granulociti. Le immagini acquisite mediante una telecamera JVC TK-C1381 (Yokohama, Japan) collegata al microscopio NIKON Eclipse E600 (Tokio, Japan) sono state digitalizzate mediante il sistema di analisi di immagine LUCIA ® (Nikon, Tokio, Japan), che ha consentito di effettuare uno studio dimensionale dell'area delle cellule e dell'area del compartimento lisosomiale delle immagini 2D dei granulociti. Lo studio ha inoltre previsto un'indagine sui rapporti tra le due tipologie di area ottenute dalle immagini 2D dei granulociti.

Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media \pm E.S. di 10 repliche. Per verificare la significatività statistica dei risultati è stata effettuata un'analisi ANOVA a due vie con il software GraphPad PRISM versione 6.0 considerando come fattori di variabilità il "sito di traslocazione"(Brucoli; Rada di Augusta) e il "periodo di traslocazione"(Time 1; Time 2). Simboli utilizzati: *= P<0.05; **=P<0.01;***=P<0.001;****P<0.0001.

2.3.2.2.2. TEST DEI MICRONUCLEI SU EMOCITI

Il test dei micronuclei è stato effettuato sugli emociti di mitilo sulla base del protocollo descritto nel "manuale d'uso dei biomarkers" messo a punto nell'ambito dell'UNEP-MAP (United Nations Environment Programme – Mediterranean Action Plan) e raccomandato per il MED POL BIOMONITORING PROGRAMME (UNEP, 1999).

L'analisi è stata condotta su 10 pool di emolinfa per ciascuna condizione.

Polilisinatura dei vetrini

E' stata preparata una stock solution di polilisina sciogliendo 25 mg di polilisina in 100 ml di acqua distillata. La soluzione, stoccata in aliquote da 10 ml, è stata conservata a -20°C. Al momento dell'utilizzo ad ogni aliquota di polilisina è stato aggiunto un volume di 90 ml di acqua distillata. I vetrini, dopo essere stati lavati con alcool etilico al 96% e successivamente con acqua distillata, sono stati incubati per 1 ora e poi fatti asciugare a temperatura ambiente.

Colorazione dei campioni e analisi

Circa 40 μ l di emolinfa sono stati depositati su un vetrino polilisinato. Il vetrino è stato incubato in camera umida a 14°C per 20 minuti in modo da permettere agli emociti di aderire alle maglie create

dalla polilisinatura. Quindi la soluzione in eccesso è stata drenata e il vetrino è stato immerso in metanolo per tre minuti per fissare il campione. Il fissativo è stato eliminato con acqua distillata.

I vetrini sono stati incubati per 15 minuti con una working solution (1 µg/ml) della sonda fluorescente 4', 6-diamidino-2-fenylindole (DAPI). Sono stati poi sciacquati con acqua distillata, asciugati all'aria e montati con glicerolo contenente DABCO come "antifade agent".

Per ciascuna condizione sono state osservate 1000 cellule in microscopia confocale a fluorescenza C1 (Nikon) ad ingrandimento 100 X. I micronuclei sono stati conteggiati in base ai più comuni e accettati criteri di classificazione dei micronuclei: integrità del citoplasma cellulare, micronuclei che non toccano il nucleo principale, colore simile a quello del nucleo principale e dimensione non superiore ad 1/3 dei rispettivi nuclei principali (Venier *et al.*, 1997).

Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media ± E.S. di 10 repliche. Per verificare la significatività statistica dei risultati è stata effettuata un'analisi ANOVA a due vie con il software GraphPad PRISM versione 6.0 considerando come fattori di variabilità il "sito di traslocazione" (Brucoli; Rada di Augusta) e il "periodo di traslocazione" (Time 1; Time 2). Simboli utilizzati: *= P<0.05; **=P<0.01; ***=P<0.001; ****=P<0.0001.

2.3.2.2.3. CONCENTRAZIONE TISSUTALE DI METALLOTIONEINE

La concentrazione tissutale delle Metallothioneine è stata determinata in ghiandola digestiva di mitilo utilizzando il metodo spettrofotometrico descritto da Viarengo *et al.* (1997).

L'analisi è stata effettuata sui tessuti di 6 individui per ciascuna condizione.

Preparazione del campione

Per la preparazione del campione e le successive determinazioni spettrofotometriche sono state utilizzate le seguenti soluzioni:

Soluzione A: 0.5M buffer di saccarosio, 20 mM Tris-HCl, pH 8.6 (con HCl)

Soluzione B: 0.25 M NaCl pH 7

Soluzione C: HCl 1 N contenente EDTA 4 mM

Soluzione D: NaCl 2 M tamponato con Na₂HPO₄ 0.2 M, pH 8 (con Na₂HPO₄) contenente DTNB 0,43 mM (reattivo di Elmann)

Soluzione E: Tris 5 mM, EDTA 1 mM , pH 7

Il campione è stato omogeneizzato al politron nella soluzione A alla quale sono stati aggiunti 0.006 mM Leupeptina e 0.5 mM PMSF come agenti antiproteolitici e 0.01% β -mercaptoetanololo come agente riducente.

Gli agenti antiproteolitici servono a neutralizzare l'attività di proteasi presenti nelle cellule, mentre l'agente riducente impedisce la formazione di prodotti ad alto peso molecolare (> 20000 Dalton) formati da ponti disolfuro intermolecolari in seguito a reazioni di ossidazione delle metallotioneine.

L'omogenato è stato centrifugato a 30000 g per 20 minuti a 0-4°C. Il sovrinatante ottenuto è stato trattato con etanolo e cloroformio. Ad aliquote pari ad 1 μ l di sovrinatante sono stati addizionati metanolo assoluto (1.05 ml a -20°C) e cloroformio (80 μ l).

E' stata poi effettuata una centrifugazione a 6000 g per 10 minuti a 0-4°C. Al sovrinatante ottenuto sono stati addizionati 1 mg di acido ribonucleico (RNA), 40 μ l di HCl al 37% e 3 volumi di etanolo a -20°C. L'RNA (coprecipitante) e l'acidificazione (che destabilizza le metallotioneine) migliorano la precipitazione.

Il campione è stato incubato a -20°C per un'ora e quindi centrifugato a 6000 g per 10 minuti a 4°C usando un rotore a bracci oscillanti.

Le metallotioneine sedimentano in un pellet che è stato lavato con una soluzione etanolo all'87% / cloroformio 1% / tampone di omogeneizzazione, per eliminare contaminanti endogeni (GSH e cisteina) ed esogeni (agenti riducenti come il β -mercaptoetanololo) a basso peso molecolare.

Il campione è stato nuovamente centrifugato a 6000 g per 10 minuti utilizzando il rotore a bracci oscillanti. In tutte le fasi il campione è stato mantenuto ad una temperatura di 0-4°C.

Il pellet finale è stato essiccato sotto flusso di azoto.

Determinazione spettrofotometrica delle Metallotioneine

Il pellet, una volta lavorato ed essiccato, è stato risospeso in 150 μ l di NaCl 0,25 M.

A 150 μ l di pellet vengono aggiunti 150 μ l di HCl 1 N contenente EDTA 4 mM.

La concentrazione di metallotioneine contenuta nell'estratto è stata quantificata spettrofotometricamente con il reagente di Elmann (DTNB) (Elmann, 1958).

E' stato utilizzato GSH (glutatione ridotto) come standard per la costruzione della retta di taratura. Gli standard di GSH sono stati preparati da una "stock solution": GSH 1 mg/ml e TRIS 5 mM/ EDTA 1 mM a pH 7.

Il seguente schema può dare un'idea della preparazione della retta:

Bianchi	/	300 µl di TRIS 5 mM/EDTA 1 mM pH 7
Standard 10 µl	10 µl GSH stock solution	290 µl di TRIS 5 mM/EDTA 1 mM pH 7
Standard 20 µl	20 µl GSH stock solution	280 µl di TRIS 5 mM/EDTA 1 mM pH 7
Standard 40 µl	40 µl GSH stock solution	260 µl di TRIS 5 mM/EDTA 1 mM pH 7
Standard 60 µl	60 µl GSH stock solution	240 µl di TRIS 5 mM/EDTA 1 mM pH 7
Standard 80 µl	80 µl GSH stock solution	220 µl di TRIS 5 mM/EDTA 1 mM pH 7

Per ogni punto della retta sono stati aggiunti 4,2 ml di reattivo di Elmann.

La quantità di metallotioneine è stata calcolata assumendo un contenuto di cisteine nelle metallotioneine del mitilo pari al 29% (Mackay *et al.*, 1993). La concentrazione di metallotioneine in ghiandola digestiva è stata espressa come µg MT x g⁻¹ di peso fresco.

La centrifuga usata nel corso della preparazione è una "Beckman Coulter" con rotori "JA-25.50" a bracci fissi e "JS-13.1" a bracci oscillanti. Lo spettrofotometro usato è un "Beckman Coulter DU 640 U".

Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media ± E.S. di 6 repliche. L'analisi statistica è stata effettuata mediante test t-student per dati non appaiati (GraphPad PRISM versione 6.0). Simboli utilizzati: *=P<0.05; **=P<0.01;***=P<0.001;****P<0.0001.

2.3.2.2.4. ATTIVITA' DELL'ENZIMA ANIDRASI CARBONICA NEI TESSUTI GHIANDOLA DIGESTIVA, MANTELLO E BRANCHE

Per la determinazione dell'attività di Anidrasi Carbonica nei tessuti di ghiandola digestiva, mantello e branchie di *M. galloprovincialis* è stato utilizzato il metodo messo a punto da Lionetto *et al.* (2000).

Per ciascuna condizione sperimentale sono stati saggiati i tessuti ghiandola digestiva, mantello e branchie di 12 esemplari

Preparazione del campione per la determinazione di AC nei tessuti ghiandola digestiva, mantello e branchie

Il campione, una volta pesato, è stato omogeneizzato al politron in 5 volumi di (3.5 mM - 9.7 mM) HEPES-Tris pH 8.5 con aggiunta di PMSF 0.5 mM come agente antiproteolitico. La presenza di un agente antiproteolitico previene gli effetti degli enzimi proteolitici presenti nella cellula.

Prima di procedere ai saggi sono state determinate le concentrazioni proteiche ottimali per il dosaggio dell'attività enzimatica saggiando concentrazioni scalari di omogenati di ghiandola digestiva e di omogenati di branchie ottenuti rispettivamente da pool di 5 ghiandole, 5 mantelli e 5 branchie prelevate da organismi dello stock omogeneo di mitili impiegato per la sperimentazione al tempo 0, ovvero prima della traslocazione.

Dosaggio dell'attività enzimatica

Il metodo prevede la misura della variazione elettrometrica del pH di una miscela di reazione costituita da una miscela tamponata di (3.5 mM - 9.7 mM) HEPES-Tris pH 8.5 nella quale vengono aggiunti opportuni volumi di omogenato di tessuto (175µl per l'omogenato di ghiandola digestiva, 400 µl per l'omogenato di mantello, 600 µl per l'omogenato di branchie). La reazione è stata fatta partire con l'aggiunta di CO₂ come substrato. Per la misura del pH è stato impiegato un pH-metro Mettler Delta 350.

Per ogni dosaggio effettuato è stata prevista la rispettiva prova di controllo condotta nelle medesime condizioni della prova con l'omogenato di tessuto, ma con una miscela di reazione costituita da (3.5 - mM - 9.7 mM) Hepes-Tris pH 8.5 e acqua distillata.

Le miscele di reazione sono state termostate a 0°C per la durata della prova mediante criostato Ctioterm 190.

Il dosaggio del campione è stato effettuato in quattro repliche, mentre per il controllo sono state effettuate tre repliche.

Nei vari tessuti indagati l'attività enzimatica specifica indagata è stata espressa come Unità internazionale di enzima per grammo di tessuto fresco.

Una "Unità internazionale di enzima" viene definita come la quantità di enzima che causa la trasformazione di una μ mole di substrato al minuto.

Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media \pm E.S. di 12 repliche. Per verificare la significatività statistica dei risultati è stata effettuata un'analisi ANOVA a due vie con il software GraphPad PRISM versione 6.0 considerando come fattori di variabilità il "sito di traslocazione"(Brucoli; Rada di Augusta) e il "periodo di traslocazione"(Time 1; Time 2). Simboli utilizzati: *= P<0.05; **=P<0.01;***=P<0.001;****P<0.0001.

2.3.2.2.5. STUDIO DEL RUOLO FISILOGICO DI ANIDRASI CARBONICA IN GHIANDOLA DIGESTIVA DI MITILO

L'ipotesi sperimentale che l'enzima anidraasi carbonica giochi un ruolo nell'attivazione lisosomiale indotta in ghiandola digestiva dall'esposizione a contaminanti è stata indagata mediante una tecnica spettrofluorimetrica basata sulla marcatura con LysoSensorTM Green DND-189 in uno studio *in vivo* in condizioni controllate di laboratorio.

2.3.2.2.5. STUDIO *in vivo* IN CONDIZIONI CONTROLLATE DI LABORATORIO

Uno stock omogeneo di 30 esemplari di *M. galloprovincialis* (lunghezza valve pari a 6.6 ± 0.5 ; larghezza valve pari a 3.5 ± 1) reperito presso l'impianto di mitilocoltura "Marevivo" di Castro (LE) è stato suddiviso in due gruppi da 15 individui.

Il primo gruppo è stato trattato con acetazolamide, inibitore specifico dell'enzima anidraasi carbonica, alla concentrazione finale di 50 mg/l mentre il secondo gruppo, utilizzato come controllo, è stato incubato nelle medesime condizioni e per lo stesso intervallo di tempo, ma in assenza dell'inibitore.

I due gruppi sono stati incubati per 48 ore in condizioni controllate e costanti di laboratorio, ovvero temperatura pari a $15 \pm 1^\circ\text{C}$, salinità pari a 35 ‰, regime luce/buio 12h/12h. Al termine del periodo di esposizione da 5 individui prelevati da ciascuna vasca sono dissezionate le ghiandole digestive, immediatamente sottoposte ad analisi.

Dissociazione delle cellule della ghiandola digestiva

Le ghiandole sono state pesate e sottoposte a due lavaggi in 10 ml di una soluzione priva di calcio e magnesio di CMFS buffer 1100 mOsm pH 7.3 (HEPES 5.2 g/l; NaCl 29.22 g/L, KCl 0.93 g/l, EDTA 1.86 g/l).

Dopo il lavaggio le ghiandole sono state poste in un beaker contenente 40 ml di CMFS buffer, tagliate in pezzi di circa 2 mm e poste in agitazione su un agitatore magnetico per 30 minuti.

La sospensione cellulare ottenuta è stata filtrata con mesh da 100 μm e da 50 μm .

E' stata effettuata una centrifuga a 200 g per 5 minuti a 10°C (con rotore a bracci oscillanti) e il pellet è stato risospeso in CMSF buffer.

A 500 μl di cellule per ciascuna condizione sperimentale sono stati addizionati 5 μl di madre di LysoSensorTM Green DND-189 (1 mM in DMSO di madre acquistata è stata diluita 1:10 in CMFS buffer).

Le eppendorf contenenti le cellule e la sonda sono poi state incubate al buio per 30 minuti su piastra oscillante.

Successivamente le cellule sono state centrifugate a 10000 g e il pellet è stato risospeso in 500 μl di CMFS. Le sospensioni cellulari ottenute sono state utilizzate per l'analisi in microscopia a fluorescenza mediante il microscopio Eclipse TE300 (Nikon) e per le letture fluorimetriche su micropiastra.

Letture fluorimetriche

La piastra multipozzetto (da 96 pozzetti) è stata allestita caricando le seguenti prove sperimentali:

- CMFS buffer;
- cellule non caricate con LysoSensorTM Green DND-189 (per la valutazione dell'autofluorescenza);
- cellule caricate con lysosensor green. Nello specifico 1 pozzetto con 300 μl di cellule e 2 pozzetti contenenti rispettivamente 100 μl di cellule e 200 μl di CMFS buffer.

Le letture sono state effettuate ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 443 nm ed una lunghezza d'onda di emissione di 505 nm. Il fluorimetro impiegato è Synergy mx (BioTek)

Il dato è stato normalizzato sulla concentrazione di proteine ed espresso come Unità di fluorescenza $\times \text{mg}^{-1}$ di proteine. Su ogni replica è stato effettuato un dosaggio proteico utilizzando il kit "QuantiPro BCA Assay Kit" (Sigma). Il kit si avvale della capacità dell'acido bicinconinico (BCA)

di formare complessi concentrati in condizioni alcaline. BCA forma in ambienti alcalini un complesso stabile di colore blu-viola con il Cu^{1+} . Cu^{1+} deriva dalla riduzione di Cu^{2+} in Cu^{1+} , l'importo della quale è proporzionale alla proteina presente.

Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media \pm E.S. di 3 repliche. Per verificare la significatività statistica dei risultati è stato utilizzato il test t di Student per dati non appaiati. Il test è stato eseguito mediante il software per l'analisi statistica dei dati GGraphPad Prism versione 6.0. Simboli utilizzati: *= $P < 0.05$; **= $P < 0.01$; ***= $P < 0.001$; ****= $P < 0.0001$.

2.4. ABBREVIAZIONI

Le abbreviazioni utilizzate per i composti utilizzati in laboratorio sono le seguenti:

E.S. :errore standard

BCA acido bicinconinico

HEPES: Acido 2-[4-(2-idrossietil)piperazinil-(1)]-etansolfonico

DMSO: Dimetilsulfossido

TRIS: Tris(idrossimetil)-amminometano

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoride

DTNB: Acido-Ditio-bis-nitrobenzoico

EDTA: Acido etilendiamminotetraacetico

GSH: Glutatione ridotto

ACTZ: N-[-5-Sulfamoyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl] acetamide

K_2HPO_4 : fosfato bipotassico

DABCO: 1,4-diazobicyclo[2.2.2]octane

2. RISULTATI

3.1. FASI DI STUDIO

Ai fini del raggiungimento degli obiettivi preposti, il presente lavoro di tesi ha previsto due fasi di studio:

I FASE: Identificazione e validazione di una batteria di saggi ecotossicologici acuti integrata ad un bioassay *in vitro* in grado di valutare il livello di contaminazione chimica dei sedimenti marino-costieri.

II FASE: sviluppo e validazione di nuovi biomarker citologici e molecolari di stress chimico in un approccio multimarker basato sull'impiego dell'organismo bioindicatore *M. galloprovincialis*.

3.2 I FASE

Obiettivo della I fase dello studio è stato identificare e valutare il potenziale applicativo in campo di una batteria di saggi ecotossicologici acuti integrata ad un bioassay *in vitro* in grado di fornire uno screening degli hot spot di contaminazione dei sedimenti marino-costieri.

Diverse tipologie di saggio sono state prese in esame al fine di stimarne la validità rispetto all'effettiva significatività biologica e a parametri operativi quali rapidità, semplicità di esecuzione, ripetibilità, costo, variabilità (fattori fisico-chimici, fattori naturali e fattori relativi al campionamento ed all'esecuzione del saggio), standardizzazione, applicabilità (specificità regionale, disponibilità delle specie test), sensibilità, potere discriminatorio, utilità ai fini dello sviluppo di standard operativi.

L'analisi dei criteri di selezione della tipologia di saggio, degli *endpoint*, delle matrici e degli organismi test ha portato alla proposta di una batteria composta da un saggio di inibizione della bioluminescenza con il batterio marino *Vibrio fischeri* condotto sulla matrice sedimento intero (Microtox su fase solida) e su elutriato ottenuto da sedimento (Microtox su fase liquida), un saggio di mortalità con il rotifero *Brachionus plicatilis* su elutriato di sedimento e da un bioassay *in vitro*, recentemente brevettato presso il Laboratorio di Fisiologia Generale e Ambientale dell'Università del Salento (brevetto n. MI2008A008813), basato sulla misura dell'attività dell'enzima anidrase carbonica estratta da eritrociti bovini e condotto su elutriato di sedimento.

Al fine di valutarne la capacità di discriminare diversi gradi di inquinamento, la batteria individuata è stata applicata al sedimento tal quale prelevato dall'area a forte impatto antropico, la Rada di Augusta, ed a campioni dello stesso sedimento sottoposti a diversi livelli di bioremediation.

I campioni di sedimento provenienti dalla Rada di Augusta sono stati forniti dall'Istituto per l'ambiente marino-costiero IAMC-CNR di Messina nell'ambito di una collaborazione esterna del Laboratorio di Fisiologia Generale e Ambientale con l'Istituto stesso.

Il sedimento A corrisponde a repliche di campione di sedimento campionate nel sito, mentre gli altri quattro, 3B-T30, 1B-T30, 4B-T30, 2B-T30, corrispondono a sedimenti sottoposti a diversi processi di bioremediation, con una percentuale di abbattimento della concentrazione di idrocarburi compresa tra il 30% e il 70% secondo i dati forniti dall'IAMC-CNR a corredo dei campioni.

Sulla base della tipologia di trattamento di bioremediation subito (fisico, chimico e biologico) e del livello di intervento è possibile individuare, per i campioni di sedimento analizzati, il seguente

gradiente di contaminazione: A (non trattato) > 1B-T30 (trattamento fisico) > 4B-T30 (trattamento fisico e aggiunta di nutrienti) > 2B-T30 (trattamento fisico, microbiologico e aggiunta di nutrienti) > 3B-T30 (trattamento fisico, microbiologico e aggiunta di nutrienti).

I saggi sono stati condotti su sedimento intero e su elutriati estratti dal sedimento secondo la metodica EPA (2001) in acqua marina sintetica di salinità pari a 33,3‰ preparata secondo la metodica EPA (1985).

3.2.1. BATTERIA DI BIOASSAY

3.2.1.1. SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA BIOLUMINESCENZA SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO

Il saggio consente di valutare la tossicità acuta di elutriati estratti dai sedimenti utilizzando come risposta l'eventuale inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dai batteri marini della specie *Vibrio fischeri*. Il test è stato eseguito secondo il protocollo Microtox® Basic Test (AZUR Environmental, 1998), che prevede l'esposizione di una popolazione monospecifica di batteri della specie *V. fischeri* al 90% del campione tal quale per 5, 15 e 30 minuti. Il saggio è stato effettuato sugli elutriati A, 1B-T30, 4B-T30, 2B-T30, 3B-T30 utilizzando come sostanza tossica di riferimento il fenolo. Per ciascun campione sono state eseguite tre letture di bioluminescenza dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione. I risultati del test sono stati espressi in termini di riduzione percentuale di bioluminescenza come media delle letture effettuate (Figura 12).

Il test ha evidenziato in generale una scarsa tossicità dei campioni esaminati, con una percentuale di effetto massima pari a 17,8% dopo 15 minuti di esposizione e 13,3% dopo 30 minuti di esposizione osservata per l'elutriato ottenuto dal campione A.

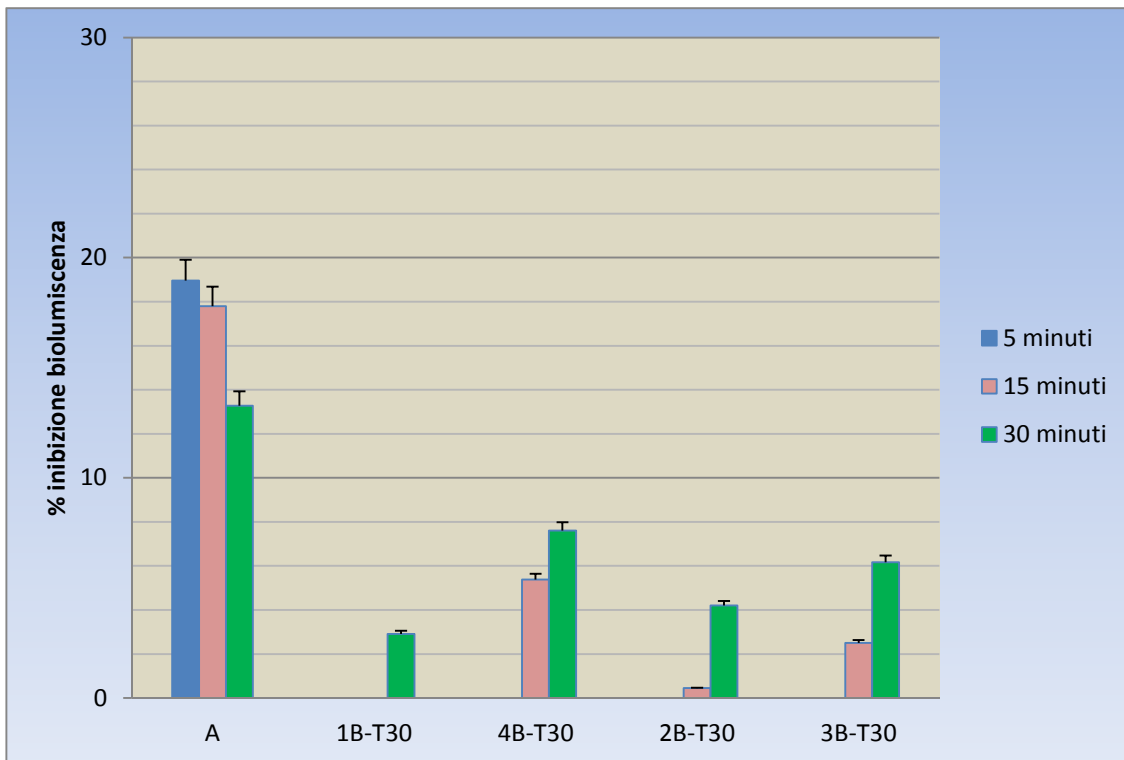


Figura 12. Inibizione della bioluminescenza osservata dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione agli elutriati ottenuti dai campioni di sedimento A, 1B-30, 4B-T30, 2B-T30, 3B-T30. I dati sono espressi come media \pm E.S. ($n=3$).

