

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

Corso di Laurea Magistrale in BIOLOGIA MARINA

**Alterazione di risposte fisiologiche in
invertebrati marini esposti nella Baia di
Cadice (Spagna) come indici della qualità
dell'ambiente**

Relatore

Prof. Elena Fabbri

Presentata da

Mattia Mattioli

Correlatore

Prof. Laura Martin Diaz

III sessione

Anno Accademico 2010/2011

Di miei genitori

...” I muri esistono per una ragione.

Non certo per allontanarci,

ma per darci la possibilità

di dimostrare

quanto davvero desideriamo qualcosa” ...

Indice

	Pag. No
Abstract	5
1.- Introduzione	6
1.1.- Fish farm	8
1.2.- Sedimenti	10
1.3.- Ecotossicologia e biomarker	13
1.3.1.- Vie di uptake dell'agente tossico	19
1.3.2.- Processi di biotrasformazione e detossificazione	20
1.4.- La specie	24
1.4.1.- Struttura	26
1.4.2.- Evoluzione delle branchie	26
1.4.3.- Nutrizione	27
1.4.4.- Infossamento	29
1.4.5.- Fusione del mantello	29
1.4.6.- Sifoni	30
1.4.7.- Riproduzione	30
1.4.8.- Sviluppo	31
1.5.- Area di studio	32
1.6.- Biomarker	36
1.6.1.- Monoossigenasi a funzione mista (MFO) e attività enzimatica della etossiresorufina-O-deetilasi (EROD)	36
1.6.2- Dibenzilfluoresceina	38
1.6.3- Glutazione S-transferasi (GST)	38
1.6.4- Glutazione per ossidasi (GPX)	39
1.6.5- Glutazione reduttasi (GR)	39
1.6.6- Perossidazione lipidica (LPO)	40
1.6.7- Danno al DNA	40
1.7- Acquacoltura e GIS	41
1.8- Scopi della ricerca	43
2.- Materiali e metodi	44
2.1- Il campionamento	44
2.1.1- Punti di campionamento	44
2.1.2- Il campionamento degli organismi	46
2.1.3- Il campionamento delle acqua superficiali	47
2.1.4- Il campionamento delle acqua interstiziali	47
2.1.5- Preparazione degli organismi per le analisi	48
2.1.6- preparazione omogenato	48
2.2- Analisi Biomarker	50
2.2.1- Determinazione delle proteine totali (PT)	50
2.2.2- Attività dell'etossiresorufina-O-deetilasi (EROD)	50
2.2.3- Attività della dibenzilfluoresceina (DBF)	51
2.2.4- Attività della glutazione S-transferasi (GST)	51
2.2.5- Attività della glutazione per ossidasi (GPX)	52
2.2.6- Attività della glutazione reduttasi (GR)	52
2.2.7- Perossidazione lipidica (LPO)	52
2.2.8- Danno al DNA	53
2.3- Analisi statistica	54
2.4- creazione del GIS	55
2.4.1- il GPS	55
2.2.2- Acquisizione immagine	56
2.2.3- Georeferenziazione immagine	59

3.-Risultati	
3.1- Indice gonadosomatico ed epatosomatico	63
3.2- Risultati biomarker	63
3.2.1- Attività dell'etossiresorufina-O-deetilasi (EROD)	65
3.2.2- Attività della dibenzilfluoresceina (DBF)	65
3.2.3- Attività della glutatione S-transferasi (GST)	66
3.2.4- Attività della glutatione perossidasi (GPX)	67
3.2.5- Attività della glutatione reduttasi (GR)	68
3.2.6- Perossidazione lipidica (LPO)	69
3.2.7- Danno al DNA	70
3.3- Parametri abiotici	71
4.- Discussione	73
4.1- Parametri abiotici	84
4.2- Parametri biotici	84
4.2.1- Indice gonadosomatico ed epatosomatico	86
4.2.2- Biomarker	87
5.- Conclusioni	88
6.- Ringraziamenti	95
7.- Bibliografia	97
	99

Abstract

La forte crescita nella piscicoltura ha portato ad una significativa pressione ambientale di origine antropica nei sistemi costieri. Il bivalve locale *Scrobicularia plana* è stato usato come bioindicatore per valutare la qualità ambientale di un ecosistema affetto da scarichi di acque residuali di una piscifattoria nel braccio di mare Rio San Pedro (Spagna sud-occidentale). I bivalvi sono stati raccolti nei sedimenti intertidali nell'ottobre del 2010 da cinque siti del braccio di mare, seguendo un gradiente di inquinamento decrescente dall'effluente al sito di controllo. Per valutare l'esposizione e l'effetto di contaminanti legati alle acque residuali delle piscifattorie è stata selezionata una batteria di biomarker. Sono state misurate nei tessuti delle ghiandole digestive dei bivalvi: l'attività di enzimi del sistema di detossificazione della Fase I (etossiresorufina-O-deetilasi, EROD e dibenzilfluoresceina, DBF) l'attività di un enzima del sistema di detossificazione di Fase II (glutazione S-transferasi, GST), l'attività di enzimi antiossidanti (glutazione perossidasi, GPX e glutazione reduttasi, GR) e parametri di stress ossidativo (perossidazione lipidica, LPO, e danno al DNA).

In parallelo sono state misurate in situ, nelle aree di studio, temperatura, pH, salinità e ossigeno disciolto nelle acque superficiali; nelle acque interstiziali sono stati misurati gli stessi parametri con l'aggiunta del potenziale redox. Sono state trovate differenze significative ($p < 0,05$) tra siti di impatto e sito di controllo per quanto riguarda l'attività di EROD e GR, LPO e danno al DNA; è stato osservato un chiaro gradiente di stress riconducibile alla contaminazione, con alte attività di questi biomarker nell'area di scarico delle acque residuali della piscicoltura e livelli più bassi nel sito di controllo. È stata trovata inoltre una correlazione negativa significativa ($p < 0,01$) tra la distanza alla fonte di inquinamento e l'induzione dei biomarker. Sono state analizzate le componenti abiotiche, inserendole inoltre in una mappa georeferenziata a supporto. Ossigeno disciolto, pH, salinità e potenziale redox mostrano valori bassi vicino alla fonte di inquinamento, aumentando man mano che ci si allontana da esso. I dati ottenuti indicano nel loro insieme che lo scarico di acque residuali dalle attività di piscicoltura nel braccio di mare del Rio San Pedro può indurre stress ossidativo negli organismi esposti che può portare ad un'alterazione dello stato di salute degli organismi.

1.1- Introduzione

I mari e gli oceani rappresentano il recipiente finale (*ultimate sink*) di molti prodotti generati nei sistemi terrestri. Il ciclo idrologico muove ogni anno centinaia di migliaia di km³ di acqua e di questi, circa 40.000, dopo aver dilavato la terra, ritornano al mare arricchiti di sostanze solubili, insolubili e di materiale sospeso. A questo enorme quantitativo di sostanze si aggiungono quelle naturali e di sintesi usate dall'uomo, nonché i risultati intermedi o finali di complesse catene di trasformazioni chimiche e biologiche.

Anche tutto ciò che è contenuto, scambia continuamente con la "fase liquida" del pianeta. Il risultato è che gli ecosistemi marini risentono in maniera diretta o indiretta di tutte le attività antropiche (Stegeman and Hahn, 1994).

Nel 20° secolo, sono state prodotte e, in parte, rilasciate nell'ambiente migliaia di inquinanti organici in tracce come bifenili policlorurati (PCBs), pesticidi organocloridici (OCPs), idrocarburi policiclici aromatici (PAHs), dibenzofurani policlorinati (PCDFs) e policlorodibenzo-p-diossine (PCDDs). Dagli anni sessanta l'umanità ha preso coscienza del potenziale effetto dannoso a lungo termine di questi agenti chimici in generale e in particolare del potenziale rischio nei confronti dell'ambiente marino e terrestre. La presenza di un composto xenobiotico in un tratto di un ecosistema acquatico non indica di per se effetti dannosi. Possono stabilirsi connessioni tra livelli esterni di esposizione, livelli interni di contaminazione tissutale e effetti precoci dannosi. Molti composti idrofobici organici e i loro metaboliti, che contaminano gli ecosistemi acquatici, devono ancora essere identificati e il loro impatto sulla vita acquatica ancora determinato.

Le tipologie degli inquinanti sono numerose ma si tende normalmente a classificarli in due grandi categorie quella dei **macro** e quella dei **microinquinanti**.

Al primo gruppo appartengono sostanze naturalmente presenti negli ecosistemi ma che in concentrazioni troppo elevate tendono a diventare tossiche per la componente biotica o a creare scompensi ecosistemici. Ai macroinquinanti appartengono i nutrienti (nitrati, fosfati), i solfati e tutti gli elementi presenti ad alte concentrazioni quali sodio, potassio, magnesio, calcio ecc. Gli ecosistemi marini sono generalmente adattati a funzionare con una disponibilità molto precisa di queste sostanze.

Comunque sia evoluto l'ecosistema, in equilibrio con i nutrienti, l'eccesso dovuto alle attività antropiche genera perturbazioni e modificazioni più o meno reversibili in funzione del grado di resistenza e resilienza.

I microinquinanti rappresentano quella piccola frazione di elementi o composti presenti normalmente a concentrazioni estremamente basse (livello di tracce o ultratracce). Il loro ruolo metabolico è noto solo per certi microelementi mentre per altri deve essere ancora chiarito. I metalli pesanti, gli idrocarburi alifatici ed aromatici rientrano nella categoria dei microinquinanti naturali ma con alterazione della loro disponibilità a seguito della perturbazione dei loro cicli naturali e delle mobilizzazioni dai comparti indisponibili della litosfera, come le mineralizzazioni ed i depositi di combustibili fossili. Le molecole di sintesi rappresentano un pool di sostanze ad elevato potere eco tossicologico, la cui portata è attualmente di difficile quantificazione. Questo è dovuto, da una parte, al fatto che esiste un numero enorme di composti di sintesi prodotti sino ad oggi, stimabili nell'ordine di centinaia di migliaia; dall'altra si pone il problema della difficile valutazione del pericolo, ma soprattutto del rischio, per quelle molecole non ancora sufficientemente indagate ma comunque "liberate"

nell'ambiente. Un terzo elemento, infine riguarda la possibilità che questo pool di sostanze eserciti sui sistemi biologici effetti interattivi non prevedibili e ben diversi dalla semplice sommatoria dei singoli effetti.

1.1- Fish Farm

Il numero e la diversità dei contaminanti nell'ambiente marino è aumentato notevolmente negli ultimi anni (Kennish, 1997; Luoma, 1990). Una delle nuove attività che colpisce l'ambiente costiero è l'acquacoltura marina che negli ultimi anni è aumentata in tutto il mondo, principalmente a causa dell'aumento della richiesta dei prodotti dell'acquacoltura, e il bisogno di nuove provviste. Questo sviluppo genera profitti entrate, ma porta anche rischi di impatto negativo sull'ambiente (Tovar et al., 2000a,b)).

In generale è stato accettato che la maricoltura ha un relativo basso impatto sull'ambiente. Comunque, le acque residuali scaricate da intensa maricoltura nelle acque costiere può portare ad un deterioramento della qualità dell'acqua tramite l'alto carico di nutrienti, particolato sospeso e materia organica (Uotila, 1991; Jambrina, 1999), che causano un aumento di domanda di ossigeno biologica, crescita algale eccessiva, ecc. Inoltre, la materia organica ha un effetto importante sulla composizione dei sedimenti, cambiando sia le caratteristiche fisiche che chimiche, e agisce come una trappola per i metalli. Metalli pesanti sono accumulati nei sedimenti marini dove vengono incorporati in molti cicli biologici e chimici che influenzano la colonna d'acqua e il biota. D'altra parte, le reazioni chimiche possono cambiare la concentrazione dei metalli pesanti nei sedimenti e, come conseguenza, nell'acqua che sta sopra (Luoma, 1990).

L'impatto ambientale di acquacolture marine dipende fortemente dalla specie, metodo di coltura densità di stoccaggio, composizione del cibo, tecnica di alimentazione, e idrografia del sito. In letteratura ci sono stati pochi studi sugli impatti ambientali di una coltura di orate (Barnab_e, 1990; Barbato et al., 1996; Reggiani, 1996; Papoutsoglou et al., 1996).

L'attenzione è stata focalizzata precedentemente sul carico di nutrienti, che può portare ad eutrofizzazione. A seconda della specie e della tecnica di coltura, più dell'85% di fosforo e 52-95% di azoto, che vengono immessi come cibo in un sistema di acquacoltura marina, possono disperdersi nell'ambiente attraverso residui di cibo, escrezioni dei pesci, feci e respirazione (Wu, 1995). Sebbene le concentrazioni di azoto e fosforo totali sono solitamente basse, il loro impatto nell'ambiente non può essere ignorato a causa dell'alto volume di acqua utilizzato durante l'acquacoltura.

Molti studi hanno stimato l'azoto e fosforo totali scaricati nelle acque riceventi a seconda della specie (Makinen, 1991; Beveridge et al., 1991; Ackefors and Enell, 1994). Grazie ai miglioramenti ottenuti nella qualità del cibo e dei metodi di nutrimento, sono stati ottenuti valori minori di carico del corpo ricevente rispetto agli studi precedenti.

Altri inquinanti sono residui di farmaci usati per curare o prevenire malattie, si è visto infatti come molti organismi marini mantenuti in spazi limitati e ad alte densità siano più soggetti alle malattie e data l'alta densità alla diffusione delle stesse molto rapida.