L'esecuzione del saggio ha previsto la verifica che i criteri di validità richiesti dal metodo fossero soddisfatti. Per il controllo del batch di reazione è stata valutata l'inibizione ottenuta esponendo i batteri per 30 minuti a 3,4 mg/L del tossico di riferimento 3,5-diclorofenolo, ottenendo una percentuale di effetto pari a 72%, conforme al criterio di validità del test che richiede che sia compresa tra il 20% e l'80%.

3.2.1.2. SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA BIOLUMINESCENZA SU SEDIMENTO INTERO

Sul campione intero del sedimento A, il cui elutriato ha riportato la più alta tossicità nel saggio su fase liquida e sul campione intero del sedimento 1B-T30, il cui elutriato aveva, invece, manifestato le più basse percentuali di effetto è stato poi condotto un saggio di inibizione della bioluminescenza di *Vibrio fischeri* sulla fase solida.

Il saggio è stato eseguito secondo il protocollo operativo Microtox ® Solid-Phase Test (AZUR Environmental, 1998b), che permette di saggiare diluizioni seriali del campione tal quale (13 diluizioni a partire dal 99% del campione). Il metodo prevede che gli organismi test entrino a diretto contatto con il campione solido in soluzione acquosa, consentendo di determinare la tossicità del materiale non in sospensione. Per ciascun campione sono state eseguite tre letture di

bioluminescenza dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione. La percentuale di riduzione della bioluminescenza è stata ottenuta dalla media delle letture effettuate.

In Figura 13 è riportata la percentuale di effetto osservata saggiando il sedimento A mediante il protocollo Microtox ® Solid-Phase Test e la percentuale di effetto misurata nel saggio Microtox ® Basic Test condotto sull'elutriato ottenuto dal campione.

In Figura 14 analogamente a quanto riportato sopra, sono state messe in relazione l'inibizione percentuale osservata saggiando la fase solida e quella osservata saggiando la fase liquida per il campione 1B-T30.

Per entrambi i campioni si è osservata una notevole discrepanza tra le tossicità ottenute saggiando le due tipologie di matrice.

L'inibizione percentuale massima della luminescenza è stata osservata per entrambi i test ed entrambi i campioni dopo 30 minuti di esposizione.

Per il campione A l'esposizione al sedimento intero ha determinato un'inibizione pari a 71,7%, mentre l'effetto osservato saggiando il campione di elutriato risulta pari a 13,27% (Fig. 13).

Per il campione 1B-T30 l'inibizione seguita all'esposizione al sedimento intero è risultata pari a 94,58% , mentre l'inibizione determinata dall'elutriato è risultata pari a 2,91% (Fig. 14).

Nella comparazione dei risultati ottenuti nei due saggi occorre considerare che le percentuali di effetto fornite dal saggio su sedimento intero si riferiscono ad una concentrazione del campione tale quale pari a 197400 mg/L (corrispondente al 99.01% del campione), mentre le percentuali osservate nel saggio su elutriato sono riferite al 90% del campione.

L'esecuzione del saggio ha previsto la verifica che i criteri di validità richiesti dal metodo fossero soddisfatti.

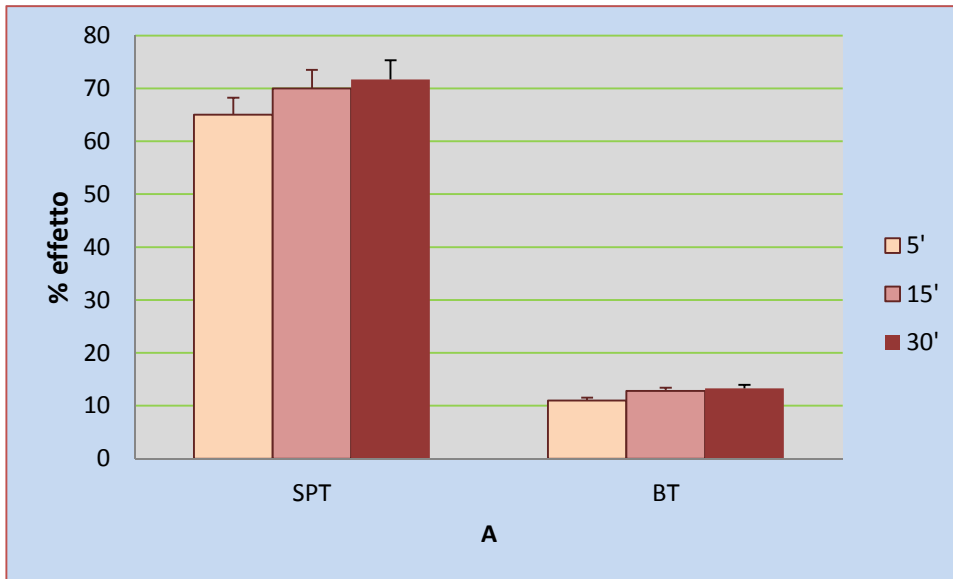


Figura 13. Inibizione della bioluminescenza osservata dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione dei batteri al campione di sedimento A tal quale secondo il protocollo di saggio Microtox Solid-Phase Test (SPT) e all'elutriato del sedimento A secondo il protocollo di saggio Microtox Basic Test (BT). I dati sono espressi come media \pm E.S. ($n=3$).

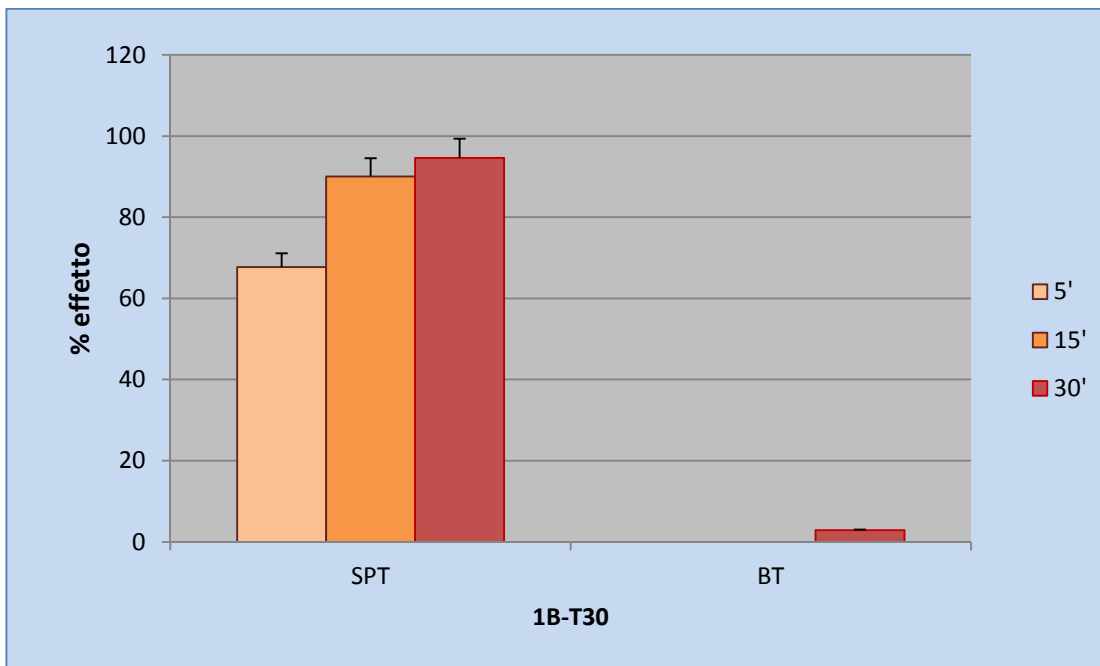


Figura 14. Inibizione della bioluminescenza osservata dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione dei batteri al campione di sedimento 1B-T30 tal quale secondo il protocollo di saggio Microtox Solid-Phase Test (SPT) e all'elutriato del sedimento 1B-T30 secondo il protocollo di saggio Microtox Basic Test (BT). I dati sono espressi come media \pm E.S. ($n=3$).

3.2.1.3. SAGGIO DI MORTALITA' CON *Brachionus plicatilis* SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO

Il saggio di tossicità acuta con il rotifero marino *Brachionus plicatilis* è stato condotto sugli elutriati dei campioni A, 1B-T30, 4B-T30, 2B-T30, 3B-T30, utilizzando il bicromato di potassio come sostanza tossica di riferimento ed effettuando il conteggio degli organismi immobili o morti dopo 24 e 48 ore di esposizione.

Il saggio ha riportato una sensibilità modesta per i campioni analizzati, come dimostra la mortalità rispetto ai controlli osservata a 24 e 48 ore (Figura 15). Un solo campione, l'elutriato del sedimento 2B-T30, ha mostrato una tossicità elevata, causando la morte di tutti gli organismi dopo 48 ore di esposizione. Nell'esecuzione del test è stato verificato il criterio di validità richiesto, ovvero che la % di mortalità nel controllo risultasse inferiore al 10%.

Il saggio è stato condotto secondo il protocollo operativo standard ROTOXKIT M (MicroBioTest Inc.), a sua volta basato sul protocollo ASTM 1440 (1991 rev.1998).

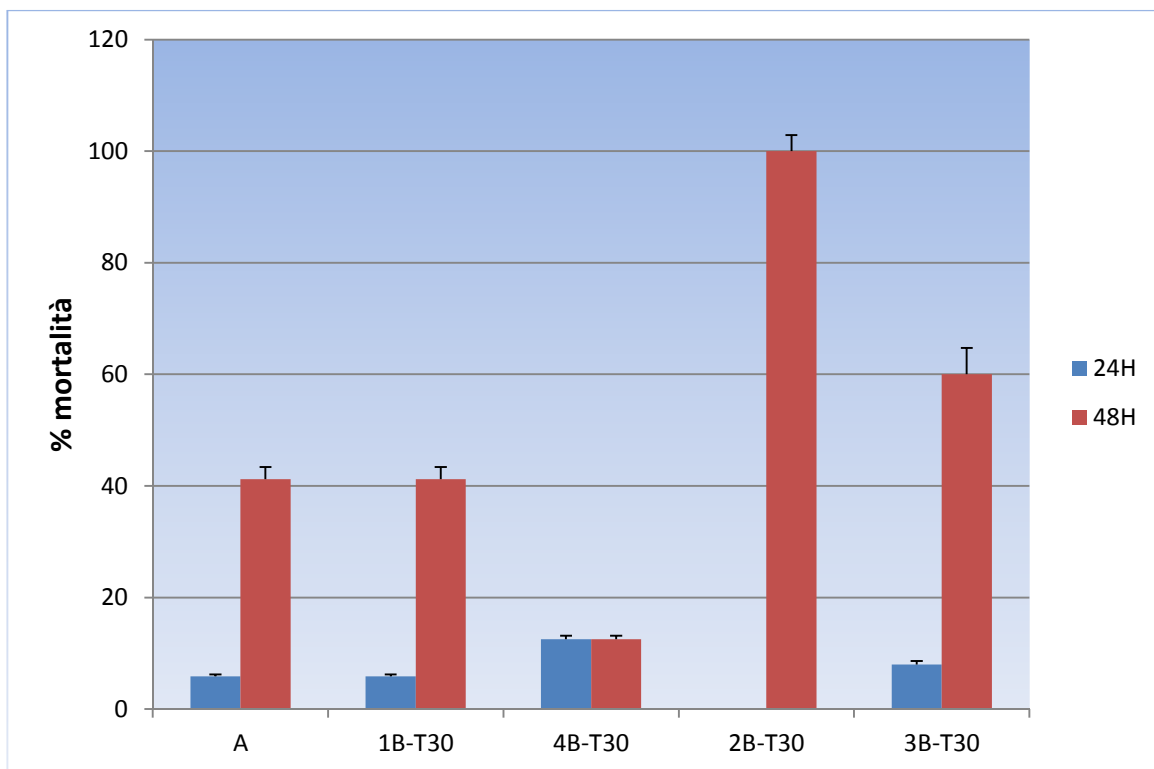


Figura 15. Valori della percentuale di mortalità di *Brachionus plicatilis* osservata dopo 24 e 48 ore di esposizione agli elutriati estratti dai campioni di sedimento a diversa tossicità A, 1B-T30, 4B-T30, 2B-T30, 3B-T30. I dati sono espressi come media \pm E.S. (n=3).

3.2.1.4. SAGGIO DI INIBIZIONE DELL'ATTIVITA' DELL'ENZIMA ANIDRASI CARBONICA SU ELUTRIATO DI SEDIMENTO

Il saggio prevede la misura mediante metodo elettrometrico dell'attività dell'enzima anidrasi carbonica estratto da eritrociti bovini esposto a elutriato di sedimento (brevetto n. MI2008a008813 del Laboratorio di Fisiologia Generale e Ambientale dell'Università del Salento).

I risultati osservati applicando il saggio agli elutriati a diversa tossicità $A > 1B-T30 > 4B-T30 > 2B-T30 > 3B-T30$ evidenziano una % di effetto massima per il campione A, confermando il potere discriminatorio del bioassay nei confronti della tossicità dei sedimenti (Fig. 16).

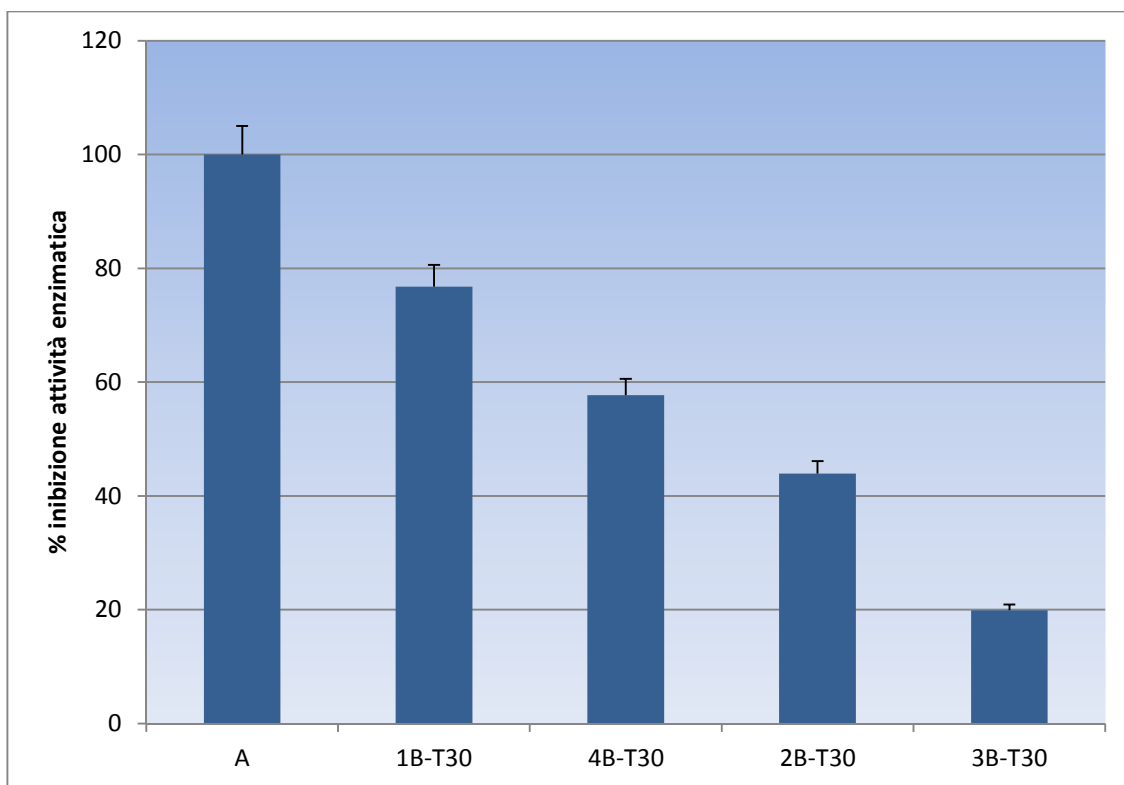


Figura 16. Valori dell'inibizione dell'attività dell'enzima AC osservata in seguito ad esposizione agli elutriati estratti dai campioni di sedimento a diversa tossicità A, 1B-T30, 4B-T30, 2B-T30, 3B-T30. I dati sono espressi come media \pm E.S. (n=3).

3.3. II FASE

La batteria individuata si propone di indagare il potenziale applicativo di biomarker molecolari e cellulari innovativi rappresentati da alterazioni morfometriche dei granulociti, attivazione lisosomiale e induzione dell'enzima anidraasi carbonica nei tessuto ghiandola digestiva, mantello e branchie parallelamente a biomarker standardizzati quali concentrazione di metallotioneine in ghiandola digestiva e frequenza dei micronuclei in emociti.

Sono state condotte una campagna di traslocazione invernale (novembre-dicembre 2013) ed una campagna di traslocazione estiva (giugno-luglio 2014) nell'ambito del progetto PRIN prot. 2010ARBLT7 dal titolo "La System Biology nello studio degli effetti di xenobiotici in organismi marini per la valutazione dello stato di salute dell'ambiente: applicazioni biotecnologiche per potenziali strategie di ripristino". Il progetto ha previsto contemporaneamente campagne di traslocazione di mitili lungo la costa siciliana orientale (sito di Augusta e di Brucoli) e lungo la costa campana (sito di Bagnoli). Il presente lavoro di tesi ha focalizzato l'attenzione sulla campagna di traslocazione lungo la costa siciliana.

Per ciascuna campagna gli esperimenti sono stati condotti su uno stock omogeneo di mitili della specie *M. galloprovincialis*. Dopo un periodo di acclimatazione di 2 settimane presso l'Istituto per l'ambiente marino costiero (IAM-CNR), lo stock è stato suddiviso in due gruppi: il primo è stato traslocato nel sito di Brucoli (SR) (sito di controllo), il secondo per lo stesso periodo di tempo nel sito ad impatto antropico Rada di Augusta (SR).

L'operazione di traslocazione è stata eseguita mediante l'ausilio di sub professionisti in apposite gabbie ancorate alla roccia ad una profondità di circa cinque metri. Gli organismi sono stati mantenuti in esposizione per un intervallo di tempo di 45 giorni, al termine del quale gli organismi sono stati prelevati per il dosaggio dei biomarker.

Per ciascuna campagna al termine del periodo di traslocazione sono stati prelevati circa 50 esemplari da ciascun gruppo, dai quali sono stati dissezionate:

- le ghiandole digestive per il dosaggio dell'attività dell'enzima anidraasi carbonica e, limitatamente ai campioni relativi alla campagna estiva, per la determinazione dei livelli di metallotioneine.
- i mantelli per il dosaggio dell'attività di AC;
- le branchie per il dosaggio dell'attività di AC.

E' stato effettuato il prelievo dell'emolinfa per lo studio delle alterazioni morfometriche dei granulociti e per l'analisi della frequenza dei micronuclei.

3.3.1. BATTERIA DI BIOMARKER

3.3.1.1. ALTERAZIONI MORFOMETRICHE DEI GRANULOCITI

Lo studio delle variazioni morfometriche dei granulociti in risposta alla traslocazione nel sito ad impatto antropico ha previsto l'analisi, per ciascun sito di traslocazione, di 10 pool di emolinfa prelevata dai mitili esposti, ciascun pool ottenuto da 10 esemplari.

I granulociti colorati con Diff Quick ® sono stati osservati utilizzando il microscopio ottico Eclipse E600 (NIKON, Tokio, Japan) con obiettivo 100X ad immersione, mentre le immagini acquisite mediante la fotocamera JVC-TK-1381 (Yokohama, Japan) a questo collegata, sono state digitalizzate mediante il sistema di analisi di immagine LUCIA ® (NIKON, Tokio, Japan). Il software LUCIA calcola automaticamente l'area dei granulociti e l'area dei lisosomi a partire dalle immagini bidimensionali digitalizzate. Approssimativamente sono state analizzate circa 80 cellule per campione.

La colorazione mediante Diff-Quick ® consente una chiara osservazione della morfologia degli emociti di mitilo in microscopia ottica (Figura 17a e 17b): i nuclei presentano una colorazione blu-viola, il compartimento lisosomiale assume una colorazione rosso-rosa.

In Figura 17 sono riportate immagini rappresentative di un granulocita di mitilo esposto per 45 giorni nel sito di riferimento di Brucoli (a) e di un granulocita di mitilo esposto per lo stesso intervallo di tempo in Rada di Augusta (b). Le immagini sono relative alla campagna di traslocazione effettuata nel periodo novembre-dicembre 2013

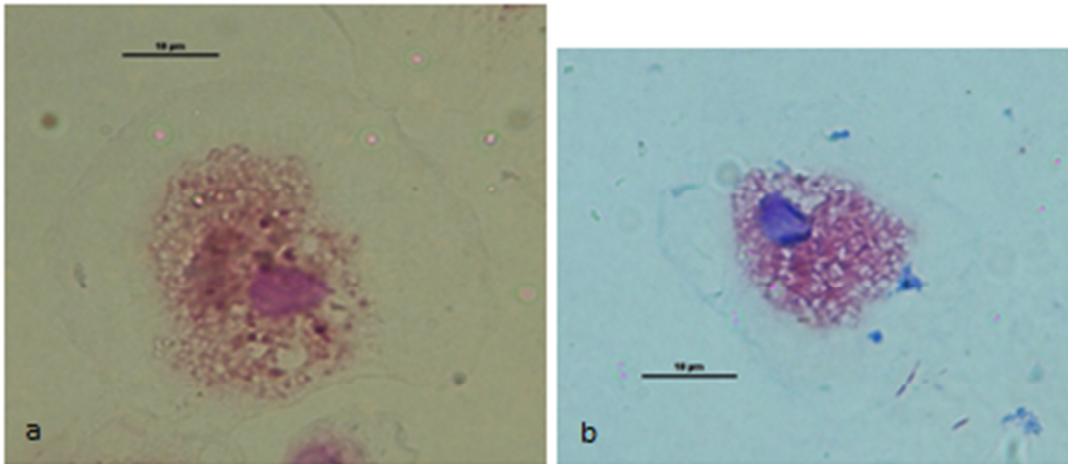


Figura 17. Granulocita di organismo di controllo esposto per 45 giorni nel sito di riferimento di Brucoli (a) e granulocita di mitilo esposto per lo stesso intervallo di tempo in Rada di Augusta (b). Le immagini si riferiscono alla campagna invernale di traslocazione (Time 1). Colorazione con Diff Quick® (Dade Behering, Newark, NJ, USA) e osservazione in microscopia ottica. Obiettivo 100X ad immersione. La barra dimensionale è di 10µm.

3.3.1.1.1. Area dei granulociti

Le immagini evidenziano un significativo incremento dell'area dei granulociti negli organismi traslocati nel sito impattato (Fig. 17b).

In Figura 18 è riportata l'area cellulare calcolata su immagini 2D digitalizzate dei granulociti di mitili di controllo esposti per 45 giorni nel periodo novembre-dicembre 2013 e nel periodo giugno-luglio 2014 nel sito di riferimento di Brucoli e l'area cellulare calcolata su immagini 2D digitalizzate di granulociti di mitili esposti per lo stesso periodo nel sito ad impatto antropico Rada di Augusta.

L'analisi dimensionale conferma, per entrambe le campagne di traslocazione, il significativo incremento dell'area cellulare dei granulociti dei mitili esposti nel sito impattato rispetto agli organismi di controllo suggerito dalle micrografie in Figura 17.

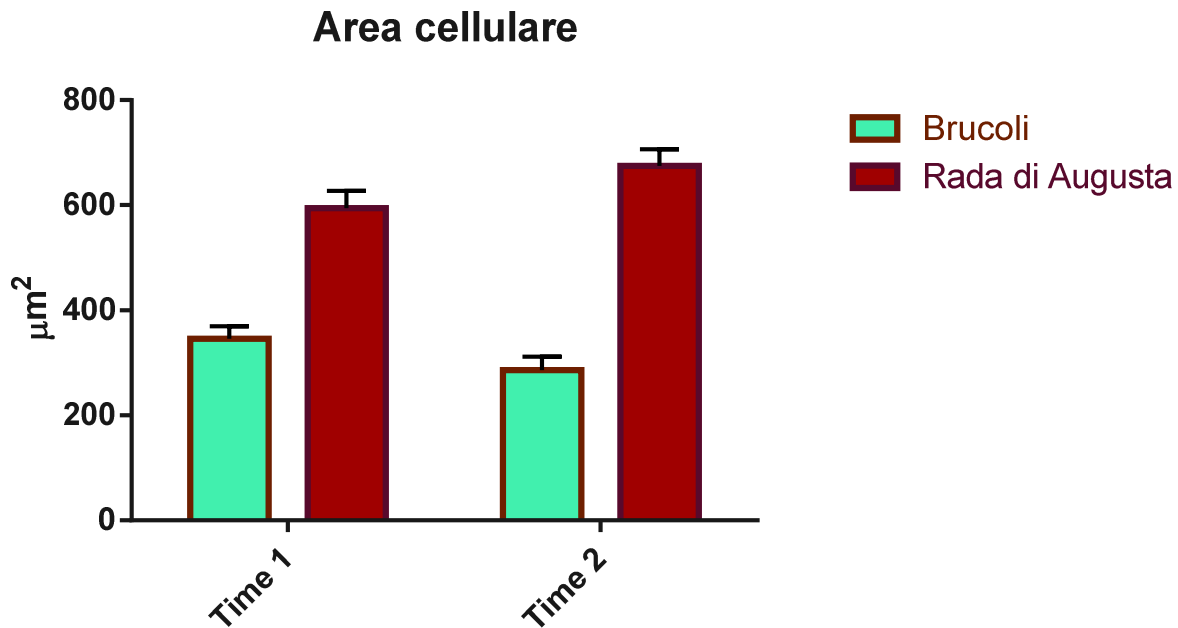


Figura 18. Area cellulare (espressa in μm^2) delle immagini 2D digitalizzate di granulociti di mitili traslocati per 45 giorni in Rada di Augusta e di mitili di controllo traslocati nel sito di riferimento di Brucoli. I dati si riferiscono alle due campagne di traslocazione: giugno-luglio 2013 (Time 1) e novembre-dicembre 2014 (Time 2). Colorazione con Diff Quick® (Dade Behring, Newark, NJ, USA) e osservazione in microscopia ottica. Obiettivo 100X ad immersione. I dati sono espressi come media \pm E.S. ($n=10$).