Si deve riconoscere che secondo i dati, la maggior parte delle pratiche di acquacoltura hanno avuti pochi effetti avversi sull'ecosistema (Barg, 1992). Comunque, sono stati riscontrati alcuni casi di degrado ambientale nelle aree costiere a causa, per esempio, delle culture intensive in gabbie in Europa e la "coltivazione" dei gamberi nel sud-est asiatico e America Latina (Barg, 1992; Sreenivasan, 1995). Per ridurre l'impatto

negativo dell'acquacoltura, i governi di molti paesi stanno adottando politiche per ridurre l'inquinamento degli ambienti acquatici, insistendo sull'importanza di studi sulla produzione di prodotti di scarto negli allevamenti di pesci, (Gonzalez-Vila et al., 1996; Twarowska et al., 1996; Easter et al., 1996), e della qualità ambientale dell'ambiente dove gli effluenti vengono scaricati (Cornel and Whoriskey, 1993; Suvapepun, 1994).

1.2- Sedimenti

I sedimenti sono un insieme di particelle organiche ed inorganiche prodotte dall'attività di un bacino (Martín et al., 1987). I sedimenti costituiscono la matrice dell'ambiente (Broecker, 1974; Elderfield, 1978). La loro composizione dipende dal bacino e dall'integrazione di molti processi che hanno luogo nella colonna d'acqua. Per questa ragione sono considerati come la riserva di un gran quantitativo di elementi che entrano nel sistema, naturalmente e antropogenicamente (Swartz & Lee, 1980; Ahumada et al., 1996; Izquierdo et al. 1997).

I sedimenti sono considerati un mezzo adatto per studiare la contaminazione dell'ambiente acquatico perché rappresentano un sink di molte fonti di contaminanti (Izquierdo et al., 1997; Casado-Martinez et al., 2006). Gli strati di sedimento possono rappresentare una documentazione storica dei vari tipi di inquinanti accumulati negli anni (Ahumada, 1998; Colombo et al., 1996; Ponce-Vélez & Botello, 1991; Del Valls et al., 2004) perciò sedimenti non modificati presentano una matrice utile negli studi di qualità dell'ambiente (Luoma & HO, 1993; Birch et al., 2001). Anche se i sedimenti contaminati sono solo una componente dell'ecosistema, sono probabilmente la maggior fonte di stress per gli organismi presenti

nell'ambiente acquatico (Harding, 1992). Sono presenti molti dati in letteratura sull'accumulo di residui di inquinanti nei sedimenti (Ahumada et al., 1996; Izquierdo et al., 1997; Del Valls et al., 1998; Nendza, 2002; Martin-Diaz et al., 2004; Riba et al., 2004; Casado-Martinez et al., 2006; Morales-Caselles et al., 2007). Fra questi possiamo prendere in considerazione la materia organica, che può influenzare l'equilibrio dell'ossigeno disciolto nell'acqua, metalli pesanti, la cui presenza può avere effetti dannosi sugli organismi (Liou et al., 2003) ecc.

La misura del flusso dei soluti attraverso l'interfaccia acqua-sedimento da informazioni sul ruolo della diagenesi dei sedimenti e delle vie preferenziali della mineralizzazione della sostanza organica. Nei sedimenti la materia organica viene degradata a materiale inorganico attraverso una sequenza verticale di diversi processi microbici che usano diversi accettori di elettroni finali come ossidanti (Froelich et al., 1979; Canfield, 1993). Comunque il più efficiente di questi processi è l'ossidazione aerobica della materia organica, in sedimenti costieri con alti contenuti di materia organica, l'ossigeno viene rapidamente consumato all'interno dei primi millimetri del sedimento (Revsbech et al., 1980) a questo punto i microorganismi usano altri accettori terminali come ossidanti come NO_3^- , ossidi di Mn e Fe e SO_4^- (Froelich et al., 1979; Canfield, 1993). Alcuni NH_4^+ rilasciati dalla degradazione della materia organica vengono ossidati a NO_3^- in presenza di ossigeno durante la nitrificazione, che può essere successivamente ridotto ad azoto in forma gassosa (N_2 e N_2O) durante la denitrificazione. I sedimenti costieri sono generalmente considerati siti favorevoli per la denitrificazione a causa dell'alto carico di nutrienti, materia organica e bassa concentrazione di ossigeno (Seitzinger et al., 1984; Seitzinger, 1988). In aggiunta alla riduzione di NO_3^- dai denitrificatori, i batteri possono anche usare NO_3^- come accettore di elettroni nella riduzione

dissimilato ria del nitrato ad ammonio (DNRA) (Jørgensen, 1989). L'ossido nitrico (N_2O), che è un potente biogas ad effetto serra (Rodhe, 1990) è anche coinvolto nella distruzione dell'ozono stratosferico (Cruzen, 1970), può essere prodotto durante la nitrificazione, denitrificazione e DNRA. Sotto la zona sub-ossica, dove i sedimenti sono molto riducenti, la riduzione del solfato diventa il processo diagenetico dominante e generalmente rappresenta circa il 50% dell'ossidazione del carbonio organico nei sedimenti costieri (Canfield, 1993; Thamdrup and Canfield, 2000). Una volta che il solfato è esaurito il carbonio organico è degradato in vari processi fermentativi e metanogenesi a CH_4 e CO_2 . CH_4 può successivamente essere ossidato anaerobicamente dai batteri solfato-reduttori (Martens e Berner, 1974), che limitano il suo flusso verso la colonna d'acqua. In questo modo, oltre alla CO_2 che è il principale prodotto finale mineralizzazione della materia organica, nei sedimenti costieri vengono prodotti anche CH_4 e NO_2 in quantità spesso insignificanti per i cicli del carbonio e azoto dei sedimenti (Hopkinson et al., 1999; Alongi et al., 2005) ma che può essere significativo per il potenziale riscaldamento globale degli ambienti costieri. Molti autori hanno evidenziato l'importanza dei processi di mineralizzazione benthica come maggior fonte di N_2O e CH_4 nei sistemi costieri (Robinson et al., 1998; Seitzinger et al., 2000; Upstill-Goddard et al., 2000; Abril and Iversen, 2002; Bange, 2006). Mentre gli oceani giocano il maggior ruolo nel bilancio atmosferico di N_2O , rappresentando per circa un terzo delle emissioni globali di N_2O (Seitzinger et al., 2000), le emissioni oceaniche di CH_4 sono solo una piccola parte (2%) nel bilancio globale del CH_4 . Comunque, anche se la terrazza continentale e gli estuari occupano solo una piccola porzione degli oceani mondiali, contribuiscono per circa 35-60% alle emissioni di N_2O oceaniche (Bange et al., 1996; Seitzinger et al., 2000) e circa 75% delle emissioni globali oceaniche di CH_4 (Bange et al., 1994).

1.3- Ecotossicologia e biomarker

La determinazione della concentrazione di elementi chimici tossici, generati da una specifica attività, in un determinato luogo permette una stima analitica dei cambiamenti generati nei sedimenti (Landis e Yu, 2004; Luoma e HO, 1993). I saggi di tossicità sono uno strumento per identificare problemi non specifici o effetti sinergici degli inquinanti (Landis e Yu, 2004), e forniscono informazioni rapide e integrate sul grado di tossicità del sedimento (Van Gestel et al., 2001; Amin e Comoglio, 2002). I saggi biologici dei sedimenti sono strumenti di importanza sempre crescente per gli scienziati per testare la tossicità e la biobisponibilità di un composto chimico per gli organismi. Sono generalmente test semplici che valutano le risposte di un organismo, preso in esame, esposto a sedimenti contaminati in condizioni controllate (Martin-Diaz et al., 2004; Riba et al ., 2004) i suoi vantaggi potenziali sono stati elencati da diversi autori (Williams et al., 1986; Chapman ,1995; Del Valls et al., 2000; Chapman et al., 2002). I saggi di biotossicità sono stati applicati in tutto il mondo per contribuire alla valutazione e monitoraggio della qualità dei sedimenti, dal momento che solo le risposte di del sistema vivente è in grado di integrare il complesso effetto dei contaminanti. Il ruolo internazionalmente riconosciuto dei saggi biologici (Nendza, 2002) è relazionata alla loro abilità di fornire informazioni quantificabili sul danno biologico potenziale (rischio tossico) causato da contaminanti multifattoriali biodisponibili, di dare risposte che non sono ristrette da liste di contaminanti predeterminate (Wells, 1999) e i test per la tossicità acuta sono un ottimo strumento per identificare gli effetti della contaminazione dei sedimenti (Beiras et al., 2001) ma quando i contaminanti associati al sedimento influenzano il biota, il risultato è

solitamente un livello di mortalità sub letale, piuttosto che mortalità acuta.

Per determinare il potenziale effetto nocivo di un composto chimico sul biota, è necessario stabilire una relazione quantitativa riproducibile tra l'esposizione al composto chimico e una misura del danno all'organismo o al gruppo di organismi sotto esame. Questa relazione è caratterizzata da due variabili: dose e risposta (Wright e Welbourn, 2002). Lo studio di qualità dell'acqua e dei sedimenti è portato avanti attraverso test di tossicità, dove un tessuto, un organismo o un gruppo di organismi è usato come controllo per determinare i rischi potenziali di una sostanza fisiologicamente attiva, la cui attività è sconosciuta (FAO, 1977). I biotest sono svolti esponendo un campione rappresentativo della popolazione ad un range di concentrazioni chimiche e di seguito andando a vedere le risposte lungo un periodo di tempo. Risposte come la mortalità (acuta) o effetti più gradualmente come modifica della crescita o della performance riproduttiva (cronico) o qualsiasi risposta che può essere relazionata ad una dose di componente chimico o esposizione, inclusa l'attività degli enzimi, chimica dei tessuti, patologie e cambiamenti nel comportamento (Newman & Unger, 2003).

A causa della sua natura integrativa, la matrice del sedimento può registrare cambiamenti a causa dell'introduzione dei contaminanti dall'atmosfera e/o dalla colonna d'acqua (Luoma e HO, 1993). L'accumulo di agenti tossici nella matrice può generare un effetto sinergico chiamato "stress su stress" che si riferisce all'energia di cui hanno bisogno gli organismi per sopravvivere nell'ambiente alterato (Viarengo et al., 1995; Viarengo et al., 1998).

Alcuni metodi che misurano i contaminanti organici attraverso analisi chimiche, tuttora molto usati e spesso molto costosi, ci permettono generalmente di misurare la grandezza e il livello di contaminazione ambientale (Woodhead et al., 1999), usando un numero limitato di campioni presi da varie matrici

(acqua, sedimento, piante, animali etc.), comunque sia, nessun di questi metodi di analisi ci permette di valutare gli effetti della presenza del contaminante sui tessuti vivi e sulla salute dell'ecosistema (Kirby et al., 2000; Amiard et al., 2000). In modo simile, la valutazione tossicologica dei componenti chimici solitamente usa test di dose letale che si focalizzano quindi sulla mortalità, senza considerare gli effetti sub letali dell'esposizione (Peakall, 1994 b). la biodisponibilità, effetti tossicologici ed ecotossicologici di un certo contaminante può variare dalla forma chimica, a causa delle interazioni fra i contaminanti (sinergici e antagonistici) o tra i contaminanti e altri componenti abiotici o biotici (assorbimento-desorbimento, biodisturbo, etc.), o anche in base all'organismo preso in considerazione, il suo ciclo vitale, o le sue condizioni fisiologiche (Amiard et al., 2000).

È molto difficile predire il pericolo tossicologico per la comunità acquatica di un'area solo basandosi sui dati chimici dell'acqua e/o del sedimento (Carballeira, 2003). Inoltre, i metodi basati su osservazioni qualitative e quantitative degli organismi in natura e in condizioni controllate (laboratorio) sono ora considerate un mezzo per compensare le mancanze delle analisi chimiche (Gray, 1992). Ai nostri giorni esistono due metodi basati sullo studio degli organismi vivi: 1) lo studio della presenza (o assenza) di una certa specie o gruppo di specie chiamate **biondicatori** e 2) la misura dei parametri molecolari, biochimici, cellulari o fisiologici di individui chiamati **biomarkers** che sono il centro di questa tesi.

Negli ultimi decenni i biomarker si sono sviluppati come un elemento innovativo nell'ambito delle indagini eco tossicologiche, rispondendo in maniera rapida e precisa a quesiti basilari come: quali sono gli effetti che i composti inquinanti provocano sulle popolazioni e/o comunità naturali? La corretta valutazione di questi effetti può rappresentare un segnale precoce del livello di contaminazione ambientale?

L'idea di utilizzare i biomarker si è manifestata per la prima volta con le ricerche pionieristiche degli anni '70 di Bayne e collaboratori (1976) e Payne (1977). Negli ultimi due decenni, questo approccio è stato utilizzato in una vasta gamma di situazioni ambientali, ed i risultati sono documentati in numerose pubblicazioni scientifiche (McCarthy e Shugart, 1990; Peakall, 1992; Huggest et al., 1992; Peakall e Shugart, 1993; Fossi e Leonzio, 1994; Walker et al., 1996; Fossi, 2000).

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

La grande novità di questo approccio metodologico, rispetto alle metodologie classiche della tossicologia ambientale, è quella di trovare fondamento sul concetto della intercorrelabilità degli effetti di un contaminante ai vari livelli di complessità strutturale. L'obiettivo di tale monitoraggio è infatti quello di stimare (strumento "diagnostico"), prevedere (strumento "prognostico") e, di conseguenza, intraprendere azioni per evitare eventi inaccettabili a livello ecologico, come l'insuccesso riproduttivo o l'incremento della mortalità nell'ambito di una popolazione, attraverso l'utilizzo di "segnali precoci" di esposizione o di effetto.

In sintesi, l'utilizzo di biomarker permette in primo luogo di "diagnosticare", attraverso lo studio delle risposte immediate (induzione sistemi detossificanti, inibizioni attività enzimatiche, formazioni prodotti metabolici, alterazioni del DNA, ecc.) il tipo e/o tipi di contaminanti ai quali l'organismo bioindicatore è sottoposto ed i livelli "semi-quantitativi" dell'esposizione. Successivamente, in funzione dell'intercorrelabilità degli effetti ai vari livelli di

complessità strutturale, "prognosticare" e quindi prevedere il verificarsi di effetti negativi a lungo termine anche su scala ecologica. Il ruolo dei biomarker nelle indagini ecotossicologiche non è quindi quello di dare informazioni "quantitative" sui livelli di esposizione di un organismo ad un determinato contaminante, ma quello di fornire indicazioni sullo "stato di salute" come segnale potenziale di alterazioni ai più alti livelli ecologici (Peakall e Shugart, 1993; Fossi e Leonzio, 1994; Fossi, 1998, 2000).