L'analisi statistica dei dati effettuata mediante ANOVA a due vie con il software GraphPad PRISM versione 6.0 ha considerato come fattori di variabilità il "sito di traslocazione" e il "periodo di traslocazione". L'analisi ha evidenziato un effetto significativo ($P < 0.0001$) dell'esposizione al sito ad impatto antropico sull'aumento delle dimensioni dei granulociti ed un effetto significativo dell'interazione tra i due fattori di variabilità considerati (Tab. 5.).

Tabella 5. Two-way ANOVA eseguita sui dati relativi alle aree cellulari delle immagini 2D digitalizzate dei granulociti dei mitili traslocati in Rada di Augusta e nel sito di Brucoli. S.S.= somma degli scarti al quadrato D.F.= gradi di libertà; M.S.=media degli scarti al quadrato; P.=probabilità.

Sorgente di variabilità	SS	DF	MS	P value
Interazione	538090	1	538090	P = 0.0144
Periodo di traslocazione	11297	1	11297	P = 0.7220
Sito di traslocazione	11140000	1	11140000	P < 0.0001
Residuo (errore)	39840000	447	89133	

3.3.1.1.2. Area lisosomiale

Il secondo aspetto dimensionale considerato e sottoposto a quantificazione è l'area delle immagini 2D digitalizzate dei lisosomi. Per entrambe le campagne lo studio della morfologia dei granulociti ha evidenziato un incremento dell'area lisosomiale, come è possibile osservare nell'istogramma in Figura 19, dove è riportata l'area lisosomiale (espressa come μm^2) misurata nei granulociti di mitili esposti per 45 giorni nel sito Rada di Augusta e di mitili di controllo esposti per lo stesso intervallo di tempo nel sito di riferimento di Brucoli.

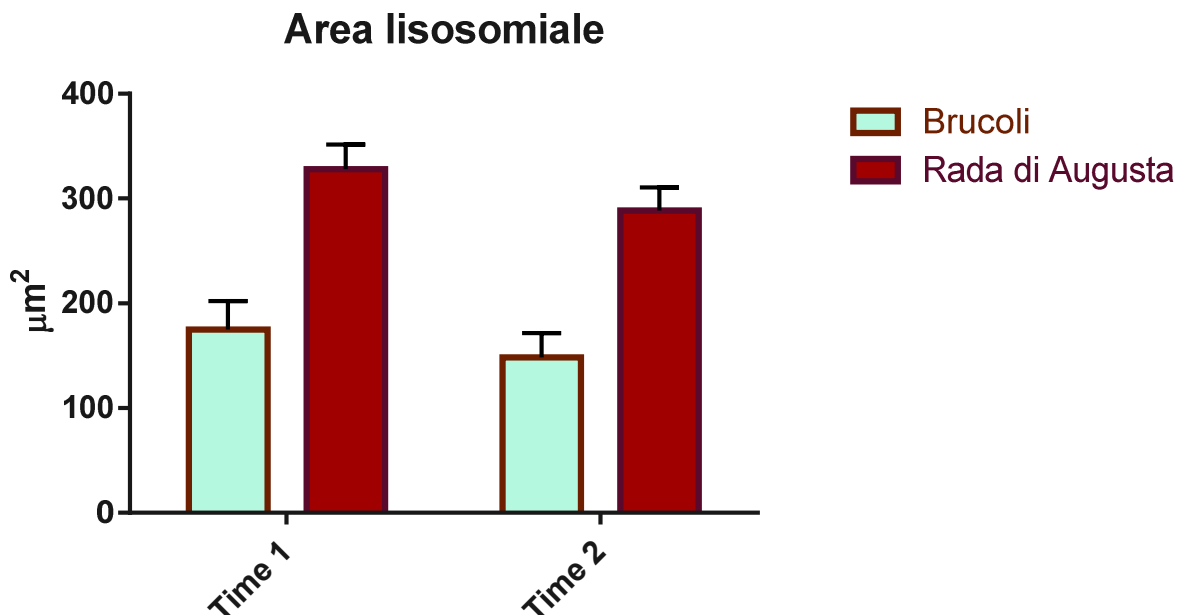


Figura 19. Area lisosomiale (espressa in μm^2) delle immagini 2D digitalizzate di granulociti di mitili traslocati per 45 giorni in Rada di Augusta e di mitili di controllo traslocati nel sito di riferimento di Brucoli. I dati si riferiscono alle due campagne di traslocazione: giugno-luglio 2013 (Time 1) e novembre-dicembre 2014 (Time 2). Colorazione con Diff Quick® (Dade Behring, Newark, NJ, USA). Osservazione in microscopia ottica; obiettivo100X ad immersione. I dati sono espressi come media \pm E.S. (n=10).

L'analisi statistica dei dati effettuata mediante ANOVA a due vie con il software GraphPad PRISM versione 6.0 ha considerato come fattori di variabilità il "sito di traslocazione" e il "periodo di traslocazione". L'analisi ha evidenziato un effetto significativo ($P < 0.0001$) dell'esposizione al sito ad impatto antropico sull'aumento delle dimensioni dei granulociti, mentre non appare significativa l'interazione tra le due fonti di variabilità valutate (Tab.6).

Tabella 6. ANOVA a due vie eseguita sui dati relativi alle aree lisosomiali delle immagini 2D digitalizzate dei granulociti dei mitili traslocati in Rada di Augusta e nel sito di Brucoli. S.S.= somma degli scarti al quadrato D.F.= gradi di libertà; M.S.=media degli scarti al quadrato; P.=probabilità.

Sorgente di variabilità	SS	DF	MS	P value
Interazione	5138	1	5138	P = 0.7882
Periodo di traslocazione	119743	1	119743	P = 0.1950
Sito di traslocazione	2356000	1	2356000	P < 0.0001
Residuo (errore)	31780000	447	71094	

3.3.1.1.3. Rapporto area lisosomiale/area cellulare dei granulociti

L'analisi morfometrica ha inoltre permesso di evidenziare, in entrambe le campagne di traslocazione, un andamento costante del rapporto area lisosomiale/area cellulare nei granulociti dei mitili esposti in Rada di Augusta e nel gruppo di controllo come è possibile osservare in Figura 20, dove è riportato il rapporto tra le aree calcolato su immagini 2D digitalizzate nei granulociti di mitili esposti per 45 giorni in Rada di Augusta e il rapporto misurato su immagini 2D digitalizzate nei granulociti di mitili di controllo esposti per lo stesso intervallo di tempo nel sito di Brucoli.

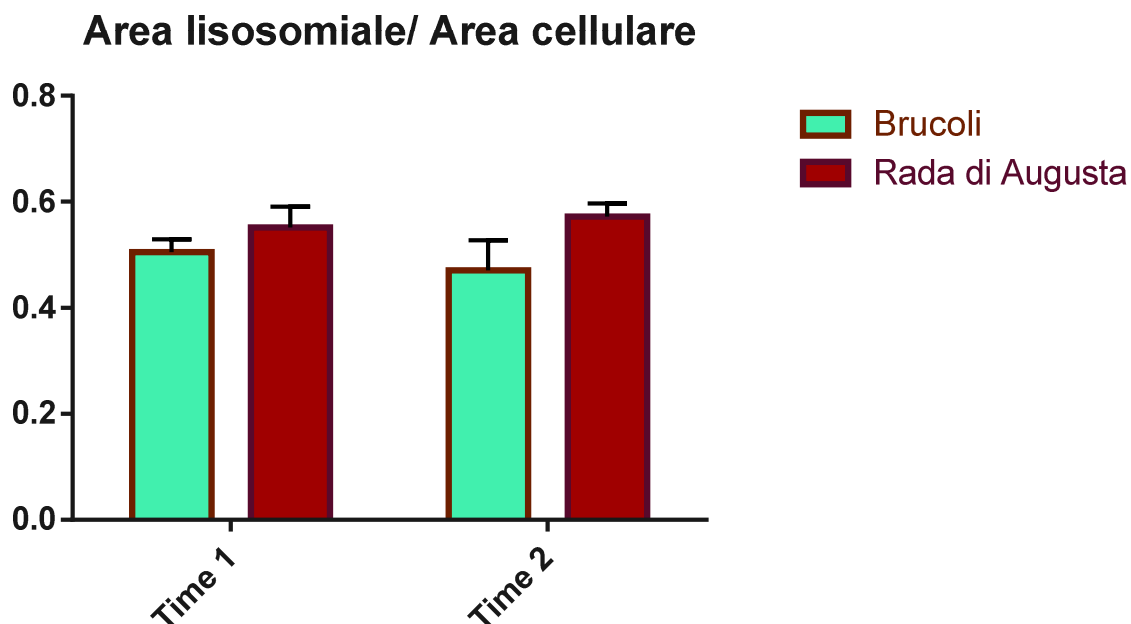


Figura 20. Rapporto area lisosomiale/area cellulare delle immagini 2D digitalizzate di granulociti di mitili traslocati per 45 giorni in Rada di Augusta e di mitili di controllo traslocati nel sito di riferimento di Brucoli. I dati si riferiscono alle due campagne di traslocazione: giugno-luglio 2013 (Time 1) e novembre-dicembre 2014 (Time 2). Colorazione con Diff Quick® (Dade Behring, Newark, NJ, USA). Osservazione in microscopia ottica; obiettivo100X ad immersione. I dati sono espressi come media \pm E.S. (n=10).

L'analisi statistica dei dati effettuata mediante ANOVA a due vie con il software GraphPad PRISM versione 6.0 ha considerato come fattori di variabilità il “sito di traslocazione” e il “periodo di traslocazione”. L'analisi ha confermato un effetto non significativo dell'esposizione al sito ad impatto antropico sull'aumento del rapporto tra le aree, così come non appare significativa l'interazione tra le due fonti di variabilità valutate (Tabella 7).

Tabella 7. ANOVA a due vie eseguita sui dati relativi al rapporto tra le aree lisosomiali e cellulari delle immagini 2D digitalizzate dei granulociti dei mitili traslocati in Rada di Augusta e nel sito di Brucoli. S.S.= somma degli scarti al quadrato D.F.= gradi di libertà; M.S.=media degli scarti al quadrato; P.=probabilità.

Sorgente di variabilità	SS	DF	MS	P value
Interazione	0.07994	1	0.07994	P = 0.4688
Periodo di traslocazione	0.005373	1	0.005373	P = 0.8510
Sito di traslocazione	0.6005	1	0.6005	P = 0.05
Residuo (errore)	67.98	447	0.1521	

3.3.1.2. TEST DEI MICRONUCLEI SU EMOCITI

Lo studio delle alterazioni morfometriche dei granulociti di mitilo è stato affiancato ad un biomarker ampiamente standardizzato di danno genotossico, la determinazione della frequenza dei micronuclei.

Il test dei micronuclei è stato effettuato su emociti di *M. galloprovincialis* sulla base del protocollo descritto nel “manuale d'uso dei biomarkers” messo a punto nell'ambito dell'UNEP-MAP (United Nations Environment Programme – Mediterranean Action Plan) e raccomandato per il MED POL BIOMONITORING PROGRAMME (UNEP, 1999).

L'esecuzione del test prevede l'osservazione del materiale genetico marcato con la sonda DAPI in microscopia confocale a fluorescenza C1 ad ingrandimento 100X (Fig. 21).

L'analisi è stata condotta, per ciascun sito di traslocazione, su 10 pool di emolinfa prelevati dagli organismi esposti.

Per ciascuna condizione sono state osservate 1000 cellule. I micronuclei presenti sono stati conteggiati in base ai più comuni e accettati criteri di classificazione dei micronuclei (Venier *et al.*, 1997).

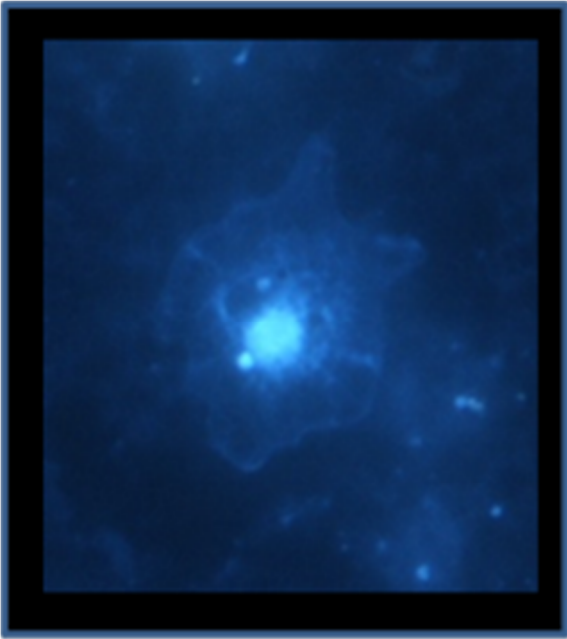


Figura 21. Visualizzazione in microscopia a fluorescenza di emociti di mitili traslocati per 45 nel periodo invernale (Time 1) nel sito Rada di Augusta. Colorazione mediante metodica DAPI. Osservazione ad ingrandimento 100 X.

In Figura 22 è riportata la frequenza di micronuclei osservata espressa in ‰

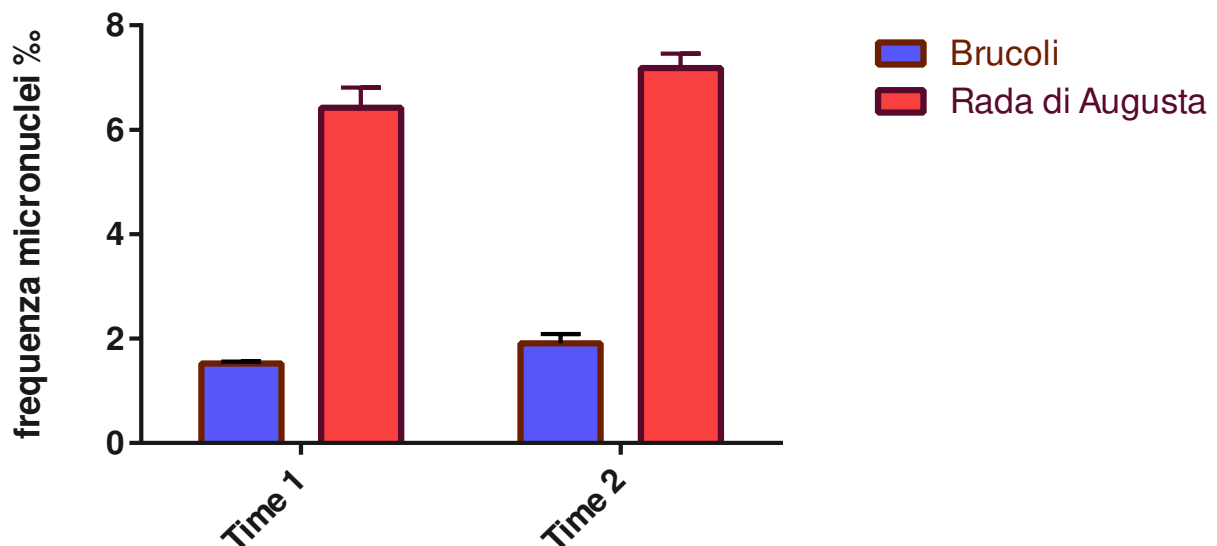


Figura 22. Frequenza di micronuclei osservata in emociti di mitili esposti in Rada di Augusta e in emociti del gruppo di controllo. I dati si riferiscono alle campagne di traslocazione della durata di 45 giorni effettuate nel periodo novembre-dicembre 2013 (Time 1) e giugno-luglio 2014 (Time 2). La frequenza di micronuclei (espressa in ‰) è stata misurata su 1000 cellule per ciascuno dei 10 pool di emolinfa rappresentativo di ciascun sito. I dati sono espressi come media \pm E.S. (n=10).

Il test ha permesso di osservare un notevole incremento della frequenza dei micronuclei negli emociti degli organismi esposti in Rada di Augusta rispetto al gruppo di controllo traslocato per lo stesso periodo di tempo nel sito di Brucoli, indice di un elevato livello di danno genotossico (Fig. 22).

Dall'analisi statistica effettuata mediante ANOVA a due vie risultano significativi i due fattori di variabilità considerati, ovvero il "periodo di traslocazione" ($P=0.0119$) e il "sito di traslocazione" ($P<0.0001$), mentre non risulta significativa l'interazione tra i fattori di variabilità (Tab. 8).

Tabella 8. ANOVA a due vie eseguita sui dati relativi alla frequenza dei micronuclei osservata negli emociti dei mitili traslocati in Rada di Augusta e nel sito di Brucoli. S.S.= somma degli scarti al quadrato D.F.= gradi di libertà; M.S.=media degli scarti al quadrato; P =probabilità.

Sorgente di variabilità	SS	DF	MS	P value
Interazione	3.773	1	3.773	$P = 0.4171$
Periodo di traslocazione	36.44	1	36.44	$P = 0.0119$
Sito di traslocazione	2837	1	2837	$P < 0.0001$
Residuo (errore)	2556	447	5.719	

3.3.1.3. CONCENTRAZIONE TISSUTALE DI METALLOTIONEINE

Le metallothioneine, proteine citoplasmatiche a basso peso molecolare ed elevato contenuto di cisteina, sono importanti ligandi cellulari di cationi di metalli pesanti e, pertanto, sono correlate alla riduzione degli effetti citotossici prodotti dalla presenza di elevate concentrazioni di metalli pesanti nel citoplasma cellulare.

In figura 23 sono riportati i livelli di metallothioneine osservati in ghiandola digestiva di mitili traslocati per 45 giorni nel periodo giugno-luglio 2014 (Time 2) nel sito ad impatto antropico Rada di Augusta e nel gruppo di controllo traslocato per lo stesso tempo nel sito di riferimento di Brucoli.

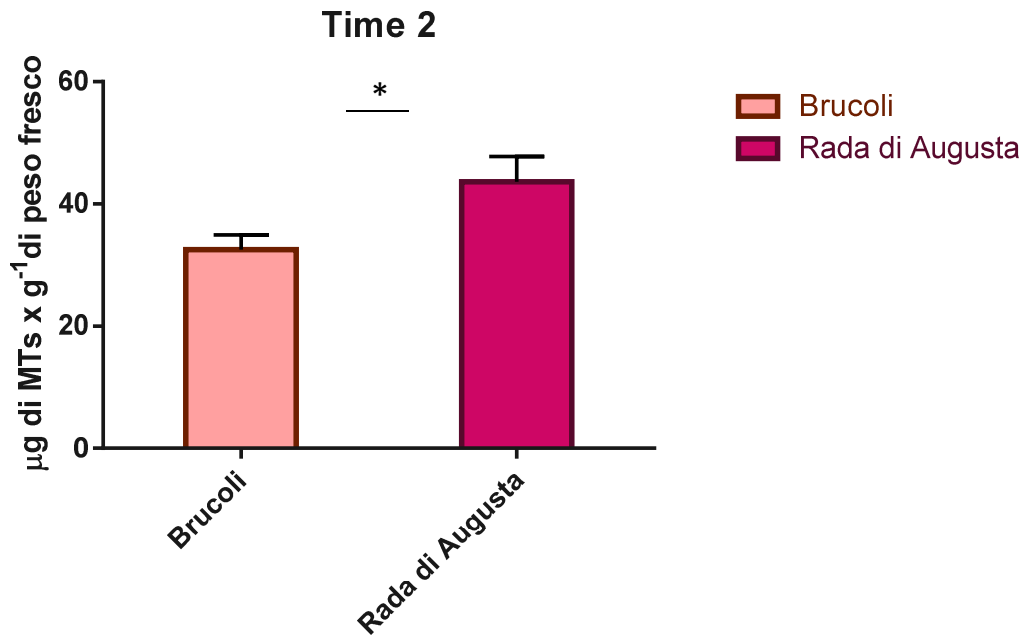


Figura 23.

Concentrazione di metallotioneine in ghiandola digestiva (riportati come $\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ di peso fresco) misurati in *M. galloprovincialis* dopo 45 giorni di esposizione nel sito di riferimento di Brucoli e nel sito Rada di Augusta nel periodo giugno-luglio 2014. I dati sono espressi come media \pm E.S. ($n=6$).

I livelli di metallotioneine misurati in ghiandola digestiva negli organismi tenuti per 45 giorni nel sito impattato sono risultati significativamente incrementati rispetto ai livelli osservati nei mitili traslocati per lo stesso tempo nel sito non impattato. L'analisi statistica mediante test t-student per dati non appaiati ha riportato una significatività elevata ($P=0.0430$) dell'incremento osservato rispetto al gruppo di controllo.

L'aumento dei livelli tissutali di metallotioneine rappresenta un indice specifico dell'avvenuta esposizione dell'organismo a metalli pesanti (Roesijadi *et al.*, 1992). Come riportato da diversi autori una maggiore concentrazione cellulare di metalli pesanti induce la sintesi *de novo* di metallotioneine, le quali complessano i cationi metallici riducendone la tossicità (Olafson *et al.*, 1979; Lemoin *et al.*, 2000; Bebianno and Serafim, 1998).

3.3.1.4. ATTIVITA' DI ANIDRASI CARBONICA

Accertato che gli organismi sentinella traslocati per 45 giorni nel sito Rada di Augusta hanno manifestato evidenti segni di stress dovuti ad esposizione a contaminanti, si è passati allo studio dell'attività di AC nei tessuti branchie, mantello e ghiandola digestiva quale nuovo biomarker di esposizione a contaminazione chimica ambientale.

L'attività di anidasi carbonica nei tre tessuti è stata dosata mediante un protocollo di tipo elettrometrico basato sulla misura della velocità di variazione di pH di una soluzione di omogenato di ghiandola digestiva alla quale venga aggiunta acqua saturata con CO₂.

3.3.1.4.1. ATTIVITA' DI ANIDRASI CARBONICA IN GHIANDOLA DIGESTIVA

In figura 24 è riportata l'attività specifica di AC di un campione di 48 tessuti di ghiandola digestiva prelevati da organismi sentinella traslocati per 45 giorni nel sito di riferimento di Brucoli e nel sito ad impatto antropico Rada di Augusta (12 individui per ciascun sito di traslocazione) nel corso della campagna di campionamento invernale (Time 1) condotta nel periodo novembre-dicembre 2013 e della campagna estiva (Time 2) condotta nel periodo giugno- luglio 2014. L'attività enzimatica è espressa come Unità Internazionali d'enzima ($\mu\text{mol di H}^+$ sviluppate al minuto) per grammo di tessuto fresco. Le barre di errore rappresentano l'errore standard.

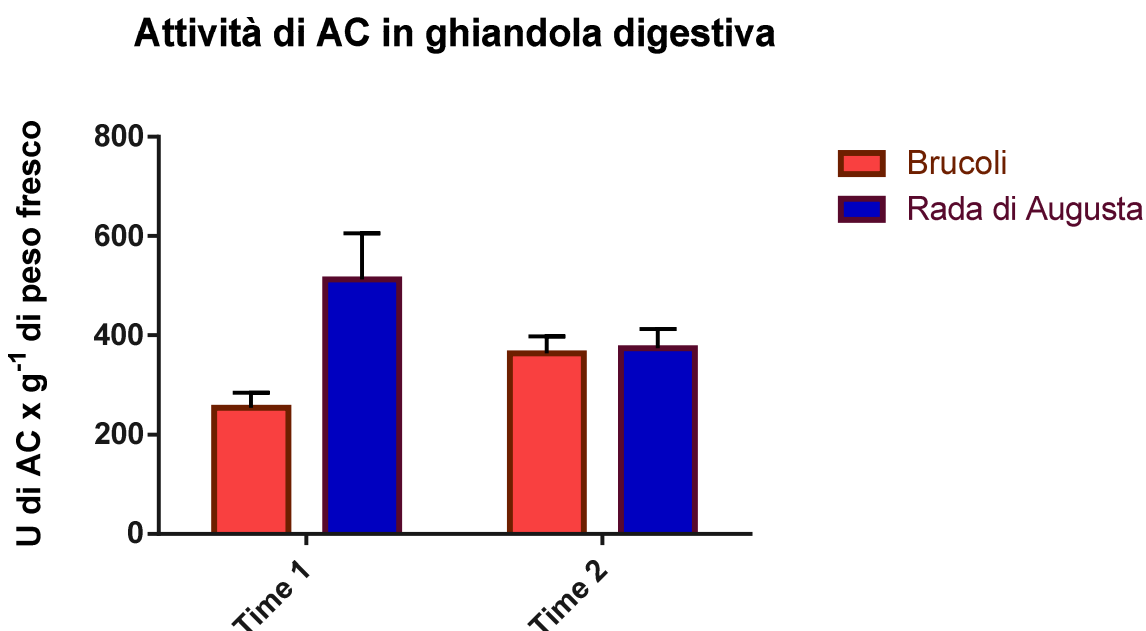


Figura 24. Livelli di attività di AC specifica espressi come U internazionali d'enzima ($\mu\text{mol min}^{-1}$) x g⁻¹ di tessuto fresco determinati in ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* esposti nei siti di Brucoli e Rada di Augusta nella campagna invernale (time 1) ed estiva (time 2). I dati sono espressi come media \pm E.S. di 12 esemplari per ogni gruppo.

In figura si può osservare come nel Time 1 i mitili esposti per 45 giorni nel sito impattato abbiano manifestato, rispetto al gruppo di controllo, un significativo incremento di attività enzimatica specifica.