L'applicazione di questo approccio metodologico nei programmi di biomonitoraggio deve tenere conto però della presenza di alcuni fattori di "disturbo" che possono alterare, in una certa misura, il segnale fornito dai biomarker. Inoltre la presenza in certi casi di un'elevata variabilità interindividuale nella risposta dei biomarker verso uno stesso livello di esposizione, può rappresentare, se non correttamente interpretato, un fattore di disturbo nella comprensione dei dati statistici.

In accordo con NRC (1987), WHO (1993), i biomarkers possono essere suddivisi in tre classi:

1. **Biomarkers di esposizione:** che da segnali di esposizione ad un agente chimico da parte di un organismo, una popolazione, o una comunità (Depledge, 1994) coprendo l'identificazione e la misura dell'esposizione interna o dose ad un composto chimico (Peakall et al., 1999).
2. **Biomarkers di effetto o stress:** che da segnali che un'organismo, una popolazione, o una comunità è stata influenzata (solitamente negativamente) da uno o più inquinanti; non necessariamente fornisce informazioni sulla natura dell'inquinante o dello stress al quale l'organismo è stato esposto (Depledge, 1994) incluse le misure di sostanze endogene o parametri che indicano un cambiamento biologico in risposta ai composti chimici,

come alterazioni degli enzimi nei tessuti e nei fluidi corporei (Peakall et al., 1999).

3. **Biomarker di sensibilità:** indicano l'abilità intrinseca o acquisita di un organismo di rispondere agli effetti di esposizione ad una specifica sostanza xenobiotica, includendo fattori genetici e cambiamenti nei recettori che alterano la suscettibilità dell'organismo a questa esposizione.

Nonostante i biomarker siano stati definiti da diversi autori, la classificazione dei biomarker in letteratura è molto diffusa dal momento che i biomarker di esposizione e di effetto sono distinti nella maniera che sono utilizzati non per la loro dicotomia (Depledge, 1994; Martin-Diaz et al., 2004).

Generalmente le risposte dei biomarker sono considerate essere intermedie tra le fonti di inquinamento e effetti a più alto livello (Suter, 1990). Quando queste risposte compensatorie sono attivate, il potenziale di sopravvivenza dell'organismo può aver già iniziato a calare perché le abilità dell'organismo di organizzare risposte compensatorie alle nuove sfide dell'ambiente così modificato possono essere state compromesse (Depledge e Fossi, 1994). La ragione migliore per usare i biomarkers è che possono fornire informazioni sugli effetti biologici degli inquinanti piuttosto che una mera quantificazione dei loro livelli nell'ambiente. I biomarkers possono fornire un'idea del potenziale meccanismo dell'effetto dei contaminanti.

Per valutare oggettivamente forze e debolezze dei biomarker, sono stati proposti sei criteri (sensitive tools 3) (basati sui criteri formulati da Stegeman et al., 1992):

- Il saggio che quantifica il biomarker deve essere affidabile, relativamente economico e facile da svolgere;
- La risposta del biomarker deve essere sensibile all'esposizione con l'inquinante e/o servire come un parametro per l'identificazione di segnali precoci;
- La linea di base del biomarker deve essere ben definita di modo da poter distinguere tra variabilità naturale (rumore) e stress indotto dal contaminante (segnale);
- L'impatto di fattori che possono confondere il segnale del biomarker devono essere ben definiti;
- Il meccanismo di base della relazione tra risposta del biomarker e esposizione all'agente inquinante (dose e tempo) deve essere stabilito;
- La significatività tossicologica del biomarker, come la relazione tra la risposta del biomarker e l'impatto (a lungo termine) dell'organismo, deve essere stabilita.

In aggiunta a questi criteri si ritiene che i biomarkers debbano essere preferenzialmente non invasivi o non distruttivi, per permettere o facilitare il monitoraggio ambientale degli effetti degli inquinanti su specie o habitat protette/i o a rischio (Fossi and Marsili, 1997).

1.3.1- Vie di uptake dell'agente tossico

L'uptake è il movimento di un contaminante all'interno di un organismo. Questo uptake può avvenire in molti meccanismi e può coinvolgere il derma, le branchie, superficie polmonare o l'intestino, in tutti i casi il processo inizia dall'interazione con le cellule del tessuto (Newman e Unger

2003). Negli organismi acquatici le principali vie di uptake degli xenobiotici sono le branchie, modificate sia per gli scambi respiratori che la regolazione degli elettroliti e possono permettere l'entrata di sostanze disciolte tramite diffusione o vie regolatorie ioniche (Wright e Welbourn, 2002) (Fig. 1). In aggiunta l'assorbimento dei composti tossici attraverso il tratto digestivo rappresenta la maggior via di assorbimento dei composti chimici negli organismi multicellulari. L'uptake molecolare è, dopo tutto, la funzione principale del sistema gastrointestinale, che è adattato a questo scopo (Wright e Welbourn, 2002).

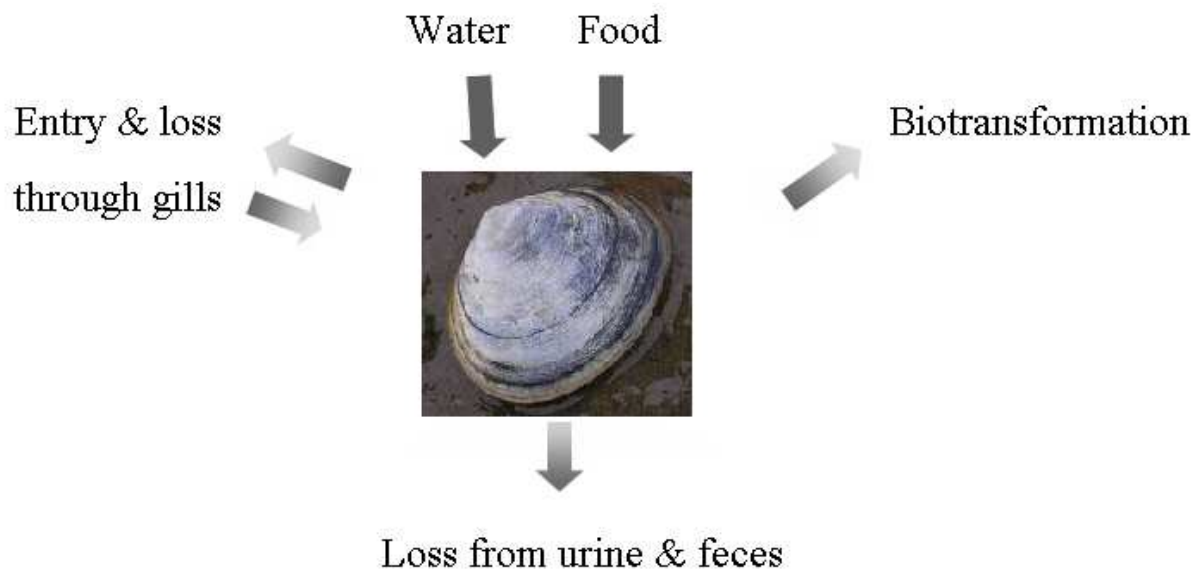


Fig. 1: Vie di uptake dell'agente tossico. Lo xenobiotico entra nell'organismo tramite l'acqua e il cibo. Successivamente un'importante frazione del composto tossico è perso attraverso le branchie, urine e feci, un'altra frazione è invece biotrasformato. Adattato da Newman e Unger (2003).

1.3.2- Processi di biotrasformazione e detossificazione

Successivamente all'entrata dei contaminanti in un organismo, avvengono reazioni chimiche all'interno del corpo per alterare la struttura dei composti chimici i.e. catalasi enzimatica. Questo processo di conversione metabolica è conosciuto come biotrasformazione e avviene in molti tessuti e organi (Fig.

2). Come risultato di questo processo di detossificazione, gli xenobiotici sono convertiti a forme più idrosolubili e più facilmente escretabili.



Fig. 2: Avviene una redistribuzione interna o biotrasformazione del contaminante. Riassunto in un semplice modello a scatola e frecce. Le frecce indicano l'uptake del composto tossico da cibo e acqua e l'eliminazione. Fonte: Newman e Unger, 2003

Mentre lo scopo di questi processi metabolici è ovviamente quello di ridurre la tossicità dell'agente chimico, non è sempre questo il caso, a volte può avvenire un processo chiamato attivazione è l'effetto dannoso dell'agente tossico viene peggiorato, o un composto inattivo viene convertito in uno con bioattività negativa maggiore formando metaboliti genotossici con potenziale mutagenico e/o proprietà cancerogene (Kirby et al., 2000; Newman e Unger, 2003; van der Oost et al., 2003; Landis e Yu, 2004).

Durante la biotrasformazione, composti lipofili vengono spesso, ma non sempre, resi più facilmente eliminabili tramite la conversione a composti più idrofili. La biotrasformazione di composti organici può essere separata in reazione della **Fase I** e **Fase II**. Le reazioni nella **Fase I** aumentano l'idrofilicità, e includono ossidazione, idrolisi e riduzione dello xenobiotico. Una delle più comuni reazioni della Fase I coinvolge l'aggiunta di un ossigeno allo xenobiotico attraverso una monoossigenasi (monoossigenasi a funzione multipla, MFO). Dopo la trasformazione, i prodotti della

reazione della Fase I possono essere eliminati o entrare nella Fase II. Le reazioni della **Fase II** formano coniugati, che inattivano e inducono l'eliminazione del composto (Landis e Yu, 1994; Newman e Unger, 2003; Landis e Yu, 2004) (Fig. 3).

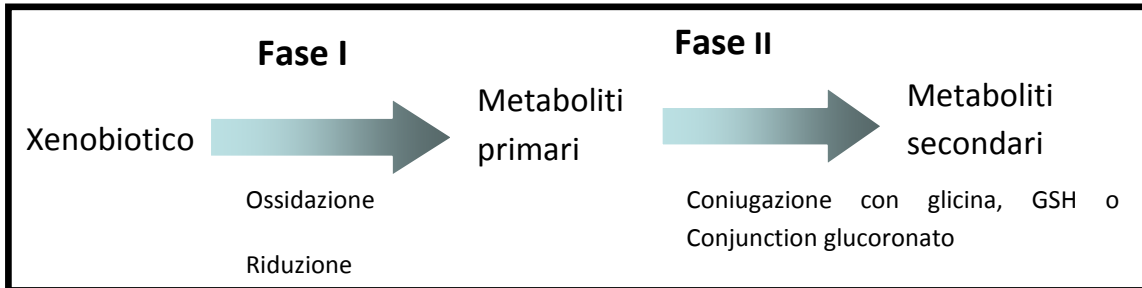


Fig. 3: Diagramma a frecce del processo di biotrasformazione di un composto xenobiotico in un composto più solubile. Fonte: Ming e Yu, (2004)

Date queste premesse, risulta prioritaria, per una indagine basata sull'utilizzo di biomarker, la scelta a monte di un valido organismo bioindicatore.

Il taxon dei bivalvia (Pelecypoda) comprende molluschi comuni come vongole, ostriche, cozze, pettini e teredini. I bivalvia includono circa 8000 specie viventi descritte, delle quali 1300 dulcicole e le rimanenti marine.

I bivalvia sono suddivisi in tre gruppi morfologici principali, i protobranchi, i lamelibranchi e i setti branchi, distinti in base alle differenze riscontrate nella struttura delle branchie e nelle modalità di alimentazione. In passato, questi gruppi erano considerati sottoclassi, ma nelle classificazioni odierne, i lamelibranchi, che sono in assoluto i bivalvi più numerosi, non ricevono un riconoscimento tassonomico formale. Concettualmente, comunque, i tre raggruppamenti costituiscono ancora comodi livelli di organizzazione.

I bivalvi sono molluschi altamente evoluti, ad ambienti bentonici infaunali, dove sono relativamente al sicuro dai predatori. I bivalvi sono gli unici molluschi ad aver perso la radula e quasi tutti sfruttano le branchie per la cattura del cibo. Il piede e la conchiglia compressi lateralmente agevolano l'escavazione in sedimenti incoerenti.

La filtrazione consente di alimentarsi durante l'infossamento all'interno del sedimento, e i sifoni permettono di accedere ad acqua fresca ricca di nutrienti e di ossigeno, senza abbandonare il sedimento.

1.4- La specie

Scrobicularia plana (Da Costa, 1778) è un bivalve lamellibranchio dell'infauna della famiglia Scrobicularidae (Fig. 4). La sua caratteristica ecologica è la sua tolleranza ai cambiamenti fisici e chimici nel sedimento e la rapida adattabilità demografica alle variazioni dell'ambiente (Hughes, 1970a; Nott, 1980). Può occupare fondi molli sia di tipo argilloso che fangoso, con abbondante detrito organico, dove l'apporto di acqua dolce produce variazioni considerevoli di salinità. Il suo areale di distribuzione si estende dal mare Norvegese al Senegal, incluso il Mar Mediterraneo preferibilmente però le acque intertidali ed è spesso la specie dominante delle comunità di fondo di acqua bassa (Tebble, 1976). In molte di queste acque costiere, macrofite bentoniche creano grandi e densi aggregati dalla tarda primavera all'inizio dell'autunno. Spesso solo una piccola parte della biomassa viene direttamente consumata dagli erbivori, la parte rimanente entra nel pool detritico e diventa disponibile per i "deposit-feeders". Micro-organismi viventi vengono assorbiti molto meglio che il detrito, il che suggerisce che essi costituiscano la maggior fonte di nutrimento per i mitili che utilizzano questa strategia di alimentazione (Matthews *et al.*, 1989). Nonostante il suo primario nutrimento siano i depositi superficiali *S. plana* ricava parte del suo nutrimento filtrando la materia sospesa dalla colonna d'acqua (Hughes, 1970a; Hughes, 1973). I bivalvi giocano un ruolo importante di collegamento tra il sistema bentonico e quello pelagico rimuovendo un gran quantitativo di materiale particolato dalla colonna d'acqua (Alpine e Cloern, 1992), sequestrando parzialmente azoto e fosforo (Nalepa *et al.*, 1991) e rilasciando nutrienti inorganici nella colonna d'acqua per escrezione diretta e tramite la produzione di pseudofeci (Prins and Smaal, 1994). L'arricchimento del

sedimento con biodepositi fornisce una fonte di nutrimento per gli altri comparti biotici come le macrofite e i "deposit-feeder" epibentici.