L'elaborazione statistica dei dati con ANOVA a due vie (Tab.9) effettuata con GraphPad PRISM 6.0 considerando come fattori di variabilità il "sito di traslocazione" e il "periodo di traslocazione" ha evidenziato come il fattore "sito di traslocazione" risulti significativo, al contrario del "periodo di traslocazione". Questo risultato dimostra come l'attività di anidasi carbonica in ghiandola digestiva sia sensibile all'esposizione a inquinamento chimico ambientale. Tuttavia, come dimostrato dalla significatività dell'interazione tra i due fattori di variabilità ($P=0.0303$), la risposta dell'enzima all'esposizione ad inquinamento chimico ambientale è influenzata dal periodo stagionale in cui si effettua il campionamento. Infatti, come analizzato statisticamente mediante Bonferroni Test post test, l'incremento dell'attività di anidasi carbonica nel sito esposto ad impatto antropico rispetto al sito di controllo risulta significativo ($P<0.01$ Bonferroni Test) solo nel periodo invernale, ma non in quello estivo corrispondente al periodo riproduttivo dell'animale.

Tabella 9. ANOVA a 2 vie eseguita sui dati relativi all'attività di AC specifica manifestata in ghiandola digestiva dai mitili esposti nei siti di Brucoli e Rada di Augusta nel periodo invernale (time 1) ed estivo (time 2). S.S. = somma degli scarti al quadrato; D.F. = gradi di libertà; M.S. = media degli scarti al quadrato; P = probabilità.

Sorgente di variabilità	SS	DF	MS	P value
Interazione	184314	1	184314	$P = 0.0303$
Periodo di traslocazione	2649	1	2649	$P = 0.7896$
Sito di traslocazione	216733	1	216733	$P = 0.0194$
Residuo (errore)	1618000	44	36776	

3.3.1.4.2. ATTIVITA' DI ANIDRASI CARBONICA NEL MANTELLO

In figura 25 è riportato l'andamento dell'attività di AC specifica di un campione di 48 tessuti di mantello prelevati da 12 organismi sentinella traslocati per 45 giorni nel sito di riferimento di Brucoli e nel sito ad impatto antropico Rada di Augusta nel corso della campagna di campionamento invernale (Time 1) condotta nei mesi dicembre 2013-gennaio 2014 e della campagna estiva (Time 2), condotta nel mese di luglio 2014.

L'attività di AC specifica è espressa come Unità Internazionali d'enzima ($\mu\text{mol di H}^+$ sviluppate al minuto) per grammo di tessuto fresco. Le barre di errore rappresentano l'errore standard.

E' possibile osservare come i livelli di attività enzimatica misurati nel mantello dei mitili traslocati in Rada di Augusta abbiano manifestato, rispetto ai controlli, un andamento diverso nelle due campagne: nel periodo invernale (Time 1) è stato osservato un significativo incremento dei livelli di attività enzimatica, nel periodo estivo (Time 2) i dati hanno evidenziato un notevole incremento dei livelli basali rispetto al dato invernale osservabile nell'aumento dei livelli misurati nei mitili di controllo, a fronte di un'inibizione non significativa dell'attività enzimatica nei mitili esposti in Rada di Augusta.

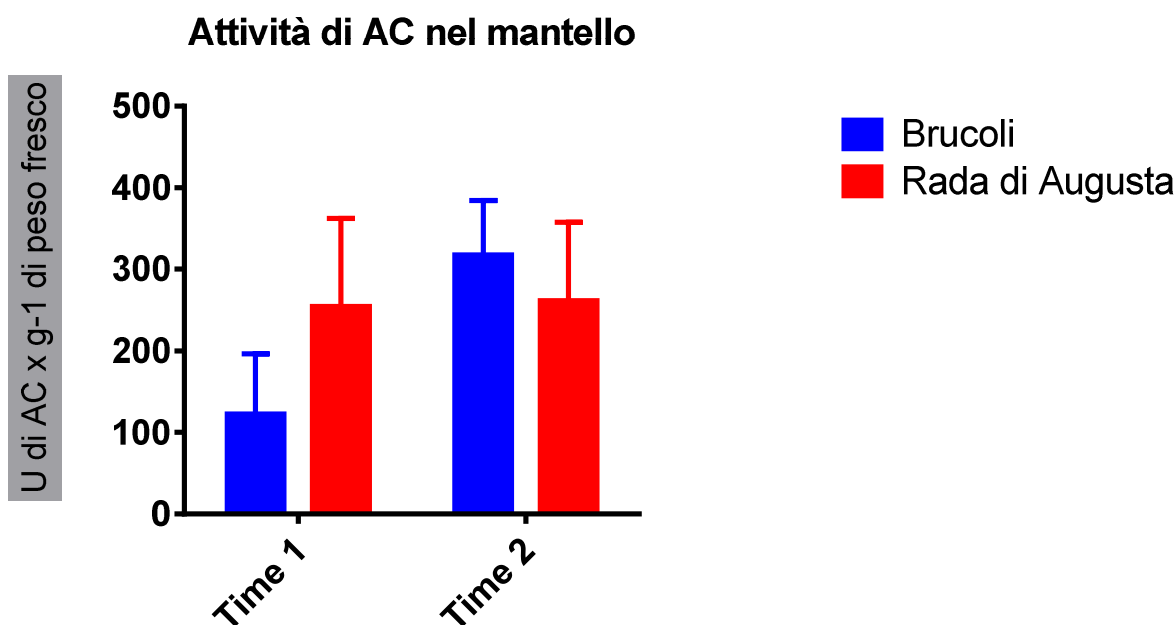


Figura 25. Livelli di attività di AC specifica espressi come U internazionali d'enzima ($\mu\text{mol min}^{-1}$) \times g⁻¹ di tessuto fresco determinati nel mantello di *M. galloprovincialis* esposti nei siti di Brucoli e Rada di Augusta nella campagna invernale (time 1) ed estiva (time 2). I dati sono espressi come media \pm E.S. di almeno 12 esemplari per ogni gruppo.

L'analisi statistica effettuata mediante two-way ANOVA ha restituito effetti significativi ($P < 0.0002$) per il fattore di variabilità "periodo di campionamento" (tempo di campionamento) (Tab 10). Pertanto, la stagionalità sembra influire pesantemente sull'attività enzimatica di anidraasi carbonica del mantello, che in estate, in corrispondenza con il periodo riproduttivo, manifesta livelli basali significativamente incrementati anche negli organismi di controllo. Il fattore di variabilità "siti di traslocazione" non è risultato significativo, tuttavia l'interazione altamente significativa ($P < 0.0006$) tra i due fattori di variabilità manifesta come l'incremento stagionale dell'attività di anidraasi carbonica nel mantello sia influenzato dall'esposizione ad inquinamento chimico.

Tabella 10. ANOVA a 2 vie eseguita sui dati relativi all'attività di AC specifica manifestata nel tessuto mantello dai mitili esposti nei siti Brucoli e Rada di Augusta nel periodo invernale (time 1) ed estivo (time 2). S.S. = somma degli scarti al quadrato; D.F. = gradi di libertà; M.S. = media degli scarti al quadrato; P = probabilità.

Sorgente di variabilità	SS	DF	MS	P
Interazione	105882	1	105882	P = 0,0006
Tempo di campionamento	122008	1	122008	P = 0,0002
Siti di traslocazione	17123	1	17123	P = 0,1426
Residuo (errore)	337975	44	7681	

Infatti, l'analisi statistica mediante Bonferroni post test ($P < 0.01$), conferma l'incremento significativo di attività nel sito esposto ad impatto antropico rispetto al sito di controllo nel periodo invernale.

3.3.1.4.3. ATTIVITA' DI ANIDRASI CARBONICA NELLE BRANCHE

In figura 26 è descritto l'andamento dei livelli di attività di AC specifica di un campione di 48 tessuti di branchie prelevati da 12 organismi sentinella traslocati per 45 giorni nel sito di riferimento di Brucoli e nel sito ad impatto antropico Rada di Augusta nel corso della campagna di campionamento invernale (Time 1) condotta nei mesi novembre-dicembre 2013, e della campagna estiva (Time 2) condotta nei mesi di giugno-luglio 2014.

Innanzitutto si osserva come l'attività di anidraasi carbonica in branchie sia mediamente più bassa rispetto a quella misurata in ghiandola digestiva e mantello.

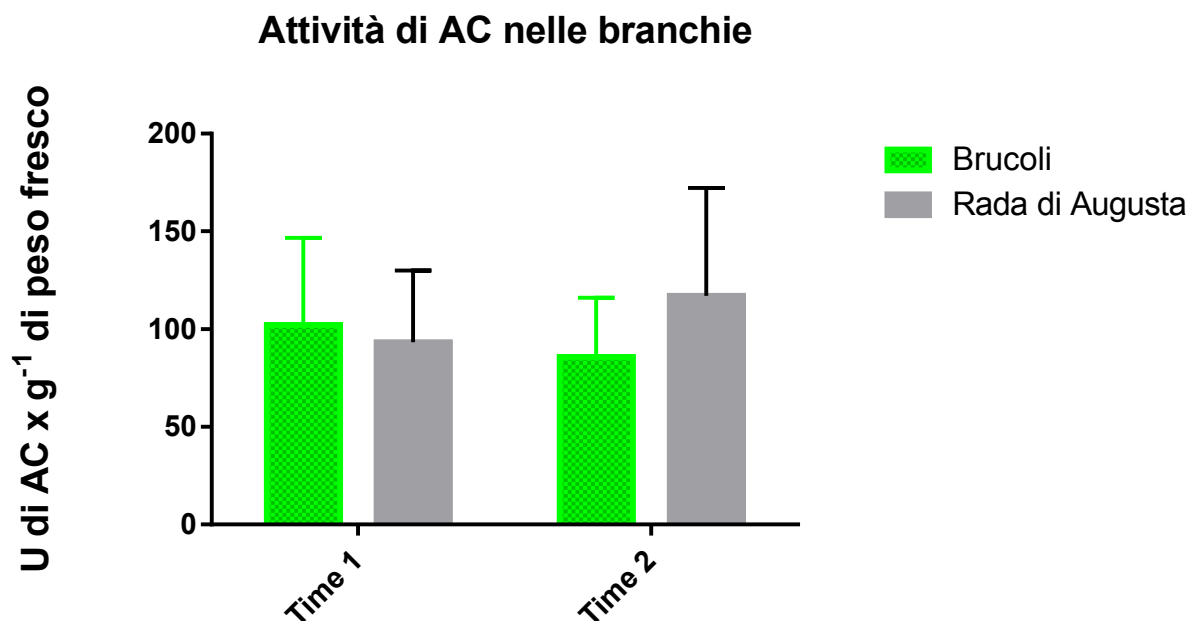


Figura 26. Livelli di attività di AC specifica espressi come U internazionali d'enzima ($\mu\text{mol min}^{-1}$) \times g^{-1} di tessuto fresco determinati nelle branchie di *M. galloprovincialis* esposti nei siti di Brucoli e Rada di Augusta nella campagna invernale (time 1) ed estiva (time 2). I dati sono espressi come media \pm E.S. di 12 esemplari per ogni gruppo. Le barre d'errore rappresentano l'errore standard.

L'andamento registrato nei mitili esposti in Rada di Augusta è risultato mediamente costante attestandosi attorno a valori solo di poco inferiori nel Time 1 e superiori nel Time 2 alle attività enzimatiche riscontrate nei mitili di controllo.

Il trattamento statistico dei dati è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, considerando come fattori di variabilità il sito di traslocazione e il periodo di campionamento. Come riportato in Tabella 11 non è stato rilevato alcun effetto significativo e non è stata rilevata alcuna interazione statisticamente significativa dei due fattori di variabilità considerati.

Tabella 11. ANOVA a 2 vie eseguita sui dati relativi all'attività di AC specifica manifestata nel tessuto branchie dai mitili esposti nei siti di Brucoli e Rada di Augusta nel periodo invernale (time 1) ed estivo (time 2). S.S. = somma degli scarti al quadrato; D.F. = gradi di libertà; M.S. = media degli scarti al quadrato; P = probabilità.

Sorgente di variabilità	SS	DF	MS	P value
Interazione	4836	1	4836	P = 0,1109
Periodo di campionamento	166.5	1	166.5	P = 0,7641
Sito di traslocazione	1550	1	1550	P = 0,3619
Residuo (errore)	80379	44	1827	

3.3.1.5. STUDIO DEL RUOLO FISILOGICO DI ANIDRASI CARBONICA IN GHIANDOLA DIGESTIVA DI MITILO

Considerata la sensibilità nei confronti dell'esposizione a inquinanti chimici ambientali manifestata dall'enzima anidraasi carbonica, in particolar modo a livello della ghiandola digestiva, si è voluto indagare sul ruolo fisiologico dell'enzima a livello di tale organo. L'enzima anidraasi carbonica infatti potrebbe giocare un ruolo nell'incremento, indotto dall'esposizione a contaminanti ambientali, delle attività e delle dimensioni del sistema lisosomiale, sopperendo all'aumentato fabbisogno di protoni.

Per valutare tale ipotesi è stato condotto uno studio *in vivo*, in condizioni controllate di laboratorio, di esposizione di mitili ad acetazolamide, inibitore specifico di anidraasi carbonica.

3.3.1.5.1. STUDIO *in vivo* IN CONDIZIONI CONTROLLATE DI LABORATORIO

Uno stock omogeneo di 30 esemplari di *M. galloprovincialis* reperito presso l'impianto di mitilocoltura "Marevivo" di Castro (LE) è stato suddiviso in due gruppi da 15 individui: il primo gruppo è stato incubato con acetazolamide (50 mg/L), mentre il secondo gruppo è stato incubato nelle medesime condizioni e per lo stesso intervallo di tempo, ma in assenza di acetazolamide. I due gruppi sono stati incubati per 48 ore in condizioni controllate e costanti di laboratorio, ovvero temperatura pari a $15 \pm 1^\circ\text{C}$, salinità pari a 35 ‰, regime luce/buio 12h/12h. Al termine del periodo di esposizione le ghiandole digestive sono state dissezionate da 5 individui prelevati da ciascuna vasca. Dalle singole ghiandole digestive sono stati ottenuti dei lisati cellulari successivamente marcati con il colorante fluorescente LysoSensorTM Green DND-189. Tale probe fluorescente è rappresentato da una base debole che nella forma indissociata passa liberamente attraverso le membrane biologiche. A pH acido, come quello registrato all'interno dei lisosomi, la base debole passa nella forma dissociata rimandovi intrappolato e conferendo in tal modo ai lisosomi la tipica colorazione fluorescente nel verde. In Figura 27 è riportata un'immagine rappresentativa di cellule di ghiandola digestiva in sospensione marcate con LysoSensorTM Green DND-189 e osservate in microscopia a fluorescenza. Come è possibile osservare il colorante fluorescente è confinato in strutture vescicolari di colore verde corrispondenti ai lisosomi.

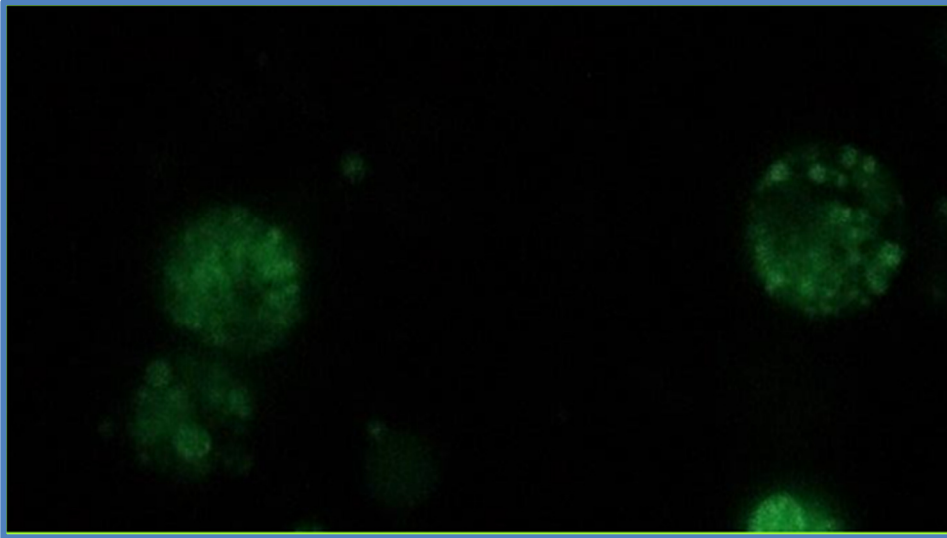


Figura 27. Immagine rappresentativa di cellule di ghiandola digestiva isolate in sospensione marcate con LysoSensor™ Green DND-189. Osservazione in microscopia a epifluorescenza ad ingrandimento 100X.

Al fine di quantificare l'effetto esercitato dall'esposizione dei mitili ad acetazolamide sul sistema lisosomiale è stata condotta una misura in spettrofluorimetria dell'intensità di fluorescenza emessa da cellule di ghiandola digestiva in sospensione caricate con il colorante, provenienti da organismi di controllo e da organismi esposti ad acetazolamide., misurata in Unità arbitrarie di fluorescenza.

Il dato è stato normalizzato sulla concentrazione di proteine della sospensione utilizzata. La lettura fluorimetrica è stata condotta ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 443 nm ed una lunghezza d'onda di emissione di 505 nm.

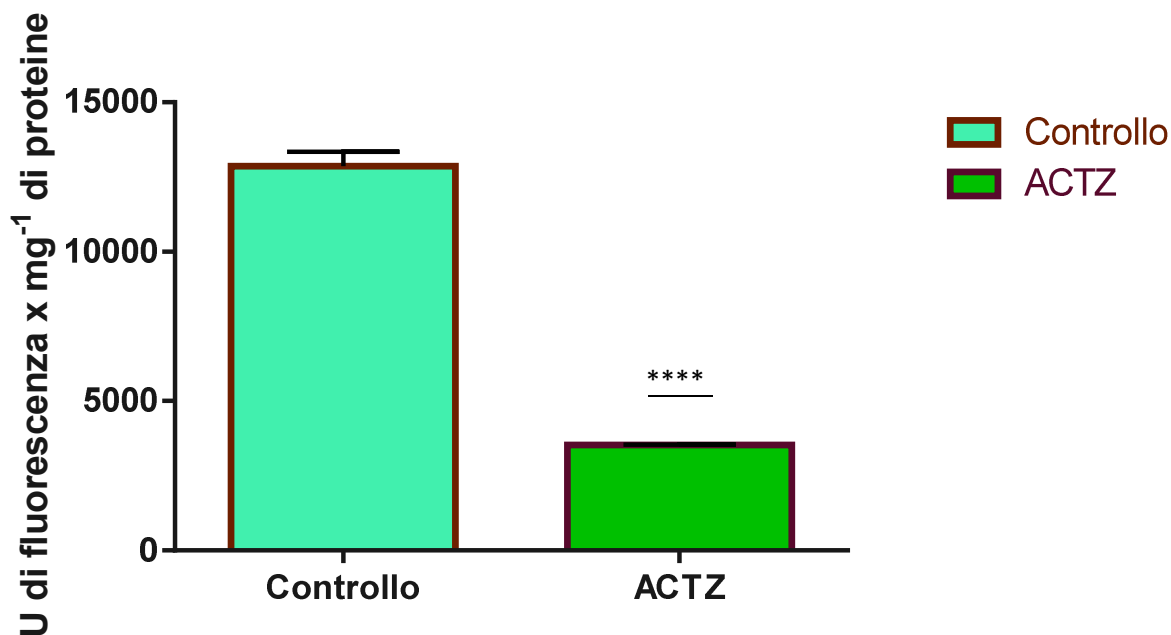


Figura 28 Livelli di intensità di fluorescenza (espressi come Unità di fluorescenza x mg⁻¹ di proteine) emessi dal lisato cellulare di ghiandola digestiva di mitili di controllo e dal lisato cellulare di ghiandola digestiva di mitili trattati con acetazolamide marcati con LysoSensorTM Green DND-189. Abs 443 nm; Em 505 nm. I dati sono espressi come media ± E.S. (n=3). t-test per dati non appaiati P<0.0001.

E' stato osservato (Fig. 28) un significativo decremento dell'intensità di fluorescenza emessa dal lisato cellulare di ghiandole di mitili trattati con l'inibitore ACTZ rispetto all'intensità emessa dalle cellule di ghiandola digestiva di mitili incubati in condizioni di controllo (t-test per dati non appaiati P<0.0001 effettuato mediante GraphPad PRISM versione 6.0). Il decremento osservato è indice di un decremento dell'acidità del comparto lisosomiale. L'esperimento effettuato ha dimostrato che l'attività enzimatica di anidraasi carbonica è funzionalmente coinvolta nell'acidificazione del compartimento lisosomiale e, pertanto, nella funzionalità del sistema lisosomiale in ghiandola digestiva di mitilo. Tale risultato giustifica inoltre l'elevata attività specifica di anidraasi carbonica manifestata dalla ghiandola digestiva rispetto ad altri tessuti, quali mantello e branchie. Infatti, le cellule di ghiandola digestiva di mitilo, essendo coinvolte nei processi di digestione endocellulare manifestano, rispetto ad altri tessuti, un notevole sviluppo del sistema lisosomiale.

4. DISCUSSIONE

La valutazione del rischio per gli organismi viventi associato alla presenza di contaminanti chimici rilasciati in ambiente marino-costiero, necessaria per aspetti decisionali legati al mantenimento della funzionalità degli ecosistemi e della protezione degli habitat, pone la crescente necessità di sviluppare nuovi approcci metodologici per la valutazione dell'esposizione e degli effetti dei contaminanti.

Il presente lavoro di tesi si inserisce nell'ambito dello studio e della definizione di nuovi strumenti per la precoce individuazione di sindromi da stress chimico in ambienti marino-costieri ed ha per oggetto lo sviluppo e la validazione di nuovi bioassay e biomarker.

Nel lavoro di tesi si è utilizzato un approccio basato sull'utilizzo integrato di metodologie biologiche (bioassay e biomarker) per lo sviluppo di uno strumento di biomonitoraggio utile alla definizione dell'impatto della contaminazione chimica sugli organismi che vivono in un dato ambiente. In particolare, scopo di questo lavoro è stato quello di integrare le indagini ecotossicologiche sui sedimenti basate sull'utilizzo di una batteria di bioassay *in vitro* e *in vivo* con uno studio ecotossicologico di multibiomarker approach, che ha previsto la traslocazione di organismi bioindicatori, *Mytilus galloprovincialis*, e l'utilizzo di una batteria di biomarker biochimici e cellulari comprendente biomarker già standardizzati e biomarker di nuova definizione. Se da un lato l'analisi chimica rappresenta un aspetto fondamentale per la caratterizzazione dei contaminanti presenti nell'area di studio, dall'altro le indagini di tipo biologico forniscono informazioni importanti per definire la biodisponibilità dei contaminanti, la loro trasferibilità al comparto biotico e soprattutto per evidenziare gli effetti biologici causati da tali sostanze. L'approccio biologico complementa l'approccio chimico consentendo di superare alcuni limiti legati all'utilizzo esclusivo della determinazione analitica degli inquinanti chimici presenti nelle matrici ambientali. Ad esempio nel caso di contaminazione da miscele complesse di inquinanti chimici, come molto spesso si verifica, la determinazione chimica degli inquinanti non consente di stimare correttamente la potenziale ecotossicità, né di esprimere valutazioni relative al rischio per gli organismi viventi. Le metodologie biologiche di indagine oltre a fornire indicazioni circa la biodisponibilità delle sostanze inquinanti, integrano gli effetti di tutti i contaminanti presenti (compresi quelli non determinabili mediante le analisi chimiche, composti di degradazione dei contaminanti chimici), rilevando, inoltre, eventuali fenomeni di sinergia e/o antagonismo (Pandard *et al.*, 2006).

L'ambiente reale impiegato per l'applicazione in campo dell'approccio integrato bioassay/biomarker proposto è rappresentata dalla Rada di Augusta, situata lungo la costa ionica siciliana a nord di Siracusa e sede della più estesa zona industriale della regione, il Polo petrolchimico di

Augusta-Priolo. La Rada è caratterizzata da un inquinamento ambientale elevato e rientra nella perimetrazione marina del sito di interesse nazionale di Augusta, Priolo, Melilli, individuata dai D.M. del 10/01/2000 e 18/09/2001. In relazione alle attività industriali che vi si sono succedute nel tempo, la Rada è interessata da contaminazione sia da idrocarburi che da metalli pesanti. Tale ambiente per le sue peculiari caratteristiche offre, pertanto, la possibilità di testare in campo nuovi approcci metodologici nel biomonitoraggio della contaminazione chimica ambientale. Nell'area è stata evidenziata un'elevata contaminazione da metalli pesanti e idrocarburi dei sedimenti. In un lavoro di Sprovieri *et al.* (2011) è stata mappata la distribuzione di mercurio totale nei sedimenti superficiali, sottolineando la presenza di concentrazioni estremamente elevate del metallo (comprese tra 0.1 e 527.3 mg/Kg) e come la baia possa giocare un ruolo nell'esportazione di mercurio al Mar Mediterraneo come effetto del flusso in uscita intercettato dalle acque levantine. Dati recenti hanno messo in luce il trasferimento di mercurio totale dal sistema abiotico, sedimento e acque marine, alla componente biotica (top predators e filtratori) ed hanno documentato significativi rischi associati al consumo di specie ittiche della zona (Bonsignore *et al.*, 2013). Elevate concentrazioni di mercurio misurate nei tessuti di specie bentoniche suggeriscono un attivo meccanismo di rilascio di mercurio dai sedimenti contaminati alla colonna d'acqua, con conseguenti effetti di bioaccumulo nella catena trofica. Le elevate concentrazioni riscontrate in specie pelagiche nella zona esterna della Baia confermano il ruolo dell'ambiente marino di Augusta come potenziale sorgente puntuale di mercurio per il circondario e sottolineano il rischio associato al trasferimento da bacini semichiusi al mare aperto (Bonsignore *et al.*, 2013). Il contenuto di mercurio misurato nei tessuti dei pesci mostra un incremento con la profondità dell'habitat, con livelli più elevati misurati nelle specie bentoniche rispetto a quelle pelagiche. La contaminazione sembra avere un gradiente sud-nord. In particolare le concentrazioni medie più alte sono state osservate in pesci campionati a sud della Baia dove i sedimenti profondi mostrano elevate concentrazioni di mercurio (Sprovieri *et al.*, 2011), il che suggerisce un ruolo dei sedimenti altamente contaminati come fonte di mercurio nell'ambiente.

Uno studio di Fasulo *et al.* (2012) ha invece riportato la presenza di fluorantene, naftalene, benzoapirene e dibenzoapirene in ghiandola digestiva di mitili campionati nell'area di Priolo.

4.1 BATTERIA DI BIOASSAY *in vivo* E *in vitro*

Lo sviluppo dell'approccio integrato bioassay-biomarker ha visto inizialmente la definizione di una batteria di bioassay per il monitoraggio dei sedimenti utile all'individuazione degli hot-spot di contaminazione dell'area.

Il sedimento è un vero e proprio reattore chimico in cui si realizzano processi chimico-fisici ed interazioni con il comparto acqua, ad esso sovrastante, che funge da tramite per il passaggio di composti chimici inquinanti al biota. Memoria storica di ogni ambiente marino-costiero, funge da comparto di accumulo e da sorgente del carico inquinante.

In ambito ecotossicologico è ampiamente accettato che un singolo organismo test non sia in grado di rappresentare la complessa varietà di risposte ai contaminanti chimici ambientali. Poiché la sensibilità degli organismi nei confronti degli inquinanti chimici varia da una specie all'altra, l'impiego di un solo saggio produce risultati con un elevato grado di incertezza. Pertanto, una caratterizzazione ecotossicologica realistica necessita dell'utilizzo di batterie di saggi che impieghino organismi appartenenti a livelli trofici differenti. Inoltre, la combinazione di test con endpoint di tipo diverso aumenta notevolmente il valore predittivo dei saggi ecotossicologici (Bierkens *et al.*, 1998). Effettiva significatività biologica e parametri operativi quali rapidità, sensibilità, potere discriminatorio, ripetibilità, variabilità (legata a fattori fisico-chimici, fattori naturali e fattori relativi al campionamento, alla manipolazione del campione e all'esecuzione del saggio), semplicità di esecuzione, costo, standardizzazione, applicabilità (disponibilità delle specie test) e utilità ai fini dello sviluppo di standard operativi, hanno portato alla proposta di una batteria composta da un saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti condotto su elutriato di sedimento e su sedimento intero, e un saggio di mortalità con il rotifero *Brachionus plicatilis*. La batteria è stata integrata con un bioassay *in vitro* basato sulla misura dell'attività catalitica dell'enzima anidraasi carbonica condotto su elutriato di sedimento.

La capacità di discriminare diversi gradi di contaminazione dei sedimenti è stata saggiata applicando la batteria alla valutazione della tossicità di un set di campioni di sedimento costituito dal sedimento tal quale (campione "A") prelevato dall'ambiente reale impiegato per lo studio, la Rada di Augusta, e campioni dello stesso sedimento sottoposti a diversi livelli di trattamento (fisico, chimico e biologico) di bioremediation, con un rank di tossicità attesa del set di campioni di sedimento $A > 1B-T30 > 4B-T30 > 2B-T30 > 3B-T30$. I campioni di sedimento sono stati forniti dallo IAMC-CNR nell'ambito di una collaborazione esterna con il Laboratorio di Fisiologia Generale e Ambientale dell'Università del Salento, in collaborazione con il quale è stata svolta una parte delle attività sperimentali della tesi.

Il confronto tra le differenti risposte osservate ha permesso di evidenziare, anche in relazione alla fase analizzata e al tipo di test effettuato (*in vitro*, *in vivo*, acuto, subcronico), il contributo relativo di ciascun saggio alla risposta integrata della batteria e la sensibilità degli organismi e della tipologia di saggio nei confronti della matrice analizzata.

Il saggio di inibizione della bioluminescenza su elutriato consente di valutare la tossicità acuta di elutriati di campioni di sedimento utilizzando come risposta l'eventuale inibizione della luminescenza naturalmente emessa dai batteri marini della specie *Vibrio fischeri* osservata dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione. Il saggio ha riportato in generale una scarsa tossicità dei campioni esaminati, con una percentuale di effetto massima per l'elutriato del campione non sottoposto a trattamento di bioremediation.

Per il campione non trattato (campione "A"), che ha esibito la percentuale di effetto più elevata, e il campione sottoposto al trattamento più blando di bioremediation (campione "1B-T30"), che invece ha riportato la più bassa percentuale di effetto, il dato di tossicità ottenuto saggiando l'elutriato è stato comparato con le percentuali di inibizione della luminescenza osservate saggiando la fase solida dello stesso campione.

Il protocollo Microtox® Solid Phase Test (SPT) impiegato per l'esecuzione del saggio di inibizione della bioluminescenza su sedimento intero prevede che i batteri luminescenti entrino a diretto contatto con il campione solido in soluzione acquosa, permettendo di indagare la tossicità dei tossici presenti sulla superficie delle particelle di sedimento e dei tossici in sospensione.

Per entrambi i campioni saggiati il bioassay in fase solida ha riportato un'elevata tossicità, a dispetto della modesta tossicità manifestata dall'elutriato degli stessi campioni di sedimento nel saggio Microtox in fase liquida.

La marcata differenza nella risposta fornita dai saggi è in parte ascrivibile alle caratteristiche intrinseche delle due tipologie di matrice test, sedimento intero ed elutriato di sedimento, notoriamente in grado di fornire risposte complementari, e conferma la necessità di indagare la tossicità associata a diverse fasi di esposizione nell'ambito di una batteria di bioassay.

Per sedimento in toto si intende il sedimento assieme all'acqua interstiziale, che ha subito una manipolazione minima dopo il campionamento (ASTM, 1994). Chapman e Wang (2001) ritengono che il comparto debba essere il principale strumento nella verifica della tossicità dei sedimenti, soprattutto perché consente di coprire la più grande varietà di possibili vie di esposizione e comporta il minimo cambiamento delle condizioni fisico-chimiche del sedimento. I saggi con il sedimento in toto permettono di valutare l'impatto sugli organismi che si alimentano con il debito organico del sedimento, tengono automaticamente conto di tutte le interazioni (additività, antagonismo, sinergismo) e integrano gli effetti di tutti i contaminanti presenti. Oltre all'elevato realismo relativo, vantaggi dell'impiego della matrice in una batteria finalizzata allo screening della tossicità di sedimenti sono l'applicabilità ad ogni tipo di sedimento e la validità nella definizione di criteri per la qualità dei sedimenti. Svantaggi operativi sono invece la possibile presenza di biota indigeno nel campione, la possibilità di alterazioni fisiche, chimiche o microbiologiche della

matrice rispetto alle condizioni in campo; la disponibilità di pochi metodi standardizzati, la difficoltà di eseguire il saggio con alcune tipologie di sedimento e con alcune specie di organismi test.

Per elutriato si intende l'acqua e la porzione solubile estratta dal sedimento (ASTM, 1994). I saggi condotti con la matrice elutriato permettono di valutare i potenziali effetti avversi sugli organismi della colonna d'acqua della perturbazione dei sedimenti sottostanti (Cheung *et al.*, 1997). L'uso di elutriati è stato proposto per studiare i meccanismi di ripartizione dei vari tossici e i processi che portano alla manifestazione di effetti indesiderati sugli organismi viventi.

L'elutriato, pur costituendo un artefatto, è la simulazione più vicina alle movimentazioni dei fondali e dei dragaggi (USACE, 1991) e ai processi di ambienti anossici. I test su questa frazione sono stati sviluppati per valutare i potenziale effetti tossici a breve termine (ore o giorni) delle componenti idrosolubili presenti nel materiale sedimentario dragato, destinato allo smaltimento in acque aperte. Vantaggi dell'impiego della matrice sono l'applicabilità ad ogni tipo di sedimento, la facilità di ottenimento delle matrici e la possibilità di saggiare una grande varietà di endpoints. Lo scarso realismo per l'ecosistema, il fatto di consentire di saggiare una sola condizione di ossidazione, un solo rapporto solido/acqua e di saggiare magari per tempi prolungati una condizione monofase che non si verifica mai *in situ* o all'equilibrio rappresentano limiti nel loro impiego.

D'altra parte il passaggio di estrazione del sedimento in un mezzo acquoso per la produzione di elutriato introduce variabili dovute sia all'effetto di diluizione apportato, sia al fatto che non è garantita un'estrazione quantitativa dei contaminanti presenti, specie se di natura apolare come i contaminanti organici.

Un'altra considerazione da fare riguarda il fatto che, sebbene il sistema Microtox® Solid Phase Test (SPT) sia ampiamente standardizzato e raccomandato come strumento di screening per la tossicità di sedimenti, potere discriminatorio del saggio e livello di sensibilità sono ancora poco chiari.

La metodica comporta una serie di problemi riconducibili essenzialmente alla variabilità della matrice solida: aumento della biodisponibilità dei contaminanti adsorbiti al sedimento; interferenza ottica delle particelle rimaste in sospensione (diffusione della luce) o dovuta al colore (assorbimento della luce) (Doe *et al.*, 2005); perdita dei batteri per adesione alle particelle di sedimento specie con sedimenti argillosi. Diversi studi hanno dimostrato come la riduzione della bioluminescenza batterica sia funzione della dimensione media dei granuli di sedimento e quindi della superficie totale offerta dalla frazione fine all'adesione dei batteri (Ringwood *et al.*, 1997), mentre altri annoverano tra i confounding factors la variazione del pH dovuta alla diluizione dei campioni

(Volpi Ghiradini *et al.*, 2009). La sensibilità del test può inoltre essere influenzata da alcuni chimici spesso presenti nei sedimenti quali l'ammonio, lo zolfo elementare o il solfuro di idrogeno, tossici per il batterio (Ankley *et al.*, 1991).

L'insieme di questi fattori può indurre a falsi positivi e rende difficile una valutazione oggettiva della reale tossicità del sedimento.

Diverse metodiche alternative, alcune delle quali ancora in fase sperimentale, sono state messe a punto negli anni per sviluppare i limiti del sistema di saggio. Nel lavoro si è preferito effettuare la comparazione tra fase solida e fase liquida impiegando il Microtox ® Solid Phase Test (SPT) per l'esigenza di disporre di uno strumento standardizzato.

Il saggio subcronico di mortalità con il rotifero *Brachionus plicatilis*. ha riportato una sensibilità modesta per i campioni analizzati, ad eccezione di un campione (il campione 2B-T30) che ha causato la morte di tutti gli organismi dopo 48 ore di esposizione.

Diversi studi riportano una modesta sensibilità dei rotiferi per la maggior parte degli inquinanti (Wells, 1998; EPA, 1983). Persoone *et al.* (1989) hanno evidenziato come la sensibilità a composti tossici di riferimento sia direttamente proporzionale alla temperatura ed inversamente proporzionale alla salinità. Come riportato da diversi autori numerosi fattori ne rendono, tuttavia, valido l'impiego all'interno delle batterie di bioassay.

In particolare, oltre alle caratteristiche di ampia distribuzione geografica e resistenza alle variazioni di salinità e temperatura, si ricordano:

- l'importanza ecologica della specie-test. Il rotifero *Brachionus plicatilis* è una specie chiave nei rapporti trofici della rete microbica alimentare marino-costiero, si affianca allo zooplancton di dimensioni maggiori in qualità di consumatore primario di fitoplancton ed è alimento di base per numerosi consumatori secondari (Henrouth, 1983).
- la semplicità di esecuzione del saggio. Il saggio risulta nel suo insieme standardizzato e relativamente facile da eseguire, mentre i risultati forniti appaiono dotati di buona coerenza interna e riproducibilità.
- la presenza di un protocollo normato.
- l'economicità del saggio.
- la reperibilità delle cisti durante tutto l'arco dell'anno. Vi è un indubbio vantaggio per la possibilità di avviare un saggio biologico anche con breve preavviso, per la garanzia di controllo esistente sul ceppo d'origine.

Come in tutti i test ecotossicologici la standardizzazione della procedura è un aspetto fondamentale per l'affidabilità dei risultati. In particolare nel caso di *Brachionus plicatilis*, descritta come una tra

le specie di rotiferi a più elevata diversità genetica, l'approvvigionamento degli organismi test può costituire un'ulteriore fonte di variabilità.

L'utilizzo del kit commerciale ROTOXKIT MTM permette di ovviare a questi inconvenienti, offrendo il vantaggio di un'esecuzione standardizzata in quanto tutto il materiale necessario (alimenti, substrati di riferimento e organismi) è fornito con il kit.

Il kit consente inoltre il contenimento della variabilità in quanto gli organismi test, forniti in forma cripto-biotica (cisti che vengono fatte schiudere al momento dell'allestimento di ciascuna prova) sono geneticamente controllati.

Un aspetto critico di questa procedura riguarda il test con la sostanza tossica di riferimento: l'inclusione di una prova di controllo è necessaria per confermare lo stato di salute degli organismi. Aspetto importante in quanto, durante la conservazione, le cisti quiescenti possono subire stress ambientali che ne compromettono la vitalità.

L'introduzione sul mercato di kit commerciali contenenti forme criptobiotiche o "dormienti", che possono essere conservate per periodi piuttosto lunghi senza che ne vengano alterate le funzioni vitali, agevola la possibilità di allestimento di test diversi.

La disponibilità di organismi in tali forme permette da una parte di eliminare tutte le fasi di allevamento e acclimatazione, con conseguenti vantaggi dal punto di vista sia economico sia gestionale, dall'altra di lavorare su popolazioni omogenee, permettendo quindi una standardizzazione della risposta in specifiche condizioni.

Il presente lavoro ha proposto l'applicazione, nell'ambito della batteria di bioassay destinata alla valutazione della tossicità dei sedimenti marino-costieri, di un bioassay *in vitro*, recentemente brevettato presso il Laboratorio di Fisiologia generale ed Ambientale dell'Università del Salento (brevetto n. MI2008A008813) basato sull'inibizione dell'attività dell'isoenzima II di anidrase carbonica estratto da eritrociti di bovino, disponibile commercialmente, come strumento di screening rapido, sensibile e a basso costo per la valutazione della tossicità.

Il bioassay si basa sulla misura *in vitro*, mediante metodo elettrometrico, dell'inibizione dell'attività enzimatica di anidrase carbonica quando l'enzima sia posto a contatto con la matrice-test elutriato di sedimento. L'entità dell'inibizione risulta proporzionale al grado di tossicità della matrice analizzata.

Il metodo consente la precoce individuazione della presenza di sostanze tossiche biodisponibili in matrici ambientali.

L'anidrasi carbonica è un metalloenzima che catalizza la reazione reversibile di idratazione dell'anidride carbonica a bicarbonato. L'enzima ha un'ampia diffusione nel mondo vivente, è presente in alcuni batteri, nelle piante e negli animali e gioca un ruolo fondamentale in molti processi fisiologici, come la respirazione, il trasporto ionico, la regolazione acido-base e la biomineralizzazione. Il sito attivo dell'enzima è localizzato in una profonda tasca, situata nel centro dell'enzima, in cui è alloggiato lo ione Zn^{2+} che si lega a tre residui di istidina della proteina.

Le percentuali di inibizione dell'attività dell'enzima osservate sono risultate in linea con le tossicità attese sulla base dei diversi trattamenti subiti dai campioni.

I risultati osservati nel saggio con anidrasi carbonica sembrano confermare il potere discriminatorio del bioassay nei confronti della contaminazione da idrocarburi e dei metalli pesanti.

Diversi studi hanno dimostrato la sensibilità *in vitro* dell'enzima all'azione delle principali classi di contaminanti chimici ambientali: metalli pesanti, pesticidi, PCB e idrocarburi policiclici aromatici.

Da quanto emerso da una serie di esperimenti *in vitro* metalli pesanti come cadmio, probabilmente per sostituzione all'atomo di zinco del sito attivo (Lionetto *et al.*, 1998; Lionetto *et al.*, 2000), rame e mercurio sono in grado di inibire l'attività enzimatica in maniera dose-dipendente.

In particolare i composti chimici che esercitano una maggiore inibizione sull'attività di anidrasi carbonica sono pesticidi organofosfati > PCB > carbammati > IPA > metalli pesanti > flame retardants (in base ai valori di IC_{50}). In linea generale il bioassay presenta una maggiore sensibilità nei confronti di inquinanti chimici xenobiotici. È stata inoltre osservata una marcata sensibilità nei confronti degli effetti sinergici che più contaminanti possono manifestare quando sono presenti in miscele. Ad esempio l'effetto esercitato da una miscela di cadmio, mercurio e rame è significativamente superiore all'effetto esercitato dalla somma degli effetti dei singoli metalli pesanti.

Il bioassay *in vitro* offre una serie di vantaggi quali:

- la possibilità di ottenere da matrici ambientali informazioni di tossicità direttamente riferibili a potenziali effetti sulla salute umana. Il bioassay è basato sull'utilizzo dell'isoforma II di anidrasi carbonica bovina, la quale presenta un elevato grado di omologia con l'isoforma umana;
- la possibilità di superare un limite dei saggi ecotossicologici basati sull'utilizzo di organismi vivi rappresentato dalla eventuale interferenza nella misura di tossicità di sostanze allelopatiche o organismi patogeni per la specie test presenti nella matrice ambientale da testare;

- la possibilità di ottenere risultati attendibili, corrispondenti a quelli ottenuti con i test tradizionali, ma in tempi e con costi ridotti. Il bioassay non richiede l'utilizzo di strumentazione specializzata;
- soddisfa le recenti richieste della Comunità Europea che scoraggia per motivi etici l'applicazione di test di tossicità basati sull'utilizzo di organismi vivi.

I risultati ottenuti con il bioassay *in vitro* complementano quelli ottenuti attraverso i bioassay *in vivo*. Pertanto, l'integrazione dei dati forniti dalla batteria di bioassay *in vivo* e *in vitro* per i vari campioni di sedimento oggetto del presente studio, ha fornito dati di tossicità in linea con la tossicità attesa in base alle caratteristiche dei campioni, confermandone il potere discriminatorio e l'applicabilità come detector di contaminazione chimica dei sedimenti applicabile al monitoraggio ecotossicologico di ambienti marino-costieri.

4.2 BATTERIA DI BIOMARKER MOLECOLARI E CELLULARI

L'impatto dei contaminanti chimici sugli ecosistemi marini può essere evidenziato a diversi livelli di complessità biologica, dal livello molecolare a quello di comunità.

Quando un contaminante raggiunge un ecosistema può alterare lo stato di salute degli organismi provocando una sindrome da stress, cioè un'alterazione misurabile dello stato fisiologico che rende gli organismi più vulnerabili ad ulteriori variazioni ambientali (Viarengo *et al.*, 1998) e che può essere opportunamente quantificata mediante l'utilizzo di opportuni indici di stress, i biomarker. Le risposte che un organismo, una popolazione, o una comunità naturale possono generare nei confronti di uno stress chimico ambientale rappresentano un segnale integrato del livello di contaminazione di una determinata area e, di conseguenza, costituiscono un indicatore del livello di rischio tossicologico cui possono essere sottoposti.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati e standardizzati diversi approcci basati sulla bioindicazione e sull'impiego delle risposte fisiologiche degli organismi quali strumenti predittivi in grado di elaborare a priori una valutazione del rischio, interpretare e prevedere l'evolversi dei processi di inquinamento. L'impiego nei programmi di monitoraggio in ambiente marino-costiero dei mitili come organismi sentinella è raccomandato per via dell'ampia distribuzione geografica, dello stile di vita da filtratori sessili, della capacità di tollerare un range di condizioni sperimentali e di accumulare un gran numero di contaminanti sia organici che inorganici, la sensibilità alle maggiori classi di contaminanti ambientali e la disponibilità per esperimenti di traslocazione in campo (Viarengo and Canesi, 1991). La traslocazione di mitili provenienti da una singola popolazione

minimizza l'effetto di fattori di confusione come l'età e lo stato riproduttivo in grado di influenzare parametri fisiologici quali il bioaccumulo e le risposte dei biomarker.

La seconda fase di studio ha riguardato lo sviluppo di nuovi biomarker cellulari e molecolari di stress chimico in un approccio multimarker basato sull'impiego dell'organismo bioindicatore *Mytilus galloprovincialis*.

Il cosiddetto "multimarker approach" cioè lo studio integrato di più biomarker nello stesso organismo bioindicatore consente una migliore comprensione della complessa sindrome da stress indotta dalla presenza dei contaminanti chimici.

Ai fini dell'obiettivo dello studio, ovvero la definizione di precoci rivelatori di contaminazione chimica, sono state condotte indagini a livello cellulare e molecolare in grado di rivelare alterazioni a stadi precoci della risposta, prima che il danno cellulare integrato si manifesti a livello di organo o processi fisiologici dell'intero animale.

La batteria di biomarker molecolari e cellulari proposta ha indagato il potenziale applicativo di biomarker innovativi rappresentati da alterazioni morfometriche dei granulociti, e alterazione dell'attività dell'enzima anidrasi carbonica nei tessuti ghiandola digestiva, mantello e branchie, parallelamente a biomarker standardizzati quali concentrazione di metallotioneine in ghiandola digestiva e frequenza dei micronuclei in emociti. Allo studio della batteria di biomarker cellulari è stato poi affiancato un esperimento di fisiologia classica volto ad indagare il ruolo fisiologico dell'enzima anidrasi carbonica nell'attivazione del sistema lisosomiale in cellule della ghiandola digestiva di mitilo.

Gli esperimenti in campo sono stati condotti su mitili della specie *M. galloprovincialis* traslocati nei siti di Brucoli e Rada di Augusta, rispettivamente sito di controllo e sito impattato. Sono state effettuate una campagna di traslocazione invernale (novembre-dicembre 2013) ed una campagna estiva (giugno-luglio 2014) nell'ambito del progetto PRIN prot.2010ARBLT7 dal titolo "La system biology nello studio degli effetti di xenobiotici in organismi marini per la valutazione dello stato di salute dell'ambiente: applicazioni biotecnologiche per potenziali strategie di ripristino". Il progetto ha previsto contemporaneamente campagne di traslocazione di mitili lungo la costa siciliana orientale (sito di Augusta e di Brucoli) e lungo la costa campana (sito di Bagnoli). Il presente lavoro, nell'ambito della parte di attività sperimentali svolta in collaborazione con il Laboratorio di Fisiologia Generale dell'Università del Salento, ha focalizzato l'attenzione sulla campagna di traslocazione lungo la costa siciliana.

Nello studio gli organismi sono stati traslocati per 45 giorni, intervallo di tempo sufficiente a garantire che individui sani potessero sviluppare risposte molecolari e cellulari a stress chimici ambientali e a garantire l'adattamento degli organismi alle nuove condizioni ambientali (l'intervallo di tempo standardizzato a livello internazionale e internazionale nei programmi di Mussel Watch è pari a 30 giorni, nello studio gli organismi sono stati mantenuti per 45 giorni per motivi tecnici).

La batteria ha previsto l'indagine del potenziale applicativo in campo delle alterazioni morfometriche indotte dai contaminanti chimici nei granulociti dei mitili, recentemente proposto da Calisi *et al.* (2008) come biomarker sensibile e rapido di esposizione a contaminazione chimica in ambienti marini.

L'emolinfia è particolarmente interessante dal punto di vista tossicologico perché in grado di trasportare i contaminanti attraverso il sistema vascolare, mentre le sue cellule sono coinvolte nei meccanismi di difesa dell'organismo, nei processi di digestione, nel trasporto di nutrienti e nei meccanismi di riparo, per cui qualsiasi danno al funzionamento di tali componenti cellulari può ripercuotersi sulla salute dell'intero organismo (Carballal *et al.*, 1997).

Come dimostrato da diversi autori gli emociti rappresentano uno dei primi target di azione tossica nei molluschi marini (Da Ros and Nesto, 2005; Canesi *et al.*, 2006; McCormick-Ray, 1987; Gestal *et al.*, 2008; Franzellitti and Fabbri, 2013).

Lo studio delle alterazioni morfo-funzionali degli emociti indotte dall'esposizione a contaminanti chimici è fondamentale ai fini di una completa comprensione degli effetti biologici associati alla contaminazione chimica in ambienti marino-costieri.

Diversi studi hanno evidenziato la presenza di alterazioni morfometriche in emociti di mitili esposti a metalli pesanti (Lionetto *et al.*, 2004; Calisi *et al.*, 2008).

I granulociti, caratterizzati da un'intensa attività fagocitaria e da un sistema lisosomiale molto più sviluppato rispetto agli altri tipi cellulari, sono coinvolti in numerosi processi fisiologici tra cui la difesa immunitaria (Calisi *et al.*, 2008). L'insorgenza di alterazioni morfologiche e funzionali in tali cellule indotte dai contaminanti chimici ambientali può determinare una compromissione dello stato di salute degli organismi, con conseguente riduzione dell'energia disponibile per l'accrescimento e per la riproduzione.

Per l'individuazione delle alterazioni morfometriche negli emociti dei mitili esposti è stato utilizzato un protocollo di colorazione citologica largamente impiegato in campo medico e veterinario denominato Diff Quick. L'utilizzo di questo kit è risultato utile per la rapidità del tempo

di colorazione che oscilla intorno ai 15 secondi, per l'economicità del kit e per la possibilità di accentuare la colorazione dei componenti acidofili o basofili delle cellule. Il Diff Quick permette una buona colorazione dei nuclei, evidenziando lo stato di cromatina e del citoplasma nel quale si possono distinguere i granuli che caratterizzano alcuni tipi cellulari. Sono, inoltre, ben visibili i contorni delle cellule. L'analisi morfometrica dei granulociti colorati con la tecnica Diff Quick è stata effettuata in microscopia ottica. Le immagini acquisite sono state analizzate mediante un sistema di analisi d'immagine, che ha permesso uno studio dimensionale dell'area e del perimetro dei granulociti e dell'area dei lisosomi.