Fig. 4: *Scrobicularia plana* con il sifone inalante ed esalante in estensione. Fonte: <http://www.arkive.org/peppery-furrow-shell/scrobicularia-plana/>

Regno: Animalia

Phylum: Mollusca

Classe: Bivalvia

Sottoclasse: Heterodonta

Ordine: Veneroida

Superfamiglia: Tellinoidea

Famiglia: Semelidae

Genere: *Scrobicularia*

Specie: *plana*

1.4.1- Struttura

Il corpo di *S. plana*, dotato di simmetria bilaterale, è estremamente modificato rispetto ai mollusco ancestrali ed è fortemente compresso lateralmente. In questi animali relativamente immobili, il capo è vestigiale e l'apparato sensoriale è situato altrove, prevalentemente lungo i margini del mantello. L'ampio mantello racchiude un paio di cavità laterali del mantello, ciascuna delle quali contenente una branchia. Le branchie sono in genere molti grandi e deputate alla filtrazione oltre che agli scambi gassosi. L'esclusiva conchiglia, che è suddivisa in due elementi e munita di cerniera dorsale, racchiude il corpo. La massa viscerale è situata dorsalmente al di sotto della cerniera; il piede a forma di lama è adatto a scavare e aderisce al substrato con il suo margine ventrale.

1.4.2- Evoluzione delle branchie

I depositivori selettivi, come i protobranchi, e i sospensivori, come i lamellibranchi, sono entrambi microfagi specializzati nell'assunzione di particelle alimentari di piccole dimensioni. Gran parte delle strutture dei protobranchi deputate alla raccolta del cibo potrebbero adattarsi ai processi di elaborazione alimentare che avvengono nell'alimentazione per sospensione. I primi protobranchi erano virtualmente dotati di caratteristiche morfologiche e comportamentali tali da consentire loro di evolvere un meccanismo di alimentazione per sospensione basato sull'impiego delle branchie. I depositivori infaunali, insieme alle branchie respiratorie, erano già dotati di un piede capace di scavare in sedimenti incoerenti e di un meccanismo che consentisse di generare un flusso d'acqua attraverso la cavità del mantello e le branchie. Possedevano, inoltre, una

branchia utilizzata esclusivamente per gli scambi gassosi, ma strutturata in modo da intrappolare accidentalmente particelle di dimensioni troppo grandi per attraversare i filamenti della sua superficie a monte (frontale). E per di più, disponevano di un meccanismo ciliare per la rimozione di queste particelle dalla superficie frontale della branchia e una struttura di cernita, rappresentata dai palpi labiali, in grado di separare le particelle alimentari da quelle minerali e di indirizzare il cibo alla bocca e gli scarti altrove.

Nel tempo, alcuni protobranchi si servirono sempre di più dell'alimentazione per sospensione e sempre meno dei depositi come nutrimento, fino a quando, infine, si svilupparono i bivalvi lamelibranchi, con le loro branchie ampie ed efficienti per l'alimentazione filtrante. La branchia semplice dei protobranchi si modificò per aumentare la sua efficienza come strumento di filtrazione, mantenendo, comunque, la sua originaria funzione relativa ai processi di scambio gassoso.

Il nuovo meccanismo alimentare permise ai lamelibranchi di infossarsi nei sedimenti molli, dove si trovano relativamente al sicuro dai predatori, e di sfruttare contemporaneamente l'abbondante risorsa di fitoplancton e di ossigeno presente nelle acque che sovrastano i sedimenti.

1.4.3- Nutrizione

Il sistema digerente è costituito da una bocca, esofago, stomaco, intestino, retto e ano. La bocca è in posizione anteriore rispetto alla massa viscerale, situata tra i palpi labiali. I ciechi digerenti ramificati si estendono nell'emocele come diverticoli dello stomaco. L'intestino forma tipicamente numerose anse attraverso la massa viscerale prima di estendersi posteriormente, attraverso la cavità pericardica e terminare nell'ano. L'ano è posteriore e si apre nella camera esalante.

L'alimentazione tramite filtrazione viene integrata dal consumo di detriti. *S. plana* allunga il suo sifone inalante sulla superficie e lo usa come un aspiratore per risucchiare materiale depositato (Ruppert et al., 2004) (Fig. 5), che è poi selezionato dalle branchie. Il sistema digerente ha subito diverse modificazioni e lo stomaco è, di conseguenza, più complesso di quello posseduto dai protobranchi. Lo stomaco contiene uno stilo cristallino enzimatico, presenta numerose connessioni con i ciechi digerenti ed è dotato di uno scudo chitinoso ridotto. Il solco intestinale si estende al di fuori dell'intestino nello stomaco. La digestione è sia extracellulare, e avviene nello stomaco, che endocellulare, e si compie nei ciechi digerenti.



Fig. 5: *S. plana* estende il suo sifone inalante alla ricerca di detriti di cui alimentarsi. Fonte: <http://www.arkive.org/peppery-furrow-shell/scrobicularia-plana/>

1.4.4- Infossamento

L'infossamento in sedimenti incoerenti avviene per mezzo del piede muscolare lateralmente compresso, che agisce in associazione con la conchiglia, con i muscoli retrattori pedali, i muscoli adduttori e l'emocele.

1.4.5- Fusione del mantello

L'afflusso di particelle del sedimento all'interno della cavità del mantello rappresenta un problema costante per i bivalvi fossori. Le valve devono schiudersi leggermente durante la nutrizione o l'infossamento. Ma l'apertura fornisce una via d'accesso per il sedimento. Il sedimento può entrare anche col flusso d'acqua inalante.

La selezione naturale ha favorito una varietà di soluzioni al problema. L'incremento della pressione sanguigna nel mantello provoca una dilatazione dei margini, in maniera che il margine destro e il margine sinistro del mantello si tocchino e si saldino, impedendo l'ingresso di particelle, anche quando le valve sono leggermente aperte. Una tendenza evolutiva, inoltre, ha portato il margine destro e il margine sinistro del mantello a crescere insieme lungo la linea mediana, in maniera che il mantello si saldasse in punti in cui non sono necessarie aperture.

1.4.6- Sifoni

La fusione di pliche contrapposte del mantello in prossimità dell'apertura inalante ed esalante creano aperture permanenti ben definite, note come sifoni inalante ed esalante (Fig. 6). Il sifone inalante è ventrale, quello esalante è dorsale. I margini del mantello che circondano le aperture possono essere allungate per formare strutture tubolari di varia lunghezza. I sifoni sono estesi in seguito alla pressione sanguigna o alla pressione dell'acqua all'interno della cavità del mantello, quando le valve sono chiuse.



Fig. 6: *S. plana* con i sifoni completamente estesi. Fonte: <http://www.arkive.org/peppery-furrow-shell/scrobicularia-plana/>

1.4.7- Riproduzione

Questi bivalvi sono prevalentemente gonocorici e la fecondazione avviene quasi sempre esternamente. Le gonadi sono pari e si espandono per circondare le anse intestinali della massa viscerale. Le due gonadi sono in genere tanto

ravvicinate l'una all'altra da non poter essere distinte. In questi animali gonocorici, in cui non avviene la copula, non c'è ragione che i gonodotti siano più di semplici vie di transito per i gameti e il sistema riproduttore è semplice.

1.4.8- Sviluppo

In questi organismi, i gameti sono dispersi nell'ambiente circostante con la corrente esalante.

La segmentazione è spirale; nella blastula si forma la tipica croce del mollusco. Dalla gastrula si sviluppa una trocofora liberamente natante seguita dal veliger, tipico dei bivalvi. Il veliger, dotato di simmetria bilaterale, è racchiuso in due valve, possiede un velum ciliato, piede, intestino, abbozzo branchiale e due muscoli adduttori, e sembra un bivalve in miniatura.

Questi veliger sono detti planctotrofici (che assumono cibo), a vita prolungata, in grado di disperdersi per lunghe distanze.

La metamorfosi è caratterizzata da un subitaneo distacco del velum. L'insediamento può richiedere un periodo prolungato di esplorazione del substrato e la metamorfosi può essere procrastinata fino a quando non si trovi un habitat accettabile.

1.5- Area di studio

Lo studio è stato effettuato lungo il Rio San Pedro (Spagna sud-occidentale). Scelto per la sua posizione strategica nella baia di Cadice localizzato all'interno di un'area protetta del parco naturale della baia di Cadice, era un affluente del rio Guadalete, ma fu artificialmente bloccato 12 km dalla foce. Quindi, il rio San Pedro odierno è un braccio di mare della lunghezza di 12 km e una larghezza che va dai 45 ai 60 m e una massima profondità che va dai 3 ai 5m. L'unico suo input di acqua deriva dalle maree dalla baia di Cadice caratterizzate da un regime semi-diurno con altezza di marea che va dai 3,5 m durante le maree di sigiziali (spring tides) ai 0,5 m durante le maree di quadratura (neap tides) rendendo il rinnovamento dell'acqua nella parte alta (dove sono situate le strutture di acquacoltura) molto scarso.

In precedenti studi è stato suddiviso il rio San Pedro in due zone in accordo con la qualità dell'acqua (Tovar et al., 2000a). la prima, con una lunghezza di circa 8 km, vicino alla foce. In questa zona, non ci sono allevamenti di pesci ed è caratterizzata da un buon riciclo di acqua dalla Baia. Come conseguenza, questa parte non è impattata dall'acquacoltura, e la composizione chimica dell'acqua è molto simile a quella della Baia. Nella seconda sezione, lunga circa 4 km, sono localizzate 3 allevamenti di pesci: Fish farm A dedicata a coltura intensa di orate (*Sparus aurata*), Fish farm B dedicato all'allevamento di molluschi (*Crassostrea giga*), Fish farm C è un istituto pubblico di ricerca pubblico sull'acquacoltura (Fig. 7).

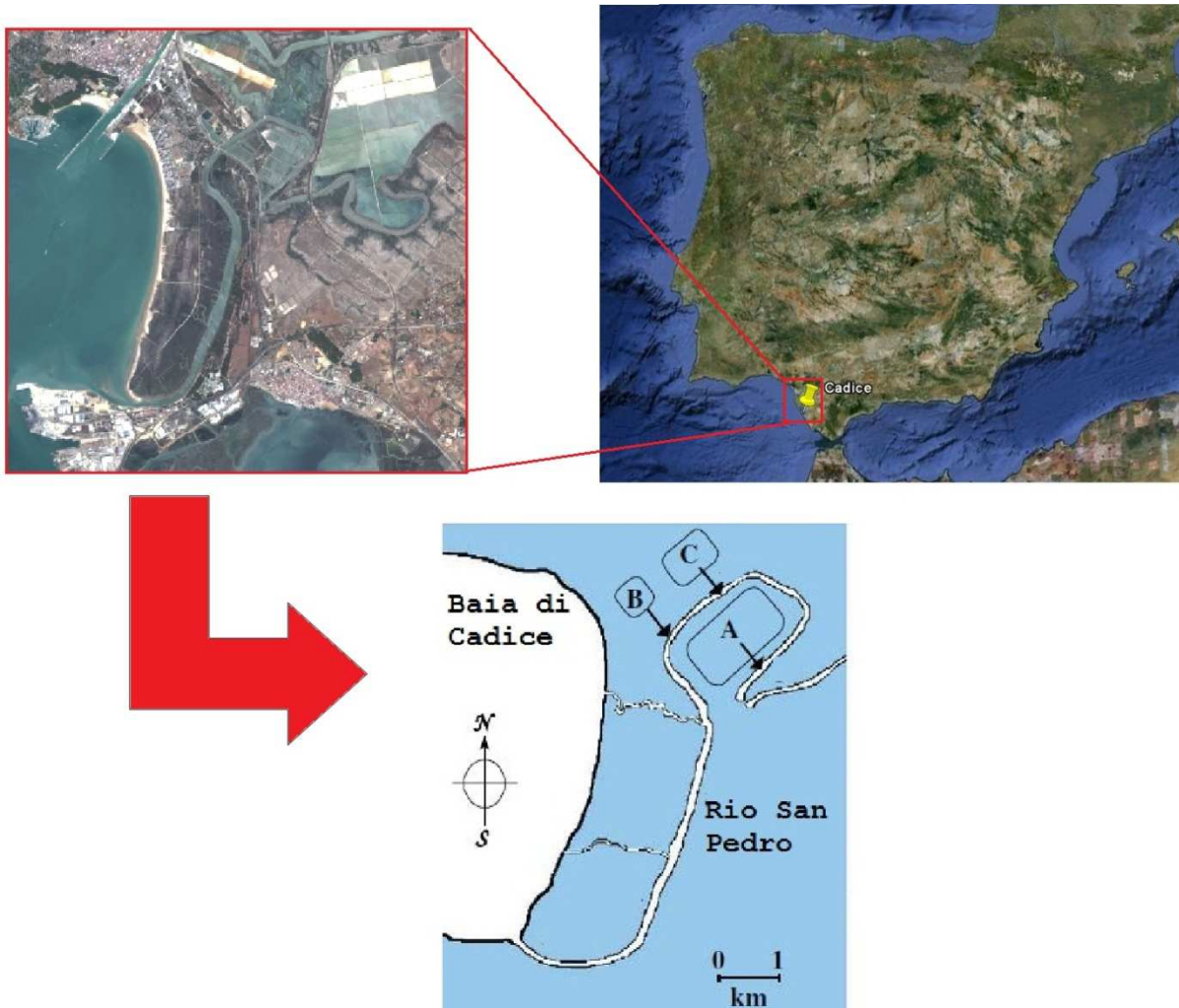


Fig. 7: Collocazione spaziale della Baia di Cadice e delle tre fish farm che svolgono le loro attività a ridosso del Rio San Pedro (A, B, C). Fonte: Tovar et al., 2000

Nonostante tre strutture utilizzino l'acqua del rio San Pedro per le loro attività quella presa in considerazione in tutti i lavori è la struttura dedicata all'allevamento delle orate di proprietà della CUPIMAR, S.A. (Fish farm A), grande a sufficienza da essere utilizzata per stabilire le relazioni che intercorrono tra le attività di acquacoltura e la qualità dell'acqua del fiume. Lo stabilimento copre all'incirca un'area di $1,2 \cdot 10^6 \text{ m}^2$, e supporta una coltivazione attorno ai 10^6 kg yr^{-1} di orate. L'allevamento è diviso in due aree differenti. Nella prima (Zona I) i pesci sono coltivati con un regime estensivo o semi-intensivo. La seconda area (Zona II)

consiste di quattro batterie di bacini poco profondi, una volta utilizzati come saline e poi riadattate per gli scopi di acquacoltura (earthen ponds), dove le orate vengono coltivate con un regime intensivo. La bassa profondità dei laghetti, insieme all'alto carico di materia organica dovuta all'allevamento dei pesci, si ritiene sviluppi un intenso metabolismo bentonico. L'acqua di mare utilizzata nei processi di coltura è introdotta nell'allevamento da due stazioni di pompaggio. L'acqua introdotta dalla stazione P1 passa attraverso la Zona I prima di alimentare la metà inferiore della zona di coltivazione intensiva (Zona II). L'acqua pompata dalla stazione P2 va direttamente nella metà superiore della Zona II. Entrambi gli affluenti vengono scaricati nel fiume attraverso un singolo canale (E) (Fig. 8).

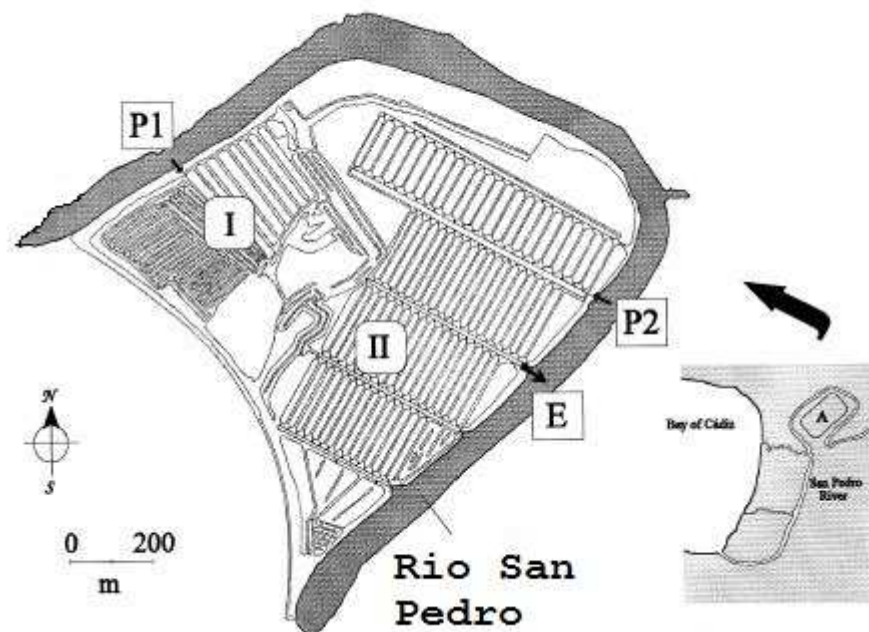


Fig. 8: Schema esemplificativo della Fish farm A (presa in esame in questo studio), P1 e P2 sono le due stazioni di pompaggio con la quale viene introdotta l'acqua di mare nella Fish farm, E è il canale di scarico delle acque, la Zona I è la zona di coltura semi-intensiva o estensiva, mentre la Zona II, di coltivazione a regime intensivo. Fonte: Tovar et al., 2000

Il volume totale giornaliero di acqua introdotto nell'allevamento dal rio San Pedro va da 181151 m³ a 287795 m³. All'uscita del canale, la quantità del flusso è stata controllata manipolando l'apertura della porta artificiale usata per rinnovare il volume totale dell'acqua dell'allevamento una volta al giorno. Il volume totale dell'acqua in uscita, arricchita con i prodotti metabolici derivanti dai processi diagenetici della materia organica, è stimata come la somma del volume totale degli affluenti più, quando necessario, il contributo della pioggia.

Come conseguenza, la concentrazione di nutrienti e solidi sospesi nel braccio di mare è relativamente alta. Tovar et al. (2000) stimarono il contenuto totale dei nutrienti disciolti, dei solidi totali sospesi (TSS), materia organica particolata (POM) e domanda biochimica di ossigeno (BOD₅) che l'allevamento scarica nelle acque riceventi per ogni tonnellata di pesce prodotto. In accordo con questo, annualmente vengono scaricati nell'ambiente 9.1·10⁶ kg TSS, 8.4·10⁵ kg POM, 2.4·10⁵ kg BOD, 36·10³ kg N-NH₄⁺, 5.0·10³ kg N-NO₂⁻, 6.7·10³ kg N-NO₃ e 2.6·10³ kg P-PO₄³⁻. In aggiunta De la Paz et al. (2008b) osservarono un forte gradiente di concentrazione di carbonio inorganico disciolto tra il braccio di mare e la Baia di Cadice e lo relazionarono agli input degli allevamenti di pesce. Trovarono che la concentrazione di Chl-a, che varia da 1 a 14 µg l⁻¹, aumentava durante le maree di quadratura a causa di un miglioramento della crescita fitoplanctonica con un maggior tempo di residenza dell'acqua all'interno del braccio di mare. Comunque sia, l'attività della produzione primaria sembra non essere uniforme e dipende dal bilancio tra nutrienti e torbidità, che cambia con i movimenti delle maree. Generalmente però, osservarono una forte stagionalità nel carbonio organico disciolto, pH e concentrazione di ossigeno disciolto, associato ad un aumento del tasso metabolico dovuto alla temperatura, l'alternanza a eventi temporaleschi e alta

evaporazione e la variabilità stagionale degli scarichi dall'allevamento di pesci

Un altro aspetto molto importante di questo braccio di mare è che non sono presenti altre attività antropiche oltre all'acquacoltura.

Di conseguenza, gli unici input di questo sistema sono: effluenti dell'acquacoltura, il rinnovamento dell'acqua dalla Baia e la pioggia, e quindi nessun'altra alterazione antropica deve essere relazionata con l'acquacoltura. Di conseguenza, il sito diventa un laboratorio naturale ideale per studiare l'effetto ambientale dell'acquacoltura marina e quindi stabilire correlazioni dirette tra acquacoltura e inquinamento della zona.

1.6- Biomarker

I composti chimici nell'ambiente influenzano i livelli di enzimi e l'attività in molti modi. Anche se un'attività alterata degli enzimi può dare un'indicazione generale degli effetti di uno xenobiotico, si cercano marker biochimici che possano dare informazioni più specifiche su una particolare condizione patologica (Wright e Welbourn, 2002).

1.6.1- Monoossigenasi a funzione mista (MFO) e attività enzimatica della etossiresorufina-O-deetilasi (EROD)

Un biomarker tra i più sensibili attualmente a disposizione delle indagini ambientali è l'attività dell'enzima etossiresorufina-O-deetilasi (EROD), e questo è certamente un aspetto peculiare. Si tratta di un'attività citocromo P-450 dipendente, e più precisamente di una monoossigenasi a funzione mista (MFO), materialmente localizzabile a livello

del reticolo endoplasmico liscio delle cellule di molti organi di organismi marini (Stegeman et al., 1992; Bucheli e Fent, 1995). EROD appartiene al grande gruppo delle attività di biotrasformazione, e cioè a quegli enzimi che, all'interno degli organismi viventi, presiedono alla trasformazioni dei composti xenobiotici (ma non solo) in altri composti generalmente più solubili in acqua e pertanto più facilmente escreti. Vi è infine un'ulteriore caratteristica di questo saggio che merita di essere sottolineata, e cioè, che esso è in grado di fornire risultati indipendenti dalle proprietà nutrizionali del sedimento. Questa interazione è verosimilmente responsabile di numerosi falsi negativi, piuttosto difficili da interpretare. La possibilità di utilizzare una monoossigenasi come indicatore di esposizione, recente o in atto, a xenobiotici, e dunque come indicatore di rischio tossicologico, risiede nel fatto che lo stesso xenobiotico induce a livello cellulare la sintesi della monoossigenasi che ne catalizza la trasformazione. Dal momento che la sintesi è proporzionale alla quantità di xenobiotico presente, misurare, come in questo caso, l'attività EROD equivale ad una stima indiretta della concentrazione di xenobiotico alla quale l'organismo è esposto.

La quantificazione dell'attività dell' EROD è relativamente facile da svolgere e molto sensibile (Stegeman et al., 1988; Stegeman e Lech, 1991; Gorbi et al., 2005).

L'uso delle attività di biotrasformazione in indagini ambientali è stato validato in moltissimi studi condotti soprattutto nell'ultimo decennio e prevalentemente sulla fauna ittica. Diversi di questi studi sono stati condotti in campo, e hanno confrontato l'attività monoossigenasica epatica in organismi esposti o catturati in aree a contaminazione nota (o sospetta) con quella di esemplari a loro volta esposti o residenti in aree non inquinate, riscontrando, nei primi, livelli di attività generalmente superiori (Lindstrom-Seppa e Oikari, 1989; De Flora et al., 1993; Viganò et al., 1998a;

Kirby et al., 1999). Molti studi sono stati condotti anche in laboratorio, utilizzando in varie combinazioni, sia singoli xenobiotici che loro miscele, come pure acque superficiali, effluenti di scarico ed anche sedimenti (Melancon et al., 1989; Holm et al., 1993; Viganò et al., 1995; Parrot et al., 1995; Viganò et al., 1998b). Nella larga maggioranza dei casi, è stato possibile osservare un incremento dose-dipendente, e nello specifico dell'attività EROD è stato documentato come essa venga indotta da inquinanti che dal punto di vista ambientale sono tra i più temibili. I composti aromatici polinucleari (PAH), i bifenili policlorurati (PCB) e polibromati (PBB), i naftaleni policlorurati (PCN), le diossine (PCDD), i furani (PCDF), sono alcuni esempi di tali tipi di inquinanti.

1.6.2- Dibenzilfluoresceina (DBF)

Similarmente alla EROD, per misurare l'attività delle monoossigenasi a funzione mista si può utilizzare come substrato la dibenzilfluoresceina.

1.6.3- Glutathione S-transferasi (GST)

La coniugazione di composti elettrofili (metaboliti della Fase I) con il GSH è catalizzata dalla glutathione S-transferasi (GST), una famiglia multigenica di enzimi dimerici e multifunzionali. A parte la loro funzione essenziale nel trasporto intracellulare (sangue, bilirubina e acidi bilici), un importantissimo ruolo della GST è la difesa contro danni ossidativi e prodotti della perossidazione del DNA e dei lipidi (George, 1994).

La differente suscettibilità a composti chimici cancerogeni delle differenti specie di pesci e molluschi potrebbe essere modulata dall'attività del GST (Varanasi et al., 1987).

1.6.4- Glutathione perossidasi (GPX)

Le perossidasi (POXs) sono enzimi che riducono la varietà di perossidi ai loro corrispettivi alcoli. La principale perossidasi in pesci e molluschi è un enzima citosolico tetramerico selenio-dipendente che usa il GSH come cofattore. La GPX catalizza il metabolismo dell' H_2O_2 in acqua, inducendo una concomitante ossidazione del GSH ridotto alla sua forma ossidata (GSSG). Si ritiene che la GPX giochi un ruolo molto importante nel proteggere le membrane dai danni causati dalla per ossidazione lipidica. Questa osservazione porta alla considerazione che la maggior funzione detossificante della GPX sia la terminazione della propagazione delle catene radicali tramite la riduzione della produzione di ulteriori radicali (Lauterburg et al., 1983).

1.6.5- Glutathione reduttasi (GR)

Nonostante forse non coinvolto nella difesa da antiossidanti nello stesso modo come gli enzimi descritti precedentemente, la GR merita attenzione per la sua importanza nel mantenere GSH/GSSG in omeostasi in condizioni di stress ossidativo (Winston e Di Giulio, 1991). La GR catalizza la trasformazione della forma ossidata del bisolfuro del glutathione (GSSG) alla sua forma ridotta (GSH), con la concomitante ossidazione del NADPH a $NADP^+$. L'attività del GR può essere misurata allo spettrofotometro seguendo la diminuzione dei livelli di NADPH (Worthington e Rosemeyer, 1974).

1.6.6- Perossidazione lipidica (LPO)

È un prodotto di reazione dell'ossigeno molecolare che può reagire con macromolecole cellulari critiche, con possibili relazioni all'inattivazione degli enzimi (Wright e Welbourn, 2002). L'ossidazione di acidi grassi poliinsaturi è un'importante conseguenza dello stress ossidativo. Il processo della LPO si svolge in una catena di reazioni e, come nel caso del ciclo redox, dimostra l'abilità di una singola specie di radicali di propagare un gran numero di reazioni biochimiche dannose (van der Oost, et al., 2003).