Per entrambe le campagne di traslocazione l'analisi dimensionale delle immagini bidimensionali digitalizzate dei granulociti ha evidenziato un significativo incremento dell'area dei granulociti degli organismi traslocati per 45 giorni nel sito impattato rispetto agli organismi di controllo esposti per lo stesso intervallo di tempo nel sito di Brucoli.

L'analisi statistica dei dati effettuata mediante ANOVA a due vie ha considerato come fattori di variabilità il "sito di traslocazione" e il "periodo di traslocazione" evidenziando, oltre ad un effetto significativo del fattore di variabilità sito di traslocazione, un effetto significativo dell'interazione tra i due fattori di variabilità. Tale risultato dimostra come le alterazioni morfometriche di emociti di mitilo rappresentino una risposta a condizioni di esposizione ad impatto antropico, ma tale risposta sembra essere influenzata dalla stagionalità. Infatti l'incremento dell'area cellulare osservato negli emociti di organismi provenienti dal sito impattato di Augusta rispetto al sito di controllo nel campionamento estivo risulta maggiore rispetto a quello osservato nella campagna invernale.

L'incremento del volume dei granulociti osservato potrebbe essere indice dell'alterazione dei meccanismi di regolazione del volume cellulare, come ad esempio di effetti sulla pompa Na^+/K^+ -ATP-asi, sensibile all'esposizione a contaminanti organici e inorganici (Brooks and Mills, 2003; Sancho *et al.*, 2003). In base a tale ipotesi sarebbe possibile spiegare il rigonfiamento cellulare in condizioni isotoniche. Infatti, l'alterazione del funzionamento della Na^+/K^+ -ATPasi comporterebbe un'alterazione dell'omeostasi ionica e osmotica della cellula con conseguente compromissione dell'equilibrio osmotico tra cellula e ambiente extracellulare e conseguente rigonfiamento osmotico cellulare. L'ingrandimento cellulare è accompagnato da una proliferazione lisosomiale, che non è evidente valutando il rapporto area lisosomiale/area cellulare, ma in valore assoluto.

Nel presente lavoro di tesi è stato osservato come l'incremento dell'area cellulare dei granulociti sia accompagnato ad un incremento corrispondente nel compartimento lisosomiale, presumibilmente

dovuto ad un incremento nel numero e nelle dimensioni di lisosomi secondari. Infatti, l'analisi dimensionale dell'area coperta dai lisosomi in immagini di granulociti ha evidenziato per entrambe le campagne un incremento significativo dell'area dei lisosomi nei granulociti dei mitili traslocati nel sito Rada di Augusta rispetto ai controlli, mentre è stato osservato per entrambe le campagne di traslocazione un andamento costante del rapporto area lisosomiale/area cellulare negli stessi organismi rispetto al controllo.

L'incremento dell'area lisosomiale osservato in parallelo potrebbe riflettere un'attivazione del comparto lisosomiale a seguito di un incrementata attività fagocitaria, di un incremento dei processi degradativi e dei processi autofagici, spesso osservati in condizioni di esposizione a stress chimico. L'attivazione del sistema lisosomiale a sua volta suggerisce l'attivazione di una risposta immunitaria aspecifica da parte dell'organismo.

Il ruolo del comparto lisosomiale nell'uptake, nell'accumulo e nel metabolismo di xenobiotici e nella compartimentalizzazione e detossificazione dei cationi dei metalli pesanti nelle cellule di invertebrati marini è ampiamente riconosciuto (Viarengo, 1989, Viarengo and Nott, 1993).

Diversi studi riportano l'induzione dell'autofagia, oltre alla riduzione della stabilità della membrana lisosomiale, tra le risposte fisiologiche e le reazioni patologiche agli stressor ambientali negli emociti e nelle cellule digestive dei molluschi bivalvi (Moore *et al.*, 1988; Cajaraville *et al.*, 1995b; Domouhtsidou et Dimitriadis, 2001; Etxeberria *et al.*, 1994, 1995).

Il verificarsi di una patologia spesso comporta un'alterazione della funzionalità dei lisosomi (che può determinare una digestione intracellulare perturbata, che a sua volta inficia rapidamente lo stato nutrizionale delle cellule) con profondi effetti sia sui tessuti che sull'intero organismo.

I risultati ottenuti supportano l'applicabilità in campo delle alterazioni morfometriche dei granulociti indotte dai contaminanti in organismi sentinella quale biomarker sensibile, di facile utilizzo e dai costi contenuti.

L'eventuale insorgenza di variazioni morfologiche e funzionali indotta nei granulociti dai contaminanti potrebbe determinare una compromissione dello stato di salute degli organismi e ridurre la capacità di sopravvivenza, per cui le misure delle alterazioni indotte nei granulociti rappresentano un potenziale biomarker di effetto, direttamente correlabile alla salute dell'organismo.

L'incremento dell'area dei lisosomi osservata contestualmente all'incremento del volume dei granulociti potrebbe riflettere un'attivazione del sistema lisosomiale che a sua volta suggerirebbe

un'attivazione della risposta immunitaria dell'organismo indotta dall'esposizione ai contaminanti. D'altra parte diversi studi (Moore *et al.*, 1996; Cajaraville and Pal, 1995a) riportano un'associazione tra variazioni del volume lisosomiale e manifestazioni aspecifiche di danno dovuto all'esposizione a contaminanti organici e inorganici.

La consistenza delle alterazioni morfometriche dei granulociti osservate negli emociti dei mitili esposti nel sito ad impatto antropico è comprovata dai risultati osservati applicando un biomarker standardizzato di genotossicità, l'analisi della frequenza di comparsa dei micronuclei in emociti.

Per entrambe le campagne di traslocazione l'applicazione del test dei micronuclei ha permesso di osservare un significativo incremento della frequenza dei micronuclei negli emociti dei mitili traslocati in Rada rispetto ai controlli, indice di un livello elevato di danno genotossico.

L'analisi statistica mediante ANOVA a due vie ha evidenziato come risultino significativi i fattori di variabilità considerati, "sito di traslocazione" e "periodo di traslocazione", mentre non risulta significativa la loro interazione.

I mitili sono ritenuti un valido organismo sentinella per lo studio degli effetti genotossici degli inquinanti mutageni in ambiente marino (Bolognesi *et al.*, 1996; Burgeot *et al.*, 1996). In particolare la specie *M. galloprovincialis* è stata oggetto di studi *in vivo* e *in vitro* (Brunetti *et al.*, 1988, Bolognesi *et al.*, 1993) ed è impiegata nell'ambito di numerosi programmi di monitoraggio per la valutazione del rischio genotossico (UNEP, 1999).

L'incrementato livello di danno genotossico osservato nei mitili traslocati nell'area contaminata indica la presenza di composti genotossici nelle acque marine del sito.

La valutazione del danno citogenetico indotto negli organismi dalla presenza dei contaminanti è uno degli obiettivi del monitoraggio in ambiente marino. Più di 1000 composti cancerogeni sono stati identificati nei sedimenti marini di aree contaminate. Solo di recente l'impiego di metodi standard per la valutazione del danno genotossico ha reso possibile determinare gli effetti mutageni negli invertebrati marini e rilevare una correlazione diretta tra aberrazioni cromosomiche, inibizione di enzimi nucleari e altri effetti correlati all'accumulo di metalli pesanti e idrocarburi policiclici aromatici (UNEP, 1999).

Con il test dei micronuclei si misura la frequenza di rotture cromosomiche grossolane, con perdita di frammenti dal fuso mitotico. Un aumento della loro comparsa è indice di un danno al DNA.

I micronuclei sono stati utilizzati come misura di attività genotossica in condizioni di laboratorio e di campo (Scarpato *et al.*, 1990), la loro frequenza fornisce un indice del danno genetico accumulato durante il ciclo di vita delle cellule, spesso durante brevi fasi di contaminazione (Bolognesi *et al.*, 1996; UNEP, 1999). Organismi esposti a composti mutageni possono esibire una frequenza incrementata dei micronuclei anche dopo che l'esposizione è cessata, il che suggerisce la capacità del test di fornire un dato integrato nel tempo del danno genotossico negli organismi marini (Bolognesi *et al.*, 1996). Il metodo impiegato, rapido e di semplice esecuzione, prevede l'analisi in epifluorescenza del materiale genetico colorato con la metodica DAPI. L'impiego di sistemi di analisi automatizzati e di criteri di identificazione dei micronuclei chiaramente definiti rendono il test dei micronuclei un valido strumento applicabile al monitoraggio di routine in ambiente marino-costiero. UNEP (1999) propone la misura del danno genetico come indice generale di stress da incorporare all'analisi dello stato fisiologico degli organismi test al tempo del campionamento, ai fini di una opportuna valutazione delle risposte dei biomarker. L'interpretazione dei dati è invece complicata dalle variazioni stagionali dei micronuclei determinate dal ciclo sessuale dell'organismo e dalla confusione con infezioni virali. La sensibilità del test, basato sulle aberrazioni cromosomiche che appaiono durante la mitosi, potrebbe essere correlata a caratteristiche cellulari e al periodo nutrizionale. Uno studio di Burgeot (1996) correla l'elevata frequenza dei livelli di micronuclei osservata in mitili campionati da un'area a forte impatto antropico situata lungo la costa francese nei mesi di Febbraio e Marzo alle variazioni stagionali relative alla regolazione di stock e glicogeni all'inizio della primavera.

Il ciclo sessuale di *M. galloprovincialis* può influenzare la formazione dei micronuclei (Burgeot *et al.*, 1996). Il periodo riproduttivo potrebbe essere punteggiato da deposizione delle uova e rigenerazione delle gonadi con ristrutturazione delle riserve consumate durante la gametogenesi, dunque il periodo di emissione dei gameti potrebbe essere seguito da un periodo di ristrutturazione delle gonadi con un'intensa rigenerazione dei tessuti. Tale periodo può influenzare la formazione degli emociti e l'induzione dei micronuclei. Gli emociti costituiscono il sito di deposito dei glicogeni e sono implicati nel trasporto dei glicogeni e delle riserve agli organi (Henry *et al.*, 1990).

La validità del test dei micronuclei può essere migliorata dalla disponibilità di informazioni più precise su tali periodi di rigenerazione e sulla loro relazione con la frequenza mitotica. Ad oggi non sono disponibili abbondanti informazioni circa la frequenza mitotica. L'utilizzo del test nel monitoraggio in ambiente marino richiede dunque ulteriori informazioni circa l'origine emopoietica, cellule staminali, cinetica della divisione cellulare degli emociti di mitilo (Burgeot *et al.*, 1996)

Parallelamente alle analisi citologiche sugli emociti, è stato condotto, nei tessuti ghiandola digestiva, mantello e branchie degli organismi sentinella traslocati, lo studio dell'attività dell'enzima anidrasi carbonica allo scopo di valutarne l'applicabilità in batterie di biomarker finalizzate al monitoraggio di ambienti marino-costieri.

Anidrasi carbonica è uno zinco metalloenzima, catalizza l'idratazione reversibile di CO_2 per produrre H^+ e HCO_3^- . La sua attività è virtualmente ubiquitaria in natura. L'enzima è presente in batteri, piante, alghe e animali e gioca un ruolo chiave in un'ampia varietà di processi fisiologici che coinvolgono CO_2 e HCO_3^- .

Negli organismi animali i vari isoenzimi di anidrasi carbonica sono stati determinati in diversi tessuti e sono coinvolti in una serie di processi fisiologici quali calcificazione, trasporto ionico, regolazione acido-base e in processi metabolici come le reazioni biosintetiche gluconeogenesi, lipogenesi, ureagenesi. Negli invertebrati marini l'enzima è implicato nella deposizione di sali di carbonato di calcio (Böttcher *et al.*, 1991), mentre nelle alghe e nelle piante gioca un importante ruolo nella fotosintesi (Ivanov *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010).

E' dunque ipotizzabile che eventuali alterazioni dell'attività dell'enzima indotte da contaminanti chimici ambientali possano compromettere le funzioni fisiologiche che da esse dipendono e portare a manifestazioni di danno a livello di organismo.

L'attività di anidrasi carbonica è stata saggiata applicando un protocollo di dosaggio di tipo elettrometrico basato sul principio secondo cui l'attività di anidrasi carbonica in una soluzione debolmente tamponata contenente opportuni volumi di omogenato di tessuto, alla quale venga fornito costantemente il substrato dell'enzima (ossia l'anidride carbonica), può essere quantificata elettrometricamente attraverso la velocità di diminuzione di pH della soluzione stessa.

L'attività enzimatica di anidrasi carbonica è stata indagata nei tessuti di mitili traslocati nei siti Rada di Augusta (sito ad impatto antropico) e Brucoli (sito di riferimento) nella campagna di traslocazione invernale (novembre-dicembre 2013) e nella campagna estiva (giugno-luglio 2014).

I livelli incrementati di attività di anidrasi carbonica manifestati in ghiandola dai mitili traslocati per 45 giorni nel sito impattato rispetto ai controlli nelle due campagne di traslocazione hanno evidenziato la sensibilità dell'attività enzimatica all'esposizione ad inquinamento chimico ambientale ed hanno sottolineato come la risposta dell'enzima all'esposizione sia influenzata dal periodo stagionale in cui si effettua il campionamento.

L'analisi statistica mediante ANOVA a due vie ha considerato i fattori di variabilità "sito di traslocazione" e "periodo di traslocazione" ed ha confermato la significatività del fattore "sito di traslocazione" e dell'interazione tra i due fattori.

Per il secondo tessuto indagato, il mantello, è stato riscontrato un andamento differente tra le due campagne di traslocazione dei livelli di attività enzimatica misurati rispetto ai controlli nei mitili traslocati in Rada di Augusta. In questo tessuto la stagionalità sembra avere un peso rilevante sull'attività di anidraasi carbonica che in estate, nel periodo riproduttivo, manifesta livelli basali significativamente incrementati anche negli organismi di controllo. L'ANOVA a due vie riporta un'elevata significatività del fattore stagionalità, mentre non risulta significativo il fattore "sito di traslocazione." L'elevata significatività dell'interazione dei due fattori di variabilità evidenzia come l'incremento stagionale dell'attività di anidraasi carbonica sia influenzato dall'esposizione ad inquinamento chimico. Infatti l'analisi statistica mediante Bonferroni post test ($P < 0.01$) conferma l'incremento significativo di attività nel sito esposto ad impatto antropico rispetto al sito di controllo nel periodo invernale.

L'attività di anidraasi carbonica registrata nei mitili traslocati nel sito impattato nelle branchie risulta mediamente più bassa rispetto a quella misurata in ghiandola digestiva e mantello attestandosi attorno a valori di poco inferiori nel periodo invernale e di poco superiori nel periodo estivo a quelli manifestati dal gruppo di controllo.

La sensibilità dell'attività di anidraasi carbonica all'esposizione a contaminanti chimici osservata nei mitili esposti è risultata tessuto-specifica avendo evidenziato andamenti dei livelli dell'enzima diversificati in ghiandola digestiva, mantello e branchie.

Dai risultati ottenuti emerge una significativa induzione di anidraasi carbonica in ghiandola digestiva, un'induzione di anidraasi carbonica nel mantello fortemente influenzata dalla stagionalità e una blanda attività a livello branchiale, il che suggerisce la presenza di isoforme diverse con sensibilità diverse nei tre tessuti: la misura dell'attività di anidraasi carbonica può dunque rappresentare un marker in grado di fornire risposte diverse a seconda dei diversi tessuti.

Considerata la sensibilità nei confronti dell'esposizione ad inquinanti chimici ambientali manifestata dall'enzima anidraasi carbonica in particolar modo a livello della ghiandola digestiva, si è voluto indagare sul ruolo fisiologico di anidraasi carbonica a livello di tale organo. L'enzima potrebbe infatti giocare un ruolo nell'incremento, indotto dall'esposizione a contaminanti chimici ambientali, delle attività e delle dimensioni del sistema lisosomiale, sopperendo all'aumentato fabbisogno di protoni.

Per valutare tale ipotesi è stato condotto uno studio *in vivo* di esposizione ad acetazolamide, inibitore specifico di anidrasi carbonica. L'esperimento è stato condotto in condizioni controllate di laboratorio su mitili della specie *M. galloprovincialis*. ed ha previsto la marcatura dei lisati cellulari di ghiandola digestiva con la sonda fluorescente LysoSensorTM GreenDND-189.

La misura spettrofluorimetrica dell'intensità di fluorescenza emessa dai lisati cellulari ha permesso di quantificare l'effetto dell'esposizione all'inibitore dell'enzima sull'attività del sistema lisosomiale. L'esperimento ha dimostrato che l'attività di anidrasi carbonica in ghiandola digestiva è funzionalmente coinvolta nell'acidificazione del comparto lisosomiale e, pertanto, nella funzionalità del sistema lisosomiale stesso. Tale link funzionale giustifica d'altra parte l'elevata attività specifica di anidrasi carbonica manifestata dalla ghiandola digestiva rispetto ad altri tessuti come mantello e branchie.

Concludendo, l'attività di anidrasi carbonica rilevata nel tessuto può essere messa in relazione al fatto che le cellule della ghiandola digestiva, in particolare quelle acidofile, essendo responsabili della digestione intracellulare del cibo, possiedono un sistema lisosomiale molto sviluppato rispetto ad altri tessuti. La ghiandola digestiva dei molluschi costituisce il maggior sito di accumulo e di immagazzinamento di xenobiotici e metalli pesanti.(Widdows *et al.*, 1983). Questi vengono sottratti al citoplasma cellulare per essere sequestrati all'interno del comparto lisosomiale (Moore, 1985) dove inducono l'attivazione del sistema lisosomiale, caratterizzata da variazioni della morfologia dei lisosomi e, in particolare, dell'aumento di dimensioni di questi organuli (Cajaraville *et al.*, 1995b; Marigomez *et al.*, 1996). Un incremento dimensionale del sistema lisosomiale, fortemente acido, ha per conseguenza un maggior apporto di protoni dal citoplasma. Ciò è garantito dalla pompa H^+ -ATPasi che accumula attivamente H^+ all'interno degli organelli sottraendoli al citoplasma. Tale processo comporta un aumentato fabbisogno di protoni in cellula. CA, catalizzando la produzione di H^+ a partire dalla CO_2 metabolica, può produrre gli H^+ necessari per l'acidificazione dei lisosomi. Tenendo conto della possibile relazione funzionale tra CA e comparto lisosomiale, l'induzione di CA in ghiandola digestiva indotta dall'esposizione può essere messa in relazione con l'attivazione del sistema lisosomiale ampiamente descritta in letteratura nella ghiandola digestiva di molluschi esposti a contaminanti (Cajaraville *et al.*, 1995b; Marigómez and BayBay-Villacorta, 2003; Marigómez *et al.*, 2005a; Marigómez *et al.*, 2005b; Marigómez *et al.*, 1996; Domouthsidou and Dimistriadis, 2001).

L'applicazione della misura dell'espressione di CA nella ghiandola digestiva in un approccio multimarker va dunque anche nella direzione di complementare le informazioni fornite dallo studio del sistema lisosomiale. I lisosomi sono coinvolti in processi chiave per l'integrità funzionale della

cellula che includono la degradazione delle proteine, il turnover di macromolecole, la rapida mobilizzazione delle riserve (ad esempio durante la gametogenesi nei molluschi bivalvi). Le cellule digestive dei molluschi bivalvi possiedono un complesso sistema endolisosomiale coinvolto nell'uptake e nella digestione del materiale alimentare e nei processi di accumulo e detossificazione dei contaminanti (Owen, 1972; Henry *et al.*, 1991, Cajaraville *et al.*, 1995b). Diversi studi hanno evidenziato la capacità del sistema lisosomiale delle cellule digestive di mitilo di rispondere ad un'ampia varietà di contaminanti e a differenti stressor ambientali (Etxeberria *et al.*, 1995). Tali risposte manifestano un'elevata sensibilità all'azione tossica degli xenobiotici, per cui rappresentano potenziali early warning biomarker degli effetti biologici dei contaminanti (Moore, 1985; 1988; Cajaraville, 1995 b, 2000; UNEP, 1999). Data l'importanza dei lisosomi nella funzione immunitaria è dunque evidente che l'insorgenza di alterazioni lisosomiali indotte dai contaminanti chimici ambientali può determinare una compromissione generale dello stato di salute degli organismi, una minore energia disponibile per la crescita dei tessuti somatici e una riduzione del potenziale riproduttivo. Diverse fonti di stress ambientale, tra cui l'esposizione a numerosi contaminanti chimici sia organici che inorganici, variazioni della salinità, temperature elevate, malnutrizione, o particolari momenti del ciclo vitale, come la fase riproduttiva, possono provocare un incremento delle dimensioni dei lisosomi della ghiandola digestiva (Lowe *et al.*, 1981; Moore *et al.*, 1988; Lowe, 1988; Cajaraville *et al.*, 1989, 1995b; Marigómez *et al.*, 1996; Marigómez and Baybay-Villacorta, 2003; Regoli, 1992, Domouhtsidou and Dimitriadis, 2001; Etxeberria *et al.*, 1994, 1995) con rigonfiamento dei lisosomi e aumento delle attività idrolasiche (Lowe, 1988). Questo aumento sia in volume che in superficie delle dimensioni dei lisosomi può essere dovuto ad un incrementato turnover delle proteine, ad un aumento di fenomeni di fusione tra vacuoli e all'induzione dell'autofagia (Moore *et al.*, 1988; Cajaraville *et al.*, 1995b; Domouhtsidou and Dimitriadis, 2001; Etxeberria *et al.*, 1994, 1995). Alcuni autori ritengono che composti organici polari possono provocare una maggiore risposta lisosomiale di quelli meno polari (Cajaraville *et al.*, 1989).

Un'importante aspetto emerso dallo studio dell'attività di anidrasi carbonica è rappresentato dall'influenza della stagionalità sull'attività di anidrasi carbonica nel mantello. Nel tessuto risiedono le gonadi, per cui l'incremento dei livelli basali di attività dell'enzima osservati nella campagna estiva, durante il periodo riproduttivo, è ascrivibile allo stato fisiologico dell'organismo.

La stagionalità rappresenta un elemento rilevante della fisiologia dei mitili: i livelli di numerosi biomarker possono fluttuare significativamente durante l'anno in funzione dello stato nutrizionale e del ciclo riproduttivo dell'organismo, ma anche della variabilità stagionale dei contaminanti

presenti sia nell'organismo acquatico che nei tessuti degli organismi stessi (Sheehan and Power, 1999).

Il mantello è inoltre responsabile della secrezione dei materiali costitutivi della conchiglia, tra cui il carbonato di calcio; pertanto, la presenza di attività di anidraasi carbonica in questo organo è da mettere in relazione alla deposizione di tale sale per la formazione degli strati calcarei delle valve. L'attività di anidraasi carbonica nelle branchie è probabilmente da mettere in relazione al suo coinvolgimento nei processi di escrezione di CO₂ dall'emolinfa all'ambiente esterno.

I risultati sulla sensibilità in campo dell'attività di AC rappresentano il presupposto per considerare l'attività di anidraasi carbonica in ghiandola digestiva come potenziale biomarker di contaminazione chimica da utilizzare in indagini ecotossicologiche soprattutto nell'ottica del multimarker approach.

La natura ubiquitaria dell'enzima negli organismi viventi rende anidraasi carbonica un biomarker particolarmente versatile, applicabile all'indagine degli effetti dei contaminanti in numerosi livelli trofici e in numerosi ambienti.

Il metodo di misura impiegato è semplice da utilizzare, richiede tempi di esecuzione brevi, un'attrezzatura dai costi relativamente contenuti e consente misure accurate. Tali caratteristiche ne supportano l'impiego in indagini di routine nell'ambito del monitoraggio di ambienti marino costieri. Poche informazioni sono ad oggi disponibili sulla relazione diretta tra esposizione a chimici ambientali, risposta dell'enzima e effetti avversi sulla salute. Resta da stabilire la relazione che lega l'alterazione dell'attività dell'enzima agli eventuali effetti di danno a livello dell'intero organismo. D'altra parte le variazioni dell'attività di AC in ghiandola digestiva sono strettamente associate ad alterazioni del sistema lisosomiale e in questo potrebbe risiedere un legame indiretto tra aumento dell'attività di AC nella ghiandola digestiva ed effetti sull'intero individuo.

Sono tuttavia necessari ulteriori studi per caratterizzare meglio la risposta di *anidraasi carbonica* all'esposizione a contaminanti negli organismi e implementare il potenziale della misura dell'attività di questo enzima nel monitoraggio ambientale. L'elevata specie-specificità e tessuto-specificità delle risposte osservate suggerisce la necessità di una migliore conoscenza delle alterazioni di CA indotte dai contaminanti nello specifico bioindicatore impiegato (Lionetto *et al.*, 2012). Ad oggi sono ad esempio disponibili pochi dati sulla variabilità naturale di CA nelle differenti specie. L'attività di AC potrebbe risentire in condizioni di esposizione *in vivo* di effetti additivi/sinergici della presenza di più metalli nel mezzo ambientale.

L'impiego di una risposta biologica quale biomarker nel biomonitoraggio ambientale richiede il possesso di una serie di caratteristiche: sensibilità, semplicità di misura, risposta dose-dipendente ai contaminanti. E' inoltre necessario che sia caratterizzata la variabilità dovuta alla variazione naturale della risposta (ad esempio stagionalità, temperatura, sesso, peso e manipolazione).