1.6.7- Danno al DNA

Gli inquinanti marini producono conseguenze multiple a livello di organismo, popolazione ed ecosistema influenzando le funzioni degli organi, fitness riproduttiva, sopravvivenza della specie, dimensione della popolazione e biodiversità. Fra questi, i composti cancerogeni sono di particolare interesse, infatti sono stati descritti in pesci e bivalvi alcuni tipi di tumore (Mix, 1986; Malins et al., 1988; Bolognesi, 1990; Gopal and Pathak, 1993). Recentemente, le preoccupazioni riguardo ai composti organici persistenti (POPs) sono state convalidate (Siu et al., 2004).

I POPs non provocano solo un effetto tossico generale, ma sono conosciuti anche per essere genotossici ad esempio possono alterare l'integrità della struttura del DNA, sia direttamente che attraverso i loro metaboliti (Shugart, 1995). I composti genotossici come i POPs possono causare mutagenesi (Siu et al., 2004). Si deve notare che l'effetto cronico dei POPs può essere studiato più appropriatamente usando mitili selvatici, nei cui tessuti questi inquinanti persistenti possono accumularsi ed agire per anni. In questo caso gli inquinanti

possono influenzare la fisiologia dell'organismo nel lungo termine.

Alterazioni del DNA indotte da agenti fisici e chimici includono rotture singole o doppie dell'elica, modificazione delle basi, collegamenti DNA-DNA e collegamenti DNA-proteine. Le rotture dei filamenti della doppia elica possono essere indotte indirettamente da un'interazione con radicali dell'ossigeno, o come conseguenza di processi di apoptosi o necrosi (Eastman e Barry, 1992; Speit e Hartmann, 1995).

1.7- Acquacoltura e GIS

Le mappe sono il metodo tradizionale di immagazzinare e mostrare le informazioni geografiche. Una mappa è una rappresentazione grafica di attributi di differente tipo (numerali, ordinali o nominali) e natura (naturali, artificiali o entrambi) di una parte della superficie terrestre per mezzo di segni e simboli, ad una scala stabilita, in una specifica proiezione e con un'orientazione geografica indicata. Una mappa mostra tre tipi di informazioni sugli attributi geografici:

- Localizzazione georeferenziata ed estensione dell'attributo;
- Caratteristiche dell'attributo;
- Relazioni dell'attributo ad altri attributi.

L'analisi georeferenziata è un tool particolarmente adatto alle esigenze di analisi bidimensionale e distribuita tipica dell'acquacoltura, anche in ottica di facile ed immediata

comprensione per il personale tecnico e per stakeholders non specializzati.

Un GIS è un sistema informativo computerizzato che permette l'acquisizione, la registrazione, l'analisi, la visualizzazione e la restituzione di informazioni derivanti da dati geografici (geo-riferiti). Secondo la definizione di Burrough (1986) "il GIS è composto da una serie di strumenti software per acquisire, memorizzare, estrarre, trasformare e visualizzare dati spaziali dal mondo reale". Trattasi quindi di un sistema informatico in grado di produrre, gestire e analizzare dati spaziali associando a ciascun elemento geografico una o più descrizioni alfanumeriche.

La creazione di un GIS necessita quindi in fase preliminare dell'acquisizione di dati geografici che possono derivare da differenti fonti: cartografia, foto aeree, immagini da satellite, indagini dirette. Ai dati geografici è poi possibile relazionare sia le coordinate sia identificano la loro posizione sul territorio (Dati spaziali), che attributi descrittivi di ogni tipo (Dati aspatiali). La particolarità che contraddistingue però un GIS dalle precedenti tipologie di sistemi (es. CAD, DBMS) è la capacità di integrare i dati georeferenziati attraverso strumenti di analisi quali: la selezione e la ricerca spaziale, la sovrapposizione di livelli informativi (map overlay), la generazione di modelli digitali (DTM), la creazione di tabelle di attributi (un database relazionale interrogabile mediante SQL, Structered Query Language). In questo studio è stato utilizzato ArcGIS 9.3[®] di ESRI[®].

1.8- Scopi della ricerca

Il lavoro presentato in questa tesi è stato condotto con le seguenti finalità:

- ✓ Sviluppare una batteria di biomarker per caratterizzare e valutare nel tempo e nello spazio la biodisponibilità e l'effetto di contaminanti rappresentati dai residui della piscicoltura.
- ✓ Caratterizzare la fitness degli organismi sentinella *Scrobicularia plana* tramite l'indice gonadosomatico (GSI) ed epatosomatico (HSI).
- ✓ Analizzare alcuni parametri abiotici del Rio San Pedro per una prima valutazione e caratterizzazione della qualità delle acque.

2.- Materiali e metodi

2.1- Il campionamento

2.1.1- Punti di campionamento

Il campionamento è stato effettuato dal 28/09/10 al 22/10/10 date e orari concomitanti al livello di bassa marea così da semplificare le operazioni di prelievo degli organismi in situ.

I punti di campionamento (mostrati in figura) sono stati scelti nel seguente modo:

- Punti 1 e 2: si è cercato di campionare questi due punti rispettivamente circa cento metri prima e dopo il punto di scarico delle acque dell'acquacoltura. Questo al fine di non essere sottoposti allo stress idrogeologico che uno scarico di questo tipo produce, ma nel contempo essere sufficientemente vicini alla possibile fonte di inquinamento.
- Punto 3: questo punto è stato scelto in quanto posto fra le due zone in cui virtualmente viene diviso il fiume (Tovar et al., 2000a) a causa di differenze sostanziali nella chimica dell'acqua.
- Punto 4: in questa zona il ricambio d'acqua comincia a diventare importante, e si suppone quindi che la qualità dell'acqua cominci a migliorare sostanzialmente
- Punto 5: è il nostro punto di controllo molto vicino alla "foce" di questo braccio di mare e la cui acqua possiede sostanzialmente le stesse caratteristiche chimico/fisiche dell'acqua della baia.

Una volta arrivati sul campo si è cercata la zona più idonea al campionamento tenuti in considerazione alcuni aspetti pratici quali l'accessibilità alle rive del fiume e la vicinanza di una strada dove parcheggiare il veicolo nel quale verranno poi portati i campioni (Fig. 9).



Fig. 9: Immagine della zona di campionamento con evidenziati i punti di campionamento da 1 a 5 (5 punto di controllo), il punto di scarico delle acque residuali e contornata di giallo la Fish farm A

Risolti questi problemi logistici, per prima cosa si sono determinate e trascritte le coordinate geografiche del punto di campionamento col GPS, poi si è effettuato il campionamento degli organismi per le analisi di laboratorio e infine si sono raccolti alcuni dati fisico-chimici dell'acqua superficiale e interstiziale.

2.1.2- Il campionamento degli organismi

Per ogni punto di campionamento si sono raccolti all'incirca 30 organismi per ottenere un buon rapporto benefici/costo (in quanto la raccolta di più organismi ci avrebbe permesso di effettuare più repliche ma il costo in termini di tempo per il loro dissezionamento e analisi risultava eccessivo, come così la raccolta di meno organismi non ci avrebbe permesso di effettuare abbastanza repliche per un lavoro statisticamente accettabile); gli organismi sono stati prelevati in 3 zone diverse del punto di campionamento per ridurre al minimo la variabilità ambientale.

Gli organismi sono stati poi puliti dal fango con acqua del rio San Pedro e posti in casse di plastica sopra un panno inumidito per il trasporto nei laboratori del CASEM (Centro Andaluz Superior de Estudios Marinos) a Puerto Real dove sono stati posti in acquario per circa due ore con acqua di mare sintetica per depurarli di modo che le analisi di laboratorio fossero influenzate il meno possibile dal contenuto stomacale (cibo e sedimento). Successivamente si sono congelati gli organismi a -20°C interi in buste di plastica etichettate.

2.1.3- Il campionamento dell'acqua superficiale

Il campionamento dell'acqua superficiale è stato svolto nel punto più vicino a dove sono state raccolti gli organismi, si sono utilizzate quattro sonde differenti. Per effettuare le misure si è raccolto un campione di acqua in un contenitore di vetro e si è proceduto nel seguente ordine:

1. ossigeno disciolto (per primo in quanto il suo valore può variare sensibilmente con il campione sposto all'aria aperta);
2. temperatura (in quanto data la temperatura esterna e il modesto quantitativo di campione la misura poteva variare sensibilmente);
3. pH;
4. Salinità.

2.1.4- Il campionamento dell'acqua interstiziale

Il campionamento dell'acqua interstiziale è stato svolto effettuando un buco nel fango di qualche decina di centimetri, in un punto molto vicino a dove sono stati raccolti gli organismi. Si è aspettato che il buco si riempisse di acqua proveniente dal resto del terreno avendo cura che l'acqua che era sulla superficie del suolo non entrasse nel buco. A questo si è proceduto con la raccolta di un campione di acqua in un contenitore di vetro e si è proceduto nel seguente ordine:

1. ossigeno disciolto (per primo in quanto il suo valore può variare sensibilmente con il campione esposto all'aria aperta);
2. potenziale redox (per evitare che il campione variesse il suo valore nell'esposizione all'aria aperta)

3. temperatura (in quanto data la temperatura esterna e il modesto quantitativo di campione la misura poteva variare sensibilmente);
4. pH;
5. salinità.

2.1.5- Preparazione degli organismi per le analisi

per prima cosa abbiamo riempito di acqua le buste di plastica dove avevamo congelato gli organismi per fare in modo che non si scongelassero troppo rapidamente e i tessuti non si degradassero. Una volta scongelati si è proceduto alla dissezione degli organismi con la separazione di gonadi, branchie e ghiandola digestiva. Per ogni punto di campionamento e zona abbiamo fatto dei pool di tre dei tessuti dissezionati per diminuire la variabilità individuale degli organismi. Questi pool sono stati poi messi in eppendorf adeguatamente etichettate e conservate a -20°C.

2.1.6- Preparazione omogenato

Per fare l'omogenato, abbiamo unito 2 pool di ghiandole digestive dato il loro basso peso. In seguito è stata effettuata una diluizione 1:3 con buffer di omogeneizzazione (per ogni grammo di tessuto 3ml di buffer) posto tutto in una falcon da 50ml e omogenato con ULTRA-TURRAX IKA T25 ad una velocità di 21/min*1000 per 30 secondi.

Dall'omogenato così ottenuto abbiamo prelevato una piccola parte per effettuare alcuni biomarker, aliquotato in eppendorf da 1ml, etichettato e posto a -80°C (Tab. 1). Il restante omogenato è stato centrifugato a 15000g per 20 min a 2°C (S15). Al termine della centrifugata si è prelevato il sovrinatante (SN) e si è aliquotato in eppendorf da 1ml in

quantità necessarie ad effettuare le analisi di ciascun biomarker in duplicato (Tab. 2). Tutte le aliquote sono state poi etichettate e poste a -80°C.

S15	Biomarker	Volume min S15 (μl)	Diluizione tessuti
	EROD	50 μ L X 2	1:3
	GST	50 μ L X 2	1:3
	DBF	50 μ L X 2	1:3
	GPX	20 μ L X 2	1:3
	GR	15 μ L X 2	1:3
	Proteine totali	10 μ L X 2	1:3

Tab. 1: in questa tabella si sono riuniti i biomarker da svolgere sul centrifugato di omogenato di campione, si è specificato inoltre la diluizione con la quale si sono omogenati e il volume minimo di sovrantante da ottenere per poter svolgere il relativo biomarker, in duplicato

Biomarker	Volume min omogenato (μl)	Diluizione tessuti
Danno al DNA	25 μ L X 2	1:3
LPO	150 X 2	1:3
Proteine totali	10 μ L X 2	1:3

Tab. 2: in questa tabella si sono riuniti i biomarker da svolgere sull'omogenato di campione, si è specificato inoltre la diluizione con la quale si sono omogenati e il volume minimo di omogenato da ottenere per poter svolgere il relativo biomarker, in duplicato

2.2- Analisi biomarker

2.2.1- Determinazione delle proteine totali (PT)

Per la determinazione delle proteine totali si è utilizzato il protocollo di Bradford. L'attività è stata determinata con lo spettrofotometro Infinite 200 PRO Multimode Microplate Reader from Tecan AG a 595nm.

2.2.2- Attività della etossiresorufina-O-deetilasi (EROD)

L'attività del sistema enzimatico monoossigenasi a funzione mista (MFO) e più nello specifico del citocromo CYP1A, è stata misurata usando il protocollo Gagnè e Blaise (1993) adattato da Martin-Diaz et al. (2007). In una micropiastra scura (da 96 pozzetti a fondo piano), si sono aggiunti 50µl di sovrantante in duplicato e 160µl di 7-etossiresorufina (50µM). La determinazione di 7-ethoxyresorufin nei campioni è stata portata avanti usando una curva di calibrazione di standard di Resorufin (5µM) a concentrazioni 0; 0.01; 0.025; 0.05 e 0.1µMol. Si è fatta partire la reazione con l'aggiunta di 10 µl di NADPH 1mM. La produzione di resorufin è stata determinata attraverso fluorimetria a 0, 15, 30, 45 e 60min in un fluorimetro Infinite 200 PRO Multimode Microplate Reader from Tecan AG ad una banda di eccitazione di 516nm e una banda di emissione di 600nm. I risultati sono espressi in pmol/min*mgPT.

2.2.3- Attività della Dibenzilfluoresceina (DBF)

L'attività della DBF è stata misurata utilizzando lo stesso metodo sopradescritto per l'EROD ma utilizzando la dibenzilfluoresceina come substrato e la fluoresceina per la curva degli standard.

La produzione di fluoresceina è stata determinata attraverso fluorimetria a 0, 15, 30, 45 e 60min in un fluorimetro Infinite 200 PRO Multimode Microplate Reader from Tecan AG ad una banda di eccitazione di 485nm e una banda di emissione di 516nm. I risultati sono espressi in $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mgPT}$.

2.2.4- Attività dalla Glutathione S-transferasi (GST)

L'attività del GST è stata determinate usando il protocollo McFarland et al. (1999) adattato da Martin-Diaz et al. (2007). La soluzione tampone contenente GSH (buffer GSH) è stato preparato aggiungendo a 400ml di acqua distillata, 0.01g di 1-cloro-2,4-dinitrobenzene 1mM, 0.015g di GSH 1mM, 0.37g di NaCl 125mM e 0.12g di HEPES 10mM. È stato portata questa soluzione ad un volume di 500ml e ad un pH di 6.5, in seguito viene conservata a 4°C.

In un micro piastra trasparente (da 96 pozzetti a fondo piano) si è proceduto all'aggiunta di 50 μl di sovrinatante in duplicato e a 200 μl di buffer GSH. L'attività della GST è stata misurata in uno spettrofotometro Infinite 200 PRO Multimode Microplate Reader from Tecan AG. L'assorbanza è stata ottenuta ad una lunghezza d'onda di 340nm ogni 5min per 30 min. i risultati sono espressi in $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mgPT}$.

2.2.5- Attività della glutathione perossidasi (GPX)

La metodologia utilizzata per la determinazione di questa attività è quella di McFarland et al. (1999) adattata da Martin-Diaz et al. (2007).

L'attività della GPX è stata misurata con lo spettrofotometro Infinite 200 PRO Multimode Microplate Reader from Tecan AG a 340nm ogni 10s per 3min a 30°C usando come substrato cumene idroperossido (1mM). Il calo nell'assorbanza del NADPH misurata a 340nm durante l'ossidazione del NADPH a NADP, è indicativo dell'attività del GPX. I risultati sono espressi in nmol/min*mgPT.

2.2.6- Attività della Glutathione reduttasi (GR)

L'attività del GR è stata determinata usando il protocollo McFarland et al. (1999) adattato da Martin-Diaz et al. (2007).

La miscela di reazione contiene come substrato glutathione ossidato (10mM). L'attività è stata determinata con lo spettrofotometro Infinite 200 PRO Multimode Microplate Reader from Tecan AG a 340nm ogni 2min per 10min a 30°C.

Il calo nell'assorbanza del NADPH misurata a 340nm durante l'ossidazione del NADPH a NADP, è indicativo dell'attività del GR. I risultati sono espressi in nmol/min*mgPT.

2.2.7- Perossidazione lipidica (LPO)

Lo stress ossidativo può derivare dai perossisomi che danneggiano direttamente cellule e tessuti, o formare i propri prodotti più reattivi.

La metodologia di Wills (1987) adattata da Martin-Diaz et al. (2007) dà una misura fluorimetrica che fornisce un buon indice di perossidazione lipidica. La soluzione standard di

tetrametossipropano (TMP) allo 0.0001% è stata preparata e conservata in eppendorf da 1.5ml. in altre eppendorf si sono aggiunti 75µl di campione, 75µl di acqua milliQ, 300µl di acido tricloroacetico (TCA) al 10%, 1mM FeSO₄, 150µl di acido tiobarbiturico (TBA) al 0.67% e incubate in un Unitronic 320 OR P Selecta Heater ® a 70°C per 10min. In seguito sono stati aggiunti 200µl di soluzione standard ad una micropiastra scura (da 96 pozzetti a fondo piano) e 200µl di campione così preparato. Si è misurata la fluorescenza in un fluorimetro Infinite 200 PRO Multimode Microplate Reader from Tecan AG ad una banda di eccitazione di 516nm e una banda di emissione di 600nm. I risultati sono espressi in µmol/mgPT.

2.2.8- Danno al DNA

Il danno al DNA è stato valutato tramite il protocollo di Olive (1988), Gagné e Blaise (1995) adattato da Martin-Diaz et al. (2007).

La preparazione dei campioni è avvenuta ponendo 25µl di campione in eppendorf con 200µl di SDS al 2%, 200µl di KCl. Le eppendorf così preparate sono state prima incubate in un bagno a 60°C per 10min poi 30min a 4°C. Al termine di questo si è proceduto alla centrifugazione delle stesse a 8.000g per 5min a 4°C. In una piastra scura (da 96 pozzetti a fondo piano) si sono posti 50µl di sovrantante. La determinazione del danno al DNA di è stata portata avanti usando una curva di calibrazione di standard di sperma di salmone a concentrazioni 0; 0.9; 2.27; 4.55; 9.09; 18.2; 45.55µMol. La reazione è stata fatta partire con l'aggiunta di 150µl di Hoechst (substrato) per ogni pozzetto.

Si è misurata la fluorescenza in un fluorimetro Infinite 200 PRO Multimode Microplate Reader from Tecan AG ad una banda di eccitazione di 360nm e una banda di emissione di 450nm. I risultati sono espressi in µg/mgPT.

Analisi statistica

Le risposte dei biomarker sono state analizzate usando il pacchetto di software statistici PASW statistic 17 SPSS inc®. Sono state determinate differenze significative tra i tessuti degli organismi nei punti di esposizione e i tessuti degli organismi nel punto di controllo usando l'ANOVA ad una via seguita da una comparazione multipla con il test di Tuckey e il test di Dunett. Il livello di significatività è stato impostato a $p < 0,05$. Similarmente è stata analizzata la significatività delle differenze dell'indice gonadosomatico ed epatosomatico tra i punti di campionamento esposti e il punto di controllo. In aggiunta è stata analizzata la correlazione di Pearson fra i biomarker e fra i due indici con un livello di significatività impostato a $p < 0,01$ e $p < 0,05$.

2.4- Creazione del GIS

2.4.1 Il GPS

Da oltre dieci anni la tecnologia GPS ha rivoluzionato la gestione faunistica in ogni settore. Il Global Positioning System (GPS), abbreviazione di NAVSTAR GPS, acronimo di NAVigation System Time And Ranging Global Positioning System, è un sistema di posizionamento su base satellitare, a copertura globale e continua, gestito dal dipartimento della difesa statunitense.

Attualmente ci sono 31 satelliti attivi nella costellazione GPS. I satelliti supplementari migliorano la precisione del sistema permettendo misurazioni ridondanti. Al crescere del numero di satelliti, la costellazione è stata modificata secondo uno schema non uniforme che si è dimostrato maggiormente affidabile in caso di guasti contemporanei di più satelliti.

Il principio di funzionamento si basa su un metodo di posizionamento sferico, che consiste nel misurare il tempo impiegato da un segnale radio a percorrere la distanza satellite-ricevitore. Conoscendo il tempo impiegato dal segnale per giungere al ricevitore e l'esatta posizione di almeno 4 satelliti è possibile determinare la posizione nello spazio del ricevitore stesso.

Il GPS applicato allo studio della fauna ha permesso di collegare la dispersione delle popolazioni animali con esattezza, migliorandone la conoscenza delle dinamiche di popolazioni e le conoscenze ecologiche, e permettendo misure di gestione mirate e puntiformi estremamente più efficaci di quanto si potesse immaginare prima che questa tecnologia fosse disponibile.

2.2.2- Acquisizione immagine

Le immagini fornite per questa tesi provengono da un satellite, facente parte di una costellazione di satelliti (DigitalGlobe), innovativo lanciato nell'ottobre del 2009, Worldview-2 acquisisce immagini multispettrali ad 8 bande con risoluzione massima di 1,8 metri, e immagini pancromatiche con risoluzione di 46 centimetri (i fotogrammi vengono commercializzati con la risoluzione di 50 cm nel pancromatico e 2 metri nel multi spettrale RGB).

In particolare WorldView-2 è il primo satellite commerciale ad alta risoluzione in grado di acquisire, accanto alle quattro tipiche bande Blu, Verde, Rosso ed Infrarosso Vicino, quattro ulteriori bande multispettrali, "inedite" su un satellite ad altissima risoluzione:

- la **Coastal Band** (400 - 450 nm), utile per lo studio di aree costiere, grazie alle sue caratteristiche di penetrazione nell'acqua, e ideale per migliorare i risultati nei processi di correzione atmosferica;
- la **Yellow Band** (585 - 625 nm): molto importante per rendere meglio i colori naturali delle immagini e per ottimizzare i processi di classificazione;
- la **Red Edge Band** (705 - 745 nm): fondamentale per l'analisi approfondita delle condizioni di salute della vegetazione;
- la **Near Infrared 2 Band** (860 - 1040 nm): una seconda banda nell'infrarosso vicino, meno influenzata dalle condizioni atmosferiche, estremamente utile a supporto dell'analisi della vegetazione e delle biomasse.

Per questa tesi si è scelto di utilizzare l'immagine a tre bande R (Red 630-690 λ) (Fig. 10), G (Green 510-580 λ) (Fig. 11), B (Blue 450-510) (Fig. 12).



Fig.10: Immagine a banda rossa (R)



Fig. 11: Immagine a banda verde (G)



Fig. 12: Immagine a banda blu (B)

Tramite l'utilizzo di ArcToolbox(in ArcGis) e il comando Composite Bands si è proceduto all'unione delle tre immagini. La differenza tra un'immagine in scala di grigi e un'immagine RGB è il numero dei "canali di colore", un'immagine in scala di grigi ne possiede solo uno; un'immagine RGB ne possiede tre, sovrapposte, ognuna con un filtro colorato rispettivamente di rosso, verde e blu. Dall'unione dei tre canali dell'immagine RGB si ottiene l'immagine con i colori reali percepiti dall'occhio umano (Fig. 13).



Fig. 13: Immagine RGB ottenuta dalla sovrapposizione delle tre bande separate

2.2.3- Georeferenziazione immagine

L'immagine grezza da satellite, ricostruita dalla sovrapposizione delle bande, deve essere in seguito georeferenziata, ossia ogni punto dell'immagine deve essere correttamente messo in relazione ad un punto esatto della superficie terrestre secondo un sistema di coordinate scelto dall'operatore. Tale procedura viene correntemente realizzata mediante un registro di punti di controllo terrestre definito per coordinate conosciute, in modo tale che l'informazione vettoriale che si elabora sull'immagine satellitare mantenga la posizione di coordinate desiderata. A tale scopo si è utilizzato un poligono di vettori georeferenziato della costa di Cadice (Fig. 14).

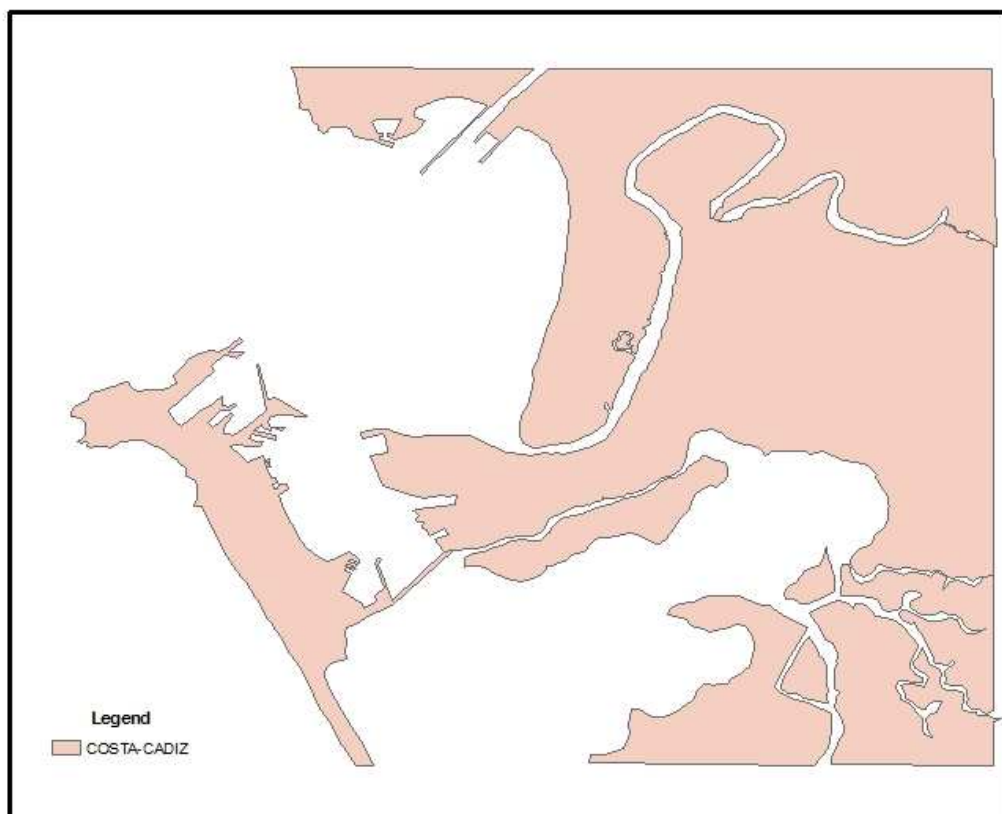


Fig. 14: Immagine del poligono di vettori georeferenziato della costa di Cadice tramite la quale andremo a georeferenziare l'immagine satellitare

A questo punto attraverso punti di controllo riconoscibili in modo univoco si procede quindi a georeferenziare l'immagine, Questa procedura è la più semplice, e si può utilizzare nell'ipotesi di avere a disposizione un layer già referenziato nel sistema di coordinate voluto e che comprenda punti in comuni con l'immagine da referenziare. La procedura di georeferenziazione per punti di controllo è stata eseguita con la funzione "add control points" del menu Georeferencing di ArcGis (Fig. 15).



Fig. 15: inserimento di due punti di controllo, si noti come l'immagine satellitare cominci a sovrapporsi al poligono vettoriale georeferenziato

Una volta georeferenziata (Fig. 16) la nostra immagine satellitare, procediamo ad inserire i punti di campionamento ottenuti con il GPS (Fig. 17).



Fig. 16: Dopo l'inserimento di un numero adeguato di punti di controllo la nostra immagine satellitare presenta un'ottima corrispondenza con il poligono vettoriale della costa di Cadice.

Il dispositivo utilizzato in questo studio è un GPS Garmin eTrex che si serve di un ricevitore a 12 canali paralleli che individuano e seguono costantemente 12 satelliti per calcolare e aggiornare la posizione, presenta un errore di posizionamento inferiore ai 15 metri con velocità a tasso costante pari a 0,05 metri al secondo. La posizione può essere espressa in coordinate geografiche metriche.