Gli studi *in vivo* e *in vitro* condotti sino ad oggi riportano una sensibilità dose-risposta dell'attività di anidraasi carbonica di un'ampia varietà di tessuti a diverse classi di contaminanti, sia metalli pesanti che xenobiotici, suggerendone un possibile impiego come biomarker generale di contaminazione.

L'attività di CA è virtualmente sempre espressa in eccesso nei processi fisiologici supportati da tale enzima. Tuttavia, alcune evidenze sperimentali indicano compromissione di alcune funzioni fisiologiche determinate dall'inibizione indotta dai contaminanti dell'enzima (Lionetto *et al.*, 2012). Ad esempio Soto *et al.* (2000) hanno osservato un significativo decremento nella crescita delle valve in *M. galloprovincialis* esposti a metalli pesanti, il che potrebbe essere dovuto all'inibizione della CA nel mantello osservata da Lionetto *et al.* (2006) in un esperimento di esposizione *in vivo*.

Le variazioni dell'attività di anidraasi carbonica osservate in ghiandola digestiva nei mitili traslocati nel sito a forte impatto antropico risultano in parallelo all'andamento di un biomarker convenzionale ampiamente impiegato in indagini di routine, la concentrazione di metallotioneine in ghiandola digestiva. Il metodo impiegato si basa sulla determinazione del contenuto sulfidrilico delle metallotioneine: il metodo è sensibile, dai costi e dai tempi limitati, in grado di ed è standardizzato e intercalibrato con numerosi laboratori (Viarengo *et al.*, 1997; UNEP, 1999).

Le metallotioneine sono proteine ad alto contenuto di gruppi sulfidrilici, possiedono un'elevata affinità per i metalli pesanti non essenziali come cadmio e mercurio (Langstone *et al.*, 1998) e sono responsabili del processo di detossificazione dei metalli. In condizioni normali le cellule dell'organismo sono dotate di livelli basali di metallotioneine, necessarie a mantenere l'omeostasi di metalli pesanti essenziali come zinco e rame, garantito attraverso il mantenimento della concentrazione intracellulare dei cationi liberi di zinco e rame a sua volta operato legando i metalli in eccesso in una forma non tossica e agendo da deposito di rame e zinco per un successivo impiego e per la riattivazione di *apoproteine* che richiedono questi metalli per la loro attività (UNEP, 1999). Diversi studi hanno dimostrato come l' induzione di tali proteine sia una risposta diretta all'aumento della concentrazione intracellulare dei cationi dei metalli pesanti, per cui sono considerate un biomarker specifico di esposizione a tale classe di contaminanti.

George and Olsson (1994) hanno evidenziato come i tessuti di mitilo siano buoni indicatori di inquinamento da cadmio, mercurio e rame, ma non di inquinamento da zinco. I cationi dei metalli pesanti presentano un'elevata affinità per i residui -SH con il seguente gradiente di affinità: Hg (II) > Cu (I) > Cd (II) > Cu (II) > Zn (II) (Viarengo and Nott, 1993; Viarengo, 1994).

L'induzione della biosintesi delle metallotioneine da parte dei cationi dei metalli pesanti è relativamente lenta e una considerevole tossicità si può manifestare prima della manifestazione di effetti a livello delle metallotioneine (Viarengo, 1994). Tuttavia la sintesi *de novo* di queste proteine può risultare in costi biologici che riducono la fitness dell'individuo (UNEP, 1999).

I livelli di metallotioneine misurati in ghiandola negli organismi esposti nel sito Rada di Augusta nel periodo giugno-luglio 2014 hanno evidenziato un notevole incremento rispetto agli organismi di controllo, dato che indica chiaramente una contaminazione da metalli pesanti del sito. Recenti studi riportano un'elevata contaminazione della Rada, in particolare da mercurio e idrocarburi policiclici aromatici (Di Leonardo, 2007; 2008; Ausili *et al.*, 2008), mentre uno studio di Bonsignore *et al.* (2013) riporta un significativo bioaccumulo di mercurio in organismi esposti nell'area.

La presenza e l'induzione delle proteine può essere influenzata da glucocorticoidi (ormoni da stress, prodotti dal surrene), condizioni di stress, ipossia, basse temperature.

Un altro fattore in grado di influenzare i livelli di metallotioneine nei mitili è rappresentato dallo stress riproduttivo che pone urgenti richieste di alcuni precursori metabolici come i metalli essenziali (Zn, Cu). Tale richiesta può stimolare il deposito, trasporto e rilascio di questi metalli ai siti metabolici. Questo processo fitta esattamente con la funzione delle metallotioneine e giustifica la loro temporanea sintesi elevata durante questo tipo di stato fisiologico (Viarengo, 1988).

Alcuni studi suggeriscono che la presenza di xenobiotici organici nei campioni ambientali possa ridurre la sintesi di metallotioneine. Gli xenobiotici organici tendono ad accumularsi nei lisosomi e destabilizzano l'integrità della membrana lisosomiale, di conseguenza inficiano il tasso catabolico delle proteine cellulari, inclusa l'integrità del biomarker (Viarengo, 1989).

Nel complesso l'analisi della batteria di biomarker molecolari e cellulari ha confermato la validità dell'utilizzo dei mitili attraverso tecniche di traslocazione attiva quale importante strumento per integrare la valutazione del rischio ambientale in aree esposte ad impatto antropico. Le risposte biologiche dei mitili traslocati hanno evidenziato alterazioni significative nell'area di Augusta, manifestando un livello di disturbo biologico elevato.

5. CONCLUSIONI

- 1) Nel presente lavoro di tesi è stato sviluppato e applicato in campo un approccio integrato di biomonitoraggio marino-costiero basato sull'utilizzo di saggi ecotossicologici su sedimento e biomarker nell'organismo sentinella *Mytilus galloprovincialis*. Tale approccio è stato applicato ad un ambiente esposto a forte impatto antropico quale la Rada di Augusta (Siracusa) caratterizzato da una complessa condizione di contaminazione chimica ambientale ascrivibile sia ad inquinanti chimici di tipo organico (idrocarburi) che di tipo inorganico (metalli pesati).
- 2) La batteria di saggi ecotossicologici proposta comprende sia saggi *in vivo* che *in vitro* e si configura come uno strumento di screening della tossicità dei sedimenti marino-costieri dotato di buon potere discriminatorio, per applicazioni di routine nel monitoraggio ambientale. La batteria di bioassay risponde alla necessità, nell'ambito del biomonitoraggio marino-costiero, di avvalersi di tecnologie innovative che utilizzino sistemi biologici come precoci rivelatori della presenza di contaminanti chimici biodisponibili nei sedimenti. Il nuovo bioassay *in vitro* basato sull'inibizione dell'attività di anidrasi carbonica ha dimostrato piena applicabilità al monitoraggio della qualità ecotossicologica di sedimenti di aree marino-costiere esposte a stress chimico ambientale
- 3) La batteria di saggi prescelta risponde alla necessità di integrare le informazioni fornite da diverse matrici e tipologie di saggio (*in vivo*, *in vitro*). Infatti, i saggi *in vivo* consentono di valutare le tossicocinetiche degli inquinanti, mentre gli endpoint saggiati, fornendo informazioni sulla performance e la fitness degli organismi test, presentano un'elevata rilevanza ecologica nel predire effetti a livello di popolazione. I bioassay *in vitro* si configurano come strumenti sensibili, rapidi, di semplice esecuzione per il monitoraggio della tossicità di campioni ambientali e per la previsione dei potenziali effetti tossicologici per l'ambiente. L'applicazione di una batteria integrata di saggi *in vitro* ed *in vivo* consente di superare alcuni limiti legati alle due tipologie di saggi. Infatti, un limite dei saggi *in vivo* è rappresentato dalla presenza di potenziali effetti sugli organismi test di sostanze allelopatiche o di organismi patogeni eventualmente presenti nella matrice da saggiare. D'altro canto i saggi *in vitro*, se da un lato sono meno influenzati da variabili ambientali e sono in grado di rispondere in maniera sensibile e specifica a contaminanti con meccanismi d'azione specifici e ben caratterizzati, dall'altro sono limitati dal fatto che i risultati da essi prodotti sono difficilmente estrapolabili a potenziali effetti a livello di intero organismo.
- 4) L'approccio multimarker basato sulla misura di risposte cellulari e molecolari nell'organismo sentinella *Mytilus galloprovincialis* traslocato nelle aree di studio si è

rilevato molto sensibile nell'individuazione della complessa sindrome di stress indotta negli organismi dall'esposizione ai contaminanti chimici, integrando le informazioni ottenute attraverso l'analisi ecotossicologica dei sedimenti al fine di raggiungere una valutazione del rischio ecotossicologico per gli organismi che vivono in dato ambiente.

- 5) In particolare i risultati dell'analisi dei biomarker suggeriscono una valida applicazione dell'analisi delle alterazioni morfometriche dei granulociti in emociti di *M. galloprovincialis* quale potenziale biomarker di effetto nei programmi di biomonitoraggio. L'incremento delle dimensioni dei lisosomi osservato contestualmente all'incremento del volume dei granulociti suggerisce un incremento dei processi degradativi e autofagici. Inoltre l'applicazione del test dei micronuclei nell'ambito della batteria ha confermato l'importanza dell'impiego nel monitoraggio di ambienti marino-costieri di biomarker di genotossicità, che consentano di predire l'impatto dei cancerogeni su diversi organismi attraverso l'indagine di eventi biologici precoci del processo di cancerogenesi. Il dosaggio dell'attività di anidrase carbonica ha indicato la sensibilità di tale enzima, particolarmente a livello della ghiandola digestiva, all'esposizione a contaminazione chimica. Tali risultati rappresentano il presupposto per considerare *l'attività di anidrase carbonica in ghiandola digestiva* un potenziale biomarker di contaminazione chimica da utilizzare in indagini ecotossicologiche soprattutto nell'ottica del multimarker approach. Il ruolo funzionale di anidrase carbonica *nell'induzione dell'attività del comparto lisosomiale* in ghiandola digestiva di mitilo emerso dallo studio apre nuove scenari nella comprensione delle risposte attivate a livello lisosomiale.
- 6) Ulteriori studi sono necessari per caratterizzare i nuovi biomarker sviluppati nel mitilo, quali variazioni dell'attività di anidrase carbonica e alterazioni morfometriche dei granulociti, in termini di variabilità naturale (ad esempio in relazione alla stagionalità, genere, età, ciclo vitale) e specificità chimica.
- 7) La batteria di bioassay *in vivo* e *in vitro* sui sedimenti fornisce uno screening della tossicità dei contaminanti legati ai sedimenti e dei potenziali effetti avversi del loro rilascio sugli organismi della colonna d'acqua. La misura in un approccio multimarker delle risposte fisiologiche cellulari e molecolari nell'organismo sentinella *M. galloprovincialis* fornisce un segnale precoce di esposizione a stress chimico e sull'entità di danno. L'utilizzo delle due metodologie d'indagine (bioassay e biomarker) in un approccio ecotossicologico integrato al biomonitoraggio di ambienti marino-costieri offre uno strumento sensibile e specifico per la valutazione dell'esposizione ad inquinanti e del danno potenziale esercitato dagli inquinanti

sugli organismi che vivono in un dato ambiente, permettendo interventi a breve termine e la messa a punto di adeguati programmi di gestione sostenibile dell'ambiente.

- 8) I bioassay sono strumenti capaci di rilevare segnali precoci di allarme, ma dotati di bassa rilevanza ecologica, mentre le risposte fisiologiche misurate nell'organismo sentinella nell'ambiente reale si configurano come strumenti con una maggiore rilevanza ecologica, ma con tempi di risposta lunghi. L'impiego di metodologie che contemplino più livelli di organizzazione biologica (endpoint biologici di sopravvivenza/ biomarker cellulari), diversi sistemi di saggio e condizioni sperimentali e diversi organismi test (permettendo di saggiare le diverse vie di esposizione) consente di indagare eventuali situazioni di stress legate a differenti scale temporali. L'implementazione di un approccio integrato pone la necessità di migliorare la rilevanza ecologica dei biosassay e la loro abilità di discriminare i contaminanti e di indagare il collegamento tra la risposta dei biomarker e gli effetti avversi a livello di organismo, inclusi processi quali crescita, riproduzione e mortalità.

6. BIBLIOGRAFIA

Adams S.M., 1990. Status and use of bioindicators for evaluating effects of chronic effects on fish. Am. Fisheries Soc. Symp., 8:1-8.

Alber B.E. and Ferry J.G., 1994. A carbonic anhydrase from archeon *Methanosarcina thermophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 6909-6913.

American Society for Testing and Materials (ASTM), 2003. Standard guide for designing biological tests with sediments. E 1367-03 ASTM, Philadelphia.

American Society for Testing Materials (ASTM) 1440, 1991 (reapproved 1998). Standard Guide for Acute Toxicity Test with the Rotifer *Brachionus*. pp.8

American Society for Testing Materials (ASTM), 1994. Standard guide for designing biological tests with sediments. ASTM E1525: 22 pp.

Ankley G.T., Shubauer-Berigan, M.K., Dierkers J.R., 1991. Predicting the toxicity of bulk sediments to aquatic organisms with aqueous test fraction: pore water vs. elutriate. *Environ Toxicol Chem.* 10: 1359-1366.

APAT Agenzia per la protezione dell'ambiente e per I servizi tecnici, 2005. Valutazione della genotossicità di inquinanti in ambienti acquatici: messa a punto di metodi per l'esecuzione del test del micronucleo in eritrociti di specie ittiche. Manuali e linee guida 32/2005.

Arslan O., 2001. Inhibition of bovine carbonic anhydrase by new sulfonamide compounds. *Biochemistry* 66: 982-3.

Auffret M., 1988. Bivalve hemocyte morphology. *Am Fish Soc Sp Publ* 18: 169-177.

Ausili A., Cappucci S., Gabellini M., Innocenti C., Maffucci M., Romano E., Rossi L., Taramelli A., 2012. New Approaches for Multi Source Data Sediment Characterisation, Thickness Assessment and Clean Up Strategies. *Chemical Engineering Transactions*, Vol.28

Ausili A., Gabellini M., Cammarata G., Fattorini D., Benedetti M., Pisanelli B., Gorbi S., Regoli F., 2008. Ecotoxicological and human health risk in a petrolchemical district of southern Italy. *Mar. Environ. Res.* 66: 215-217.

AZUR ENVIRONMENTAL 1998. Microtox ® Basic Test procedures, 12 pp.

AZUR ENVIRONMENTAL 1998b. Microtox ® Solid-Phase Test (SPT) Procedure, 20 pp.

Azzaro F., 1993. Concentrazioni di nutrient nella Baia di Augusta (Sicilia). In: Atti I Workshop “Risorsa mare: un progetto per il Mezzogiorno. Salvaguardia e valorizzazione delle acque costiere del Salento”, 8 luglio 1991. Lecce, Italy, pp.93-108.

Babín M.M., Tarazona J.V., 2005. *In vitro* toxicity of selected pesticides on RTG-2 and RTL-W1 fish cell lines. *Environ Pollut* 135: 267-274.

Bargagli R., Cruscianti M., Leonzio C., Bacci E., 1998. I bioindicatori. In: *ECotossicologia*, Vighi e Bacci editori, UTET. Torino, Italy pp.40-45.

Bargagli R., Cruscianti M., Leonzio C., Bacci E., 1998. I bioindicatori. In: *Ecotossicologia*, Vighi e Bacci editori, Trattato di Farmacologia e Terapia, UTET. Torino, Italy, pp.40-45.

Bayne B.L., Brown D.A., Burns K., Dixon D.R., Ivanovici A., Livingstone D.R., Lowe D. M., Moore M.N., Stebbing A.R.D., Widdows J., 1985. The effects of stress and pollution on marine animals. Prager Scientific, New York, pp. 24-51.

Bayne B.L., Widdows J., Thompson R.J., 1976. Marine mussels: their ecology and physiology. In *International Biological Program*, Vol. 10 (Bayne, B.L., ed.) pp. 81-125. Cambridge University Press, UK.

Bayne C.J., 1990. Phagocithosis and non-self recognition in invertebrates. *Bioscience*, 40:723-731.

Bayne, B.L., 1979. Assessing effects of marine pollution. *Nature*, 280. 14-16.

Bebiano M.J. and Serafim M.A., 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. *Science of total Environment*, Vol. 214, Issues 1-3, pp. 123-131.

Beckmann N., Morse M.P., Moore C.M., 1992. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *J. Invert. Pathol.*, 59:124-132.

Bierkens J., Klein G., Corbisier P., van De Heuvel R., Verschaeve L., Weltens R., Shoeteres G., 1998. Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*. Vol. 37: 2935-2947.

- Bocchetti R. and Regoli F., 2006.** Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65: 913-921.
- Bolognesi C. and Venier P., 2003.** Monitoraggio della genotossicità in matrici ambientali:acqua. In “mutagenesi ambientale” di Autori vari pp. 263-280, Zanichelli.
- Bolognesi C., Rabboni R., Malfatto C., Roggieri P., 1993.** Application of biological markers in aquatic organisms as indicators of marine pollution. In Proc. Of PRIMO 7, Abstracts, Mar. Environ. Res.39 (1-4) 345.
- Bolognesi C., Rabboni R., Roggieri P., 1996.** Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 113C, No 2, pp. 319-323.
- Bonsignore M., Salvagio Manta D., Olivieri E., Sprovieri M., Basilone G., Bonanno A., Falco F., Traina A., Mazzola S., 2013.** Mercury in fishes from Augusta Bay (southern Italy): Risk assessment and health implication. *Food and Chemical Toxicology* 56: 184-194.
- Böttcher K., Siebers D., Becker W., Petrausch G., 1991.** Physiological role of branchial carbonic anhydrase in the shore crab *Carcinus maenas*. *Mar Biol.* 110: 337-342.
- Brooks S.J., Mills C.L., 2003.** The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Comp. Biochem. Physiol.* 135A: 527-537.
- Brouwer H., Murphy T., McArdle L., 1990.** A sediment contact bioassay with *Photobacterium phosphoreum*. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1353-1358.
- Brunetti R., Majone F., Gola I., Beltrame C., 1988.** The micronucleus test: examples of applications to marine ecology. *Mar. Ecol. Prog.Ser.* 44: 65-68.
- Bubel A., Moore M.N., Lowe D., 1977.** Cellular responses to shell damage in *Mytilus edulis* L.J. *Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 30:1-27.
- Bulich A.A., 1979.** In *Aquatic Toxicology: Second conference*, ASTM STP 667, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp.338-347.
- Bulich A.A., Greene M.W., Underwood S.R., 1992.** Measurement of soil and sediment toxicity to bioluminescent bacteria when in direct contact for a fixed time period. *Water environment Federation 65th Annual Conference & Exposition*, New Orleans, Louisiana, USA, September 20-24, pp. 52.63-

Burgeot T., Woll S., Galgani F., 1996. Evaluation of the Micronucleus Test on *Mytilus galloprovincialis* for Monitoring Applications along French Coast. Marine Pollution Bulletin, vol.32 No 1, pp. 39-46.

Burgess R., Scott K.J., 1992. The significance of in-place contaminated marine sediments on the water column: processes and effects. In: Burton G.A. (Ed.). *Sediment Toxicity assessment*. Lewis Pub.: 129-165.

Butler G.C., 1978. Principles of Ecotoxicology. Scope Report 12, John Wiley and Sons. Chichester, New York, Brisbane, London. pp. 350.

Cáceres-Martínez J. and Figueras A., 1998. Long-term survey on wild and cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* LmK) reproductive cycles in the Ria de Vigo (NW Spain). Aquaculture, 162: 141-156.

Cajaraville M.P. and Pal S.G., 1995a. Morphofunctional study of the hemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. Cell. Struct. Funct., 20: 355-367.

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

Cajaraville M.P., Marigomez I. , Olabarrieta I., 1994. Phagocytosis and production of oxyradicals in molluscan blood cells or hemocytes. 36th Symposium Soc., Histochemical , Heidelberg.

Cajaraville M.P., Marigómez J.A., Angulo E., 1989. A stereological survey of lysosomal structure alterations in *Littorina littorea* exposed to 1-naphtol. Comp. Biochem. Physiol. C 93: 231-237.

Cajaraville M.P., Robledo Y., Etxeberria M., Marigómez I., 1995b. Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes. In: Cajaraville M.P. (Ed.) Cell Biology in Environmental Toxicology. University of Basque Country Press Service, Biblio: 29-55.

Calisi A., Lionetto M.G., Caricato R., Giordano M.E., Schettino T., 2008. Morphometric alterations in *Mytilus galloprovincialis* granulocytes: a new biomarker. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 27, No 6, pp 1435-1441.

- Canesi L., Betti M., Ciacci C., Lorusso L.C., Pruzzo C., Gallo G., 2006.** Cell signaling in the immune response of mussel hemocytes. *Invertebrate Survival Journal* 3: 1-10.
- Cappello T., Mauceri A., Corsaro C., Maisano M., Parrino V., Lo Paro G., Messina G., Fasulo S., 2013.** Impact of environmental pollution on caged mussels *Mytilus galloprovincialis* using NMR-based metabolomics. *Marine Pollution Bulletin* 77: 132-139.
- Carballal M.J., Lopez C., Azevedo C., Villalba A., 1997.** Enzymes involved in defence functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* 70 (2): 96-105.
- Caricato R., Lionetto M.G., Dondero F., Viarengo A., Schettino T., 2010.** Carbonic anhydrase activity in *Mytilus galloprovincialis* digestive gland: sensitivity to heavy metal exposure. *Comp. Biochem. Physiol.*, 152 C: 241-247.
- Casarett and Doull's, 2007.** Toxicology. The Basic Science of Poisons. Sixth Edition Curtis D. Klaassen (ed.), McGraw-Hill.
- Chapman P.M., Wang F., 2001.** Assessing sediment contamination in estuaries. *Environ Toxicol Chem.* 20:3-22
- Cheng T.C., 1975.** Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *An NY Acad.Sci.* 266: 343-379.
- Cheng T.C., 1981.** Bivalves. In: *Invertebrate blood cells* (Ratcliffe N.A., Rowley A.F., eds) Acad. Press, London pp 233-300.
- Cheng T.C., 1984.** A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences. In: *comparative phatobiology, Vol 6 Invertebrate blood cells and serum factors* (Cheng T.C., ed.). Plenum, New York, pp 111-146.
- Cheung Y.H, Neller A., Chu K.H., Tam N.F.Y., Wong C.K., Wong Y.S., Wong M.H., 1997.** Assessment of sediment toxicity using different trophic organism *Arch. Environ toxicol chem.* 32, 260-67.
- Christianson D.W. and Cox J.D., 1999.** Catalysis by heavy activated hydroxide in zinc metalloenzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 68:33-57.
- Da Ros L., Nesto N., 2005.** Cellular alterations in *Mytilus galloprovincialis* (LMK) and *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) as biomarkers of environmental stress: Field studies in the Lagoon of Venice (Italy), *Environ Int.*31:1078-1088.

Davenport J., Smith R.J.J.W., Packer M., 2000. Mussels *Mytilus edulis*: significant consumers and destroyers of mesozooplankton. *Mar. Ecol.Prog. Ser.* 198: 131-137.

Davoren M.; Ni Shuilleabhain S., ‘Halloran J., Hartl M., Sheenan D.O., ‘Brien N.M., 2005. A test battery approach for the ecotoxicological evaluation of estuarine sediments. *Ecotoxicology*, 14, 741-755.

Decreto Legislativo 11 maggio 1999, n. 152. Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/ CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole (a seguito delle disposizioni correttive ed integrative di cui al decreto legislativo 18 agosto 2000, n.258), G.U. della Repubblica Italiana n. 246 – Supplemento Ordinario del 20 ottobre 2000.

Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale. Pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 88 del 14 aprile 2006 - Supplemento Ordinario n. 96.

Decreto Ministeriale 10 gennaio 2000. Approvazione perimetro provvisorio del sito di bonifica di interesse nazionale di Priolo. GU 23 febbraio 2000

Decreto Ministeriale 10 marzo 2006. Nuova perimetrazione del sito di bonifica di interesse nazionale di Priolo. GU n.113 del 17 maggio 2006

Decreto Ministeriale 18 settembre 2001 n.468. Regolamento recante “Programma nazionale di bonifica e ripristino dei siti inquinati”.

Decreto Ministeriale 25 ottobre 1999, n. 471. Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'articolo 17 del decreto legislativo 5 febbraio 1997, n.22 e successive modificazioni e integrazioni. GU n. 293 del 15.12.1999. Suppl. Ordin. N.218.

Depledge M.H., 1989. The rational basis for detection of the early effects of marine pollutions using physiological indicators. *AMBIO* 18: 301-302.

Depledge M.H., 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: *Non destructive biomarkers in vertebrates*. Fossi, M.C., Leonzio C.(eds), Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokio, pp. 271-296.

Di Leonardo R., Bellanca A., Angelone M., Leonardi M., Neri R., 2008. Impact of human activities on the central Mediterranean offshore: Evidence from Hg distribution in box-core sediments from the Ionian Sea. *Applied Geochemistry* 23: 3756-3766.

Di Leonardo R., Bellanca A., Capotondi L., Cindy A., Neri R., 2007. Possible impacts of Hg and PAH contamination on benthic foraminiferal assemblages: An example from the Sicilian coast, central Mediterranean. *Science of the Total Environment* 388: 168-183.

Directive 2000/60/EC of the European Parliament and the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy (Water Framework Directive) O J L327, 22 December 2000, p.0001-0073.

Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 establishing a framework for Community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive) O J L 164, 25 June 2008, p.19-40.

Doe K., Scroggins R., Mcleay D., Wohlgeschaffen G., 2005. Solid-phase test for sediment toxicity using the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. In. Blaise C., Féraud J.F., (Eds). *Small-scale Freshwater toxicity investigations*, vol.1. Springer, Dordrecht, pp. 107-136.

Domouthsidou G.P., Dimitriadis V.K., 2001. Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussel, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environ. Pollut.* 155:123-137.

Dutta S. and Goodsell D.S., 2004. Carbonic Anhydrase. RCSB Protein Data Bank <http://www.rcsb.org>

Ellmann G.L., 1958. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem Biophys* 74: 443-450.

ENVIRON International Team, 2008. Appendix A Sediment Investigation Activities Performed by ENVIRON Summer and Fall 2008 Augusta Bay, Sicily, Italy.

EPA 1983. Water Quality Criteria for the protection of aquatic life and its use. Cincinnati. OH. USA.

EPA, 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms EPA 600/ 4-85-013 (3ed edition).

- EPA, 2001.** EPA-283-B-01-002. Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual. October 2001.
- Eriksson M., Karlsson J., Ramazanov Z., Gardestrom P., Samuelsson G., 1996.** Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 12031-12034.
- Etxeberria M., Cajaraville M.P., Marigómez I., 1995.** Changes in digestive cell lysosomal structure in mussels as biomarkers of environmental stress in the Urdabai Estuary (Biscay Coast, Iberian Peninsula) Marine Pollution Bulletin Vol.30, No 9 pp. 599-603.
- Etxeberria M., Sastre I., Cajaraville M.P., Marigómez I., 1994.** Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd and Zn) in mussels collected from a zinc-polluted site. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 27: 338-345.
- Fasulo S., Iacono F., Cappello T., Corsaro C., Maisano M., D'Agata A., Giannetto A., De Domenico E., Parrino V., Lo Paro G., Mauceri A., 2012.** Metabolomic investigation of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) caged in aquatic environments. Ecotoxicol. Environ. Saf. 84: 139-146.
- Fasulo S., Mauceri A., Giannetto A., Maisano M., Bianchi N., Parrino V., 2008.** Expression of metallothionein mRNAs by in situ hybridation in the gills of *Mytilus galloprovincialis*, from natural polluted environments. Aquat. Toxicol. 88: 62-68.
- Fengqi L., 1996.** Production and application of rotifers in aquaculture. *Aquaculture Magazine*, 22 (3): 16-22.
- Fossi M.C., 1991.** L'utilizzo di "Biomarkers" nella valutazione del rischio ambientale: metodologie ed applicazione. Inquinamento, 12: 44-50
- Fossi M.C., 2000.** Biomarkers: strumenti diagnostici e prognostici di salute ambientale. Rosini Editrice, Firenze, Italia, pp.89.
- Fossi M.C., Leonzio C., Focardi S., Peakall D.B., 1990.** Avian mixed function oxidase induction as a monitoring device: the influence of normal physiological function. In: Biomarkers of Environmental Contamination. Mc Carthy F., Shugart L.R. (eds.). Lewis Publishers U.S.A., 143-150.
- Francese M., Traldi D., 2001.** Impiego di cisti di *Brachionus plicatilis* per saggi ecotossicologici in ambiente marino *Biol Mar Medit* 8(2): 103-109.

Francesco M., Traldi D., 2003. First ecological survey in the Miramare Marine Reserve (Gulf of Trieste, Italy) *Bollettino di Geofisica Teorica e Applicata* 44(1): 33-42.

Franzellitti S. and Fabbri E., 2013. Cyclic-AMP Mediated Regulation of ABCB mRNA Expression in Mussel Haemocytes. "PLOS ONE" 8,pp. e61634-e6163

Franzellitti S., Viarengo A., Dinelli E., Fabbri E., 2012. Molecular and cellular effects induced by hexavalent chromium in Mediterranean mussels. *Aquatic toxicology* 124-125:125-132.

Galloway T.S., Depledge M.H., 2001. Immunotoxicity in invertebrates: Measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 10:5-23.

George S.G. and Per-Erik Olsson, 1994. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution in Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries. Boca Raton, FL 33431, Kramer CRC Press Inc., pp. 151-171.

George S.G. and Per-Erik Olsson, 1994. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution in Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries. Boca Raton, FL 33431, Kramer CRC Press Inc.

Gestal C., Roch P., Reanult T., Pallavicini A., Paillard C., Novoa B., Radouane C., Venier P., Figueras A., 2008. Study of disease and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics. *Reviews in Fisheries Science*, Vol. 16 (Supplement 1), Taylor & Francis.

Goldberg E.D., Bowen V.T., Farrington J.W., Harevey G., Martin J.H., Parker P.L., Risebrough R.W., Robeston W., Scneider W., Gamble E., 1978. The Mussel Watch. *Environ. Conserv.* 5, pp. 101-125.

Gomez-Mendikute A., Elizondo M., Venier P., Cajaraville M.P., 2005. Characterization of mussel gill cells *in vivo* e *in vitro*. *Cell Tissue res.* 321: 131-140.

Gomez-Mendikute A., Etxeberria A., Olabarrieta I., Cajaraville M.P., 2002. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Biomarkers*, 7 (3): 242-256.

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 pp. 34-49

Griffiths C.L., Hockey PAR, van Erkom Schurink C., Roux P.J.L., 1992. Marine invasive aliens on South African shores: implications for community structure and trophic functioning. *S.Afr.J. Mar. Sci.* 12: 713-722.

Henrouth L, 1983. Marine pelagic rotifers and tintinnids: important trophics links in the spring plankton community of the Gullmar Fjord , Sweden *J Plankton Res*, 5:835-846.

Henry M., Auffret M, Boucaud-Camou E., 1990. Aspects ultrastruturaux et fonctionnels des hémocytes de quatre familles de bivalves (Ostreidae, Veneridae, Mytilidae, Pectinidae). *Haliotis* 10: 195-196.

Henry M., Boucaud-Camou E., Lefort Y., 1991. Functional micro-anatomy of the digestive gland of the scallop *Pecten Maximus*. *L. Aquat. Living. Resour.* 4: 191-202.

Henry R.P., 1987. Invertebrate red blood cell carbonic anhydrase. *J.Exp. Zool.* 242 (1): 113-116.

Henry R.P., 1988. Subcellular distribution of carbonic anhydrase activity in the gills of the blue crabs, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool*, 245: 1-8.

Hewett-Emmett D. and Tashian R.E., 1991. Structure and evolutionary origins of the carbonic anhydrase multigene family. In: *The Carbonic Anhydrase, Cellular Physiology and Molecular Genetics*. New York: Plenum. pp. 15-32.

Hiltonen T., Karrison J., Palmqvist K., Clerke A.K., Samuelsson G., 1995. *Planta*, 195: 345-351.

Hockey PAR, van Erkom Schurink C., 1992. The invasive biology of the mussel *Mytilus galloprovincialis* on the southern African Coast. *Trans. R. Soc. Afr.* 48: 123-139.

Huggett R.J., Kimerle R.A., Mehrle P.M., Bergman H.L., 1992. Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. *Lewis Publishers* pp. 247.

ISPRA, 2011. Batterie di saggi eco tossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre. *Manuali e Linee Guida* 67/2011.

Istituto Centrale per la Ricerca Scientifica e tecnologica Applicata al Mare (ICRAM), 2005. Valutazione preliminare dei dati della caratterizzazione ambientale della rada di augusta – aree prioritarie ai fini della messa in sicurezza di emergenza BOI-PR-SI-GP-RADA DI AUGUSTA-01.02.

Istituto Centrale per la Ricerca Scientifica e tecnologica Applicata al Mare (ICRAM), 2008.

Istituto Centrale per la Ricerca Scientifica e Tecnologica applicata al mare, Progetto preliminare di bonifica dei fondali della Rada di Augusta nel sito di interesse nazionale di Priolo-Elaborazione definitiva, Bol-Pr-SI-PR-Rada di Augusta-03.22. pp.182.

Ivanov B.N., Ignatova L.K., Romanova A.K., 2007. Diversity in Forms and Functions of Carbonic Anhydrase in Terrestrial Higher Plants. Russian Journal of Plant Physiology, Vol. 54, No. 2, pp.143-162.

Kannan K.K., Petef M., Fridborg K., Cid-Dresoner and Lovgren S., 1977. Structure and function of carbonic anhydrase. FEBS Letters, 73: 115-119.

Kendall R.J. and Akerman J., 1992. Terrestrial wildlife exposed to agrochemicals: An ecological risk assessment perspective. Environ Toxicol Chem 11 (12): 1727-1749.

Kimber M.S. and Pai E.F., 2000. The active site architecture of *Pisum sativum* beta carbonic anhydrase is a mirror image of that of alpha carbonic anhydrases. EMBO J., 19: 1407-1418.

Köhler A., 1991. Lysosomal perturbations in fish liver as indicator for toxic effects of environmental pollution Comp. Biochem. Physiol. Vol. 100 C:123-127.

Laane R. W. P.M., Slijkerman D., Vethaak A.D., Schobben J.H.M., 2012. Assessment of the environmental status of the coastal and marine aquatic environment in Europe: a plea for adaptive management. Estuar. Coast Shelf Sci. 96: 31-38.

Labrot F., Ribera D., Saint Denis M., Narbonne J.F., 1996. *In vitro* e *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. Vol. 1, pp.21-28.

Lam P.K.S. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes Mar. Poll. Bull. 46:182-186.

Langstone W.J., Bebianno M.J., Burt G., 1998. Metabolic pathways in marine invertebrates. In: Langstone W.J., Bebianno M.J. (eds.) Metal metabolism in aquatic environments., Chapman and Hall, London, pp. 219-284.

Legge 9 dicembre 1998, n. 426. Nuovi interventi in campo ambientale. GU n. 291 del 14-12-1998.

Lemoine S., Bigot Y., Sellos D., Cosson R.P., Laulier M., 2000. Metallothionein Isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia): Complementary DNA Characterization and Quantification of Expression in Different Organs after Exposure to Cadmium, Zinc and Copper. *Marine Biotechnology*, Vol. 2, pp. 195-203.

Liljas A. and Laurberg M.A., 2000. A wheel invented three times. The molecular structure of the three carbonic anhydrases. *EMBO J.* 1: 16-17.

Lindskog S., 1963. Effects of pH and inhibitors on some properties related to metal binding in bovine carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.* 238: 945-951.

Lindskog S., 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol. Ther.* 74: 1-20.

Lionetto M.G., Caricato R., Erroi E., Giordano M.E., Schettino T., 2006. Potential application of carbonic anhydrase activity in bioassay and biomarker studies. *Chemistry and ecology*, 22 (Sup1), S119-S125.

Lionetto M.G., Caricato R., Giordano M.E., Erroi E., Schettino T., 2012. Carbonic anhydrase as pollution biomarker: an ancient enzyme with a new use. *Int.J. Environ. Res. Public Health*, 9: 3965-3977.

Lionetto M.G., Caricato R., Giordano M.E., Schettino T., 2004. Biomarker application for the study of chemical contamination risk on marine organisms in the Taranto marine coastal area. *Chem. Ecol.*, 20: S333-343.

Lionetto M.G., Giordano M.E., Vilella S., Schettino T., 2000. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. *Aquatic Toxicology* 48: 561-571.

Lionetto M.G., Maffia M., Cappello M.S., Giordano M.E., Storelli C., Schettino T., 1998. Effect of cadmium₂ on carbonic anhydrase and Na⁺-K⁺-ATPase in eel, *Anguilla Anguilla*, intestine and gills. *Comp. Biochem. Phys.*, A 120: 89-91.

Lock A., Metin G., Acarli S., Gouletquer P., 2010. Harmful Algal Blooms (HABs) and Black Mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) culture in Izmir Bay (Iskele-Urla)- Turkey: Preliminary result on the annual feeding cycle using a quantitative approach. *Turkish Journal of fisheries and aquatic sciences* 10: 527-536.

Lowe D.M., 1988. Alterations in the cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 46: 91- 100.

Lowe D.M., Moore M.N., Clarke K.R., 1981. Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquat. Toxicol.* 1: 213-226.

Lowe S., Browne M., Boudjelas S., Poorter M., 2000. 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the global invasive species database. Invasive Species Specialist Group (ISSG) of the Species Survival Commission (SCC) of the World Conservation Union (IUCN), Holland Printing, Auckland pp.12.

Mackay E.A., Overnell J., Dunbar B., Davidson I., Hunziker P.E., Kägi J.K.R., Fortegill J.E., 1993. Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*. *Eur J Biochem* 218:183-194.

Maffiotti A., and Bona F., 1997. Introduzione all'ecotossicologia. In: F.Bona, Maffiotti A., Volterra L., Analisi e recupero dei sedimenti marini. Quaderni di tecniche di protezione ambientale. Pitagora Editrice Bologna. Pp. 139.

Maren T.H., 1987. Carbonic anhydrase: General perspective and advances in glaucoma research. In : Drug Development Research vol. 10, Issue 4, pp. 255-276.

Marigómez I., Izagirre U., Lekube X., 2005a. Lysosomal enlargement in digestive cells of mussels exposed to cadmium, benzo[a]pyrene and their combination. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology & Pharmacology*, Vol. 141, Issue 2, pp. 188-193.

Marigómez I. and BayBay-Villacorta L., 2003. Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. *Aquatic Toxicology* 64: 235-257.

Marigómez I., Lekube X., Cajaraville M.P., Domouthsidou H., Dimitriadis V., 2005. Comparison of cytochemical procedures to estimate lysosomal biomarker in mussel digestive cells. *Aquatic Toxicology* 75: 86-95.

Marigómez I., Orbea A., Olabarrieta I., Exteberria M., Cajaraville M.P., 1996. Structural changes in the digestive lysosomal system of sentinel mussels as biomarkers of environmental stress in mussel watch programmes. *Comp.Biochem. Physiol.*, 113C: 291-297.

Martini et al., 2010. "Bioaccumulo di microinquinanti nella rete trofica marina" *I quaderni di Arpa*, Arpa Emilia-Romagna.

Mc Mahon B.R., Burnett L.E., Fur P.L., 1984. Carbonic dioxide excretion and carbonic anhydrase function in the red rock crab *Cancer productus*. *J.Comp.Physiol. B.* 154: 371-383.

McCarthy F., Shugart L.R., 1990. Biomarkers of environmental contamination. Lewis Pub., Chelsea, USA.

McCarthy J.F., Halbrook S., Shugart L.R., 1990. Conceptual strategy for design, implementation and validation of a biomarker- based biomonitoring capability, Draft of Oak Ridge National Lab.

McCarthy J.F., Halbrook S., Shugart L.R., 1990. Conceptual strategy for design, implementation and validation of a biomarker-based biomonitoring capability. Draft of Oak Ridge National Lab.

McCormick-Ray, M.G., 1987. Hemocytes of *Mytilus edulis* affected by Prudhoe Bay crude oil emulsion, Marine Environmental Research, Vol. 22, Issue 2, pp.107-122.

Meldrum N.U. and Roughton F.J., 1933. J.Physiol. (Lond.) 80:113-142.

Mitsubishi S., Mizushima T., Yamashita E., Yamamoto M., Kumasaka T., Moriyama H., Ueki T., Miyachi S., Tsukihara T., 2000. J. Biol. Chem. 275: 5521-5526.

Mix M.C., 1976. A general model for leucocyte cell renewal in bivalve mollusc. U.S.Natl. Mar. Fish. Serv. Rev. 38:37-41.

Moore M.N. and Lowe D.M., 1977. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their response to experimentally injected carbon particles. J. Invert.Pathol. 29:18-30.

Moore M.N., 1985. Cellular responses to pollutants. Mar. Poll. Bull., 216: 134-139.

Moore M.N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics, Mar. Ecol. Prog. Ser., 46: 81-89.

Moore M.N., 1990. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochem J.*, 22 (4):187-191.

Moore M.N., Koheler A., Lowe D., Viarengo A., 2008. Lysosomes and autophagy in aquatic animals. *Methods Enzymol* 451: 581-620.

Moore M.N., Wedderburn R.J., Lowe D.M., Depledge M.H., 1996. Lysosomal reaction to xenobiotics in mussel hemocytes using BODIPY-FL-verapamil, Marine Environmental research, Vol. 42, Issues 1-4, June-October 1996, pp. 99-105.

Moore MN, Depledge M.H., Readman J.W., Paul Leonard D.R., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat Res* 552 (1-2): 247-268.

Moore N.M., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar Ecol Prog Ser* ., 46:81-89.

Nielsen S.A. and Frieden E., 1972. Carbonic anhydrase activity in molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 41B, pp. 461-468. Pergamon Press. Printed in Great Britain.

Nigro M., Falleni A., Barga I.D., Scarcelli V., Lucchesi P., Regoli F., Frenzilli G., 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. *Aquat. Toxicol.* 77:339-347.

Nimis P., 2001. Il biomonitoraggio della “qualità dell’aria” tramite licheni. Monitoraggio ambientale: metodologie e applicazioni. Atti del XXXVIII corso; p.93.

NRC, 1989. Biologic Markers in Reproductive toxicology, National Academy Press, Washington D.C.

Olafson R.W., Kearns A., Sim R.G., 1979. Heavy metal induction of metallothionein synthesis in the hepatopancreas of the crab *Scylla serrata*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, Vol. 62, pp. 417-424.

Onorati F., Pellegrini D., Bigongiari D., 2001. Applicazione di saggi biologici su sedimenti marini. In: Metodologie analitiche di riferimento. Programma di monitoraggio per il controllo dell’ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003). Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio. Scheda II.

Onorati F., Volpi Ghiradini A., 2001. Informazioni fornite dalle diverse matrici da testare con isa ggi biologici: applicabilità di *Vibrio fischeri*. *Biol Mar Medit*;8 (2):31-40.

Osowski A., Putzenlechner M., Böttcher K., Graszynski K., 1995. The carbonic anhydrase of the chinese crab *Eriocheir sinensis*: effect of adaption from tap to salt water. *Helgolönder Meeresunter-suchung*; 49: 727-735.

Owen G., 1972. Lysosomes, peroxisomes and bivalves. *Sci. Progr. Oxford* 60: 299-318.

- Pandard P., Devillers J., Charissou A.M., Poulsen V., Jourdain M.J., Férard J.F., Grand C., Bispo A., 2006.** Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci. Total. Environ.*, 15, 363: 114-125.
- Papamichael E.M., Economou E. D., Vaimakis T.C., 2002.** Dissolution of the Carbonate Minerals Of Phosphate Ores: Catalysis by Carnonic Anhydrase II, From Bovine Erythrocytes, In Acid Solutions *Journal of Colloid and Interface Science* 251: 143-150.
- Pastorok R., Becker D.S.. 1990.** Comparative sensitivity of sediment toxicity bioassays at three superfund sites. In W. G. Landis e W.H. van der Schalie (Eds.) *Aquatic Toxicology and Risk Assessment* 13 (13 pp.) ASTM 123-39, Philadelphia, USA.
- Persoone G., Van De Vel A., Van Steertegem M., De Nayer B., 1989.** Predictive value of laboratory test with aquatic invertebrates: influence of experimental conditions. *Aquatic Toxicology*, 14: 149-167.
- Piccinni E., Staudenmann, W. Albergoni V., De Gabrieli R., James P., 1994.** Purification and primary structure of metallothioneins induced by cadmium in the protests *Tetrahymena pigmentosa* and *Tetrahymena pyriformis*. *Eur. J.Biochem.* 15, 853-859.
- Pipe R.K., 1992.** Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Develop. Comp. Immunol.*, 16: 111-122.
- Rasmussen L.P.D., Hage E., Karlog O., 1985.** An electron microscope study of the circulating leucocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Journ Invert Pathol*, 45: 158-167.
- Ratcliffe N.A., Rowley A.F., Fitzgerald S.W., Rhodes C.P., 1985.** Invertebrate immunity-basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.* 97: 183-350.
- Regoli F., 1992.** Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 84:63-69.
- Regoli F., 2001.** Monitoraggio della contaminazione chimica: ecotossicologia e biomarkers. In Dondero R., *Recupero Ambientale*, UTET, Libreria s.r.l., Torino, Italy, pp. 189-222.
- Ringwood A.H., De Lorenzo M.E., Ross P.E., Holland A.F., 1997.** Interpretation of Microtox ® solid-phase toxicity tests: the effects of sediment composition. *Environ Toxicol Chem* 16: 1135-1140.
- Roberts S.B., Lane T.W., Morel F.M.M., 1997.** *J Phycol.*, 33: 845-850.

Roesijadi G., 1992. Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic toxicology* 22:81-114.

Sancho E., Fernandez-Vega C., Ferrando M.D., Andreu-Moliner E., 2003. Eel ATPase activity as biomarker of thiobencarb exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 434-441.

Scarpato R., Migliore L., Alfinito-Cognetti G., Brale R., 1990. Induction of micronucleus in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Mar. Pollut. Bull.*, 21: 74-80.

Shaw I.C., Chadwick J., 1995. Ecotoxicity testing. *Toxicology & Ecotoxicology New*; 2(3):80-85.

Sheehan D. and Power A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotics and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol.* 123: 193-199.

Smith K.S., Jakubzick C., Whittam T.S., Ferry J.G., 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96: 15184-15189.

Snell T. W. and Carrillo K., 1984. Body size variation among strains of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 37:359-367.

Soto M., Ireland M.P., Marigómez I., 2000. Changes in mussel biometry on exposure to metals: implications in estimation of metal bioavailability in “Mussel –Watch” programmes. *The Science of Total Environment*, Vol. 247: 175-187.

Sprovieri M., Olivieri E., Di Leonardo R., Romano E., Ausili A., Gabellini M., Barra M., Tranchida G., Bellanca A., Neri R., Budillon F., Saggiono R., Mazzola S., Saggiorno V., 2011. The key role played by the Augusta basin (southern Italy) in the mercury contamination of the Mediterranean sea. *J. Environ. Monit.* 13, 1753.

Stronkhorst J., Ciarelli S., Schipper C.A., Postma J.F., Dubbeldam M., Vangheluwe M., Brils J.M., Hooftman R., 2004. Inter-laboratory comparison of five marine bioassays for evaluating the toxicity of dredged material. *Aquat. Ecosyst., Health Manage.* 7, 147-159.

Supuran C. T., 2010. Carbonic anhydrase inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 20, Issue 12: 3467-3474.

Takahashi K., Akaike T., Sato K., Mori K., Maeda H., 1993. Superoxide anion generation by Pacific oyster (*Cassostrea gigas*) hemocytes: identification by electron spin resonance spin trapping and chemiluminescence analysis. *Comp. Biochem. Physiol.* 105b: 35-41.

Tomasello B., Copat C., Pulvirenti V., Ferrito V., Ferrante M., Renis M., Sciacca S., Tigano C., 2012. Biochemical and bioaccumulation approaches for investigation marine pollution using Mediterranean rainbow wrasse, *Coris julis* (Linnaeus 1798). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 86: 168-175.

Tripp B.C., Smith K. and Ferry J.G., 2001. Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme *J. Biol. Chem.*, 276: 48615-48618.

Tung, K.K., Scheibner G., Miller T., Bulich A.A., 1990. A new method for testing soil and sediment samples. SETAC Conference, Novembre 1990: 1-8.

United Nations Environment Programme Mediterranean Action Plan, 1999. Manual on the biomarkers recommended for the MED POL Biomonitoring Programme. UNEP, Athens, pp. 1-34.

USACE, 1991. Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal. Testing Manual USEPA-503-8-90/002: 219 pp.

Venier P., Maron S., Canova S., 1997. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. *Mutation Research* 390: 33-44.

Viarengo 1981. Accumulation and detoxification of copper by mussels *M. galloprovincialis* Lam: a study of subcellular distribution in the digestive gland cells.

Viarengo A. and Canesi L., 1991. Mussel as biological indicators of pollution, aquaculture, 94: 225-243.

Viarengo A. and Nott J., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. Toxicol.* 104: 355-372.

Viarengo A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.*1, 295-317.

Viarengo A., 1994. Heavy metal cytotoxicity in marine organisms: effect of Ca^{2+} homeostasis and possible alteration of signal transduction pathways. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 20: 85-110.

- Viarengo A., Blasco J., Burlando B., Ponzano E., Marchi B., Trielli F., 1998.** Metallothionein and oxidative stress in marine organisms. *Marine Environmental Research* 46 (1): 606-607.
- Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C., Fabbri E., Koehler A., 2007.** The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146 (3): 281-300. Review.
- Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbri R., 1997.** A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar Environ Res* 44: 69-84.
- Vighi M. and Bacci E., 1998.** Ecotossicologia. Trattato di farmacologia e terapia. UTET pp.237.
- Vismara R. and Zavatti A., 1996.** Indicatori e scale di qualità. Pitagora Editrice Bologna pp. 378.
- Volpi Ghiradini A., Girardini M., Marchetto D., Pantani C., 2009.** Microtox solid phase test: effect of diluents used in toxicity test. *Ecotoxicol. Environm. Saf.* 72, 851-861.
- Wang X.H., Pinardi N., 2002.** Modeling the dynamics of sediment transport and resuspension in northern Adriatic Sea. *Journal of geophysical research*, vol. 107, Issue C12, pp. 18_1-18_23.
- Wells P.G. 1999.** Biomonitoring the health of coastal marine ecosystems: the role of challenges of microscale toxicity tests. *Mar. Poll.Bull.* 39:39-47.
- Wells P.G., Lee K., Blaise C., 1998.** Microscale testing in aquatic toxicology: advances, techniques and practice. CRC Press LLC.
- Widdows J., Moore S.L., Clarke K.R., Douking P., 1983.** Uptake, tissue distribution and elimination of [$1-^{14}\text{C}$]naphtalenein in mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 76:109-114.
- Wong W.H., Levinton J.S., Twining B.S., Fisher N., 2003.** Assimilation of micro- and mesozooplankton by zebra mussels: a demonstration of the food web link between zooplankton and benthic suspension feeders. *Limnol Oceanogr* 43: 308-312.
- Zhang B.Y., Yang F., Wang G.C., Peng G., 2010.** Cloning and quantitative analysis of the carbonic anhydrase gene from *Porphyra yezoensis*. *Journal Of Phycology*, Vol. 46, Issue 2 (April 2010), pp. 290-296.