Fig. 17: L'immagine satellitare georeferenziata con i punti di campionamento inseriti dai dati raccolti con il GPS Garmin eTrex

3.- Risultati

3.1- Indice gonadosomatico ed epatosomatico

Per avere una prima valutazione dello stato di salute degli organismi si è proceduto ad effettuare il calcolo dell'indice gonadosomatico (GSI) (Fig. 18) ed epatosomatico (HSI) (Fig. 19).

$$GSI = \frac{\text{peso gonadi (g)}}{\text{peso totale dell'organismo(g)}}$$

$$HSI = \frac{\text{peso ghiandola digestiva (g)}}{\text{peso totale dell'organismo(g)}}$$

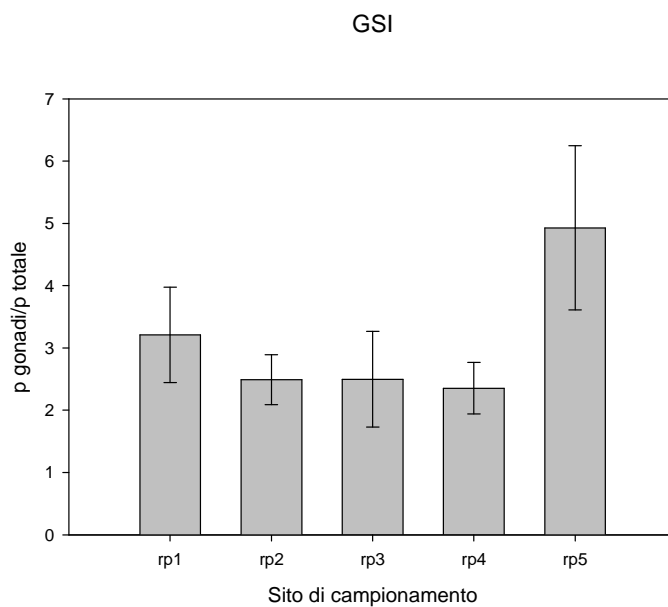


Fig. 18: distribuzione dell'indice gonadosomatico (GSI) tra i punti di campionamento

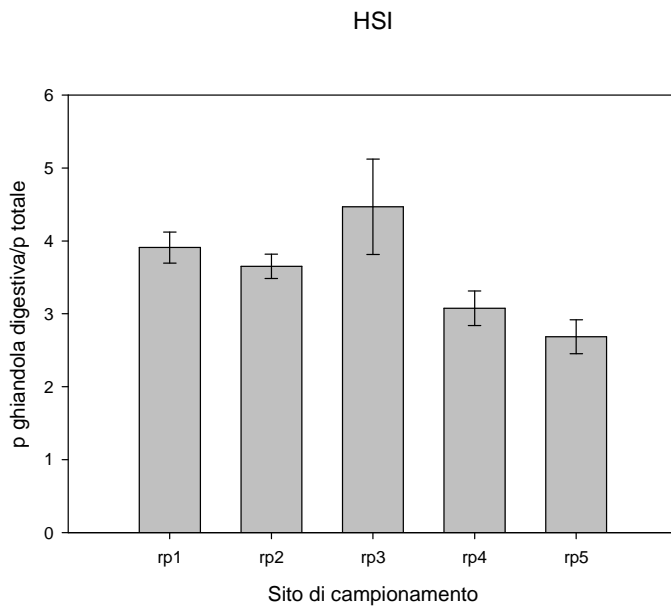


Fig. 19: distribuzione dell'indice epatosomatico (HSI) tra i punti di campionamento

L'ANOVA mostra una differenza significativa ($p < 0,05$) fra i punti di impatto e la zona di controllo per l'indice gonadosomatico mentre per l'indice epatosomatico mostra una differenza significativa ($p < 0,05$) fra i punti 1, 2, 3 e il punto 5 (controllo). Sono state inoltre studiate le correlazioni tra questi due indici e rispetto ai punti di campionamento (Tab. 3). Il test di Pearson mostra una correlazione negativa ($p < 0,05$) fra HSI e punti di campionamento.

Correlazione di Pearson	Sito di campionamento	(HSI)	(GSI)
Sito di campionamento	1		
(HSI)	-,483*	1	
(GSI)	,243	-,189	1

Tab. 3: Correlazione di Pearson tra zona di campionamento, indice gonadosomatico e indice epatosomatico

* La correlazione è significativa allo 0.05 (a 2 code)

** La correlazione + significativa allo 0,01 (a 2 code)

3.2- Risultati biomarker

3.2.1- Attività dell'etossiresorufina-O-deetilasi (EROD)

L'attività dell' etossiresorufina-O-deetilasi nelle ghiandole digestive di *Scrobicularia plana* varia da 0,00066 a 0,0114 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mgPT}$ (Fig. 20). Sono presenti due picchi di attività nelle zone 1 e 4 che presentano una differenza significativa ($p < 0,05$) rispetto al punto 5 (controllo).

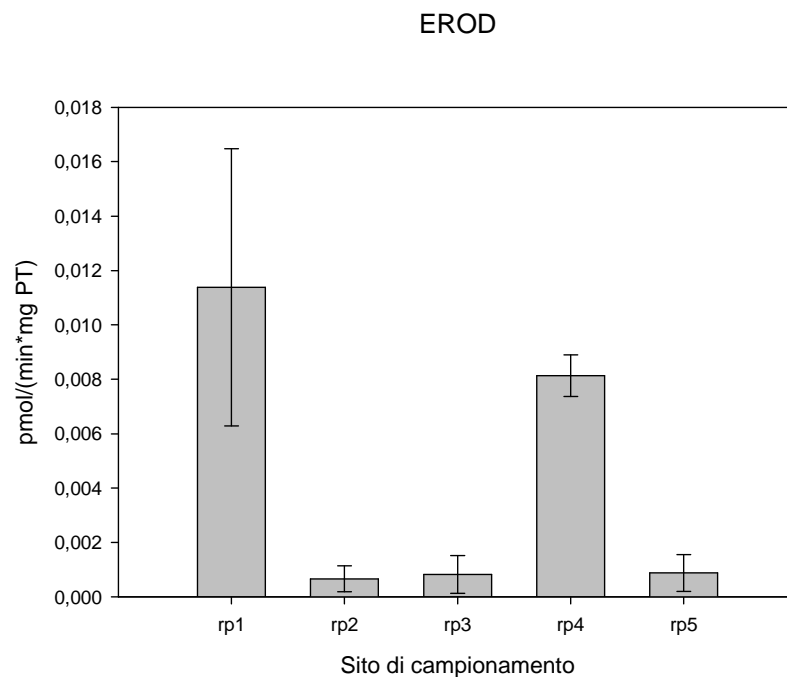


Fig. 20: Attività della EROD nei punti di campionamento. Punti 1 e 4 significativamente differenti ($p < 0,05$) rispetto al punto di controllo (rp5)

3.2.2- Attività della Dibenzilfluoresceina (DBF)

L'attività della Dibenzilfluoresceina nelle ghiandole digestive di *Scrobicularia plana* varia da 0,39 a 0,55 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mgPT}$ (Fig. 21). L'analisi non ha dimostrato differenze significative nell'attività tra le zone di campionamento.

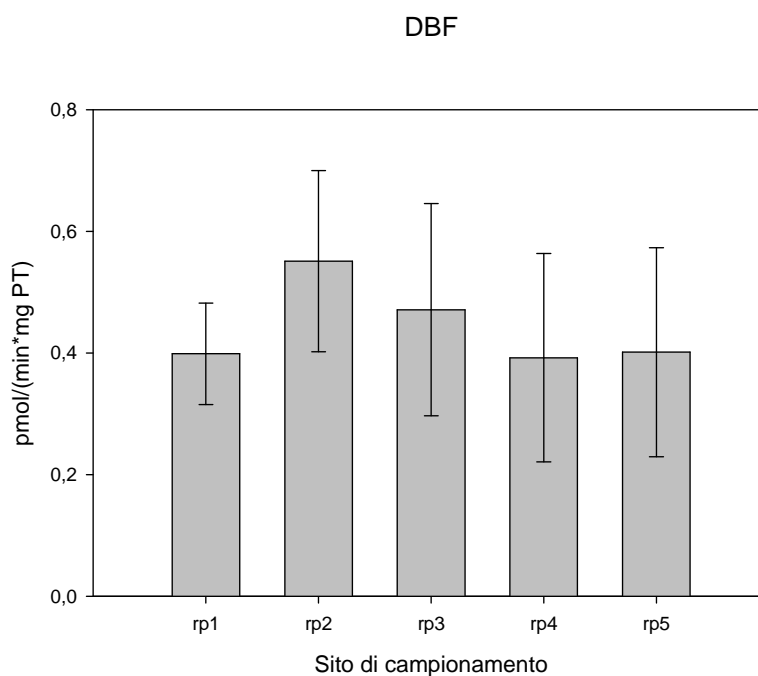


Fig. 21: Attività della DBF nei punti di campionamento. Nessuna differenza significativa riscontrata

3.2.3- Attività della glutatione S-transferasi (GST)

L'attività della Glutatione S-transferasi nelle ghiandole digestive di *Scrobicularia plana* varia da 0,41 a 0,56 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mgPT}$ (Fig. 22). L'analisi non ha dimostrato differenze significative nell'attività tra le zone di campionamento.

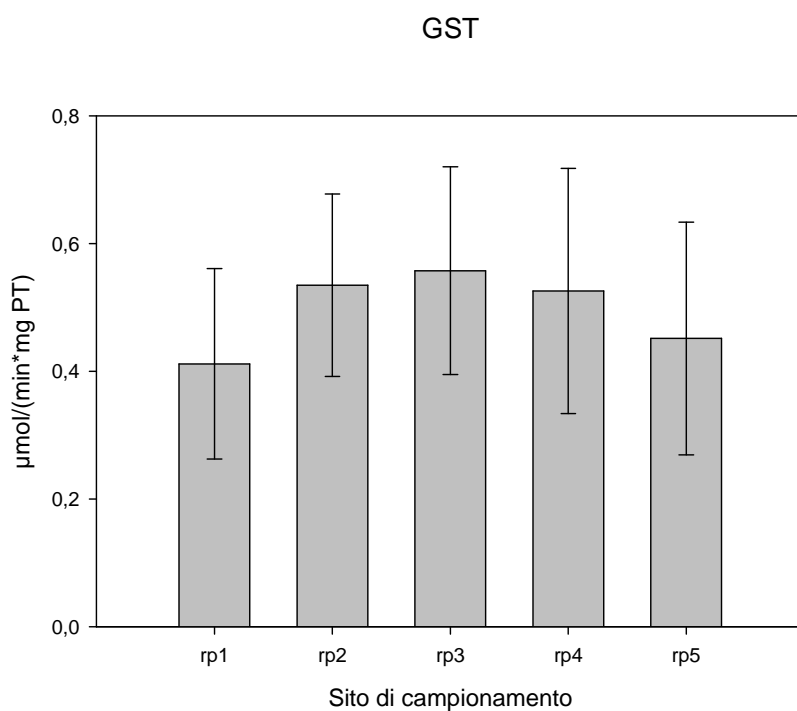


Fig. 22: Attività della GST nei punti di campionamento. Nessuna differenza significativa riscontrata

3.2.4- Attività della glutatione perossidasi (GPX)

L'attività della Glutatione perossidasi nelle ghiandole digestive di *Scrobicularia plana* varia da 0,042 a 0,074 nmol/min*mgPT (Fig. 23) L'analisi non ha dimostrato differenze significative nell'attività tra le zone di campionamento.

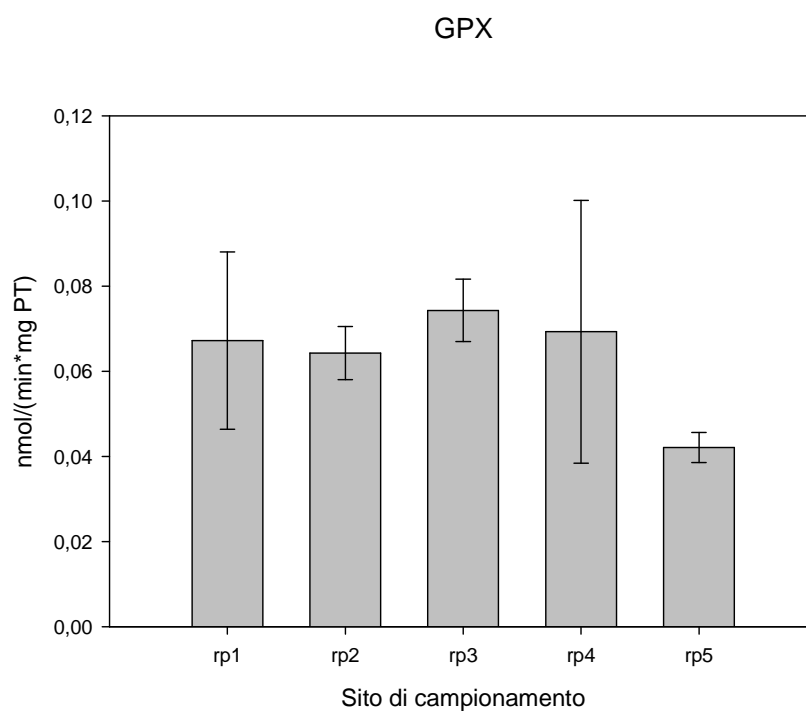


Fig. 23: Attività della GPX nei punti di campionamento. Nessuna differenza significativa riscontrata

3.2.5- Attività della glutatione reduttasi (GR)

L'attività della Glutatione reduttasi nelle ghiandole digestive di *Scrobicularia plana* varia da 0,019 a 0,032 nmol/(min*mg PT) (Fig. 24). È presente un picco di attività nella zona 3 che presenta una differenza significativa ($p < 0,05$) rispetto al punto 5 (controllo).

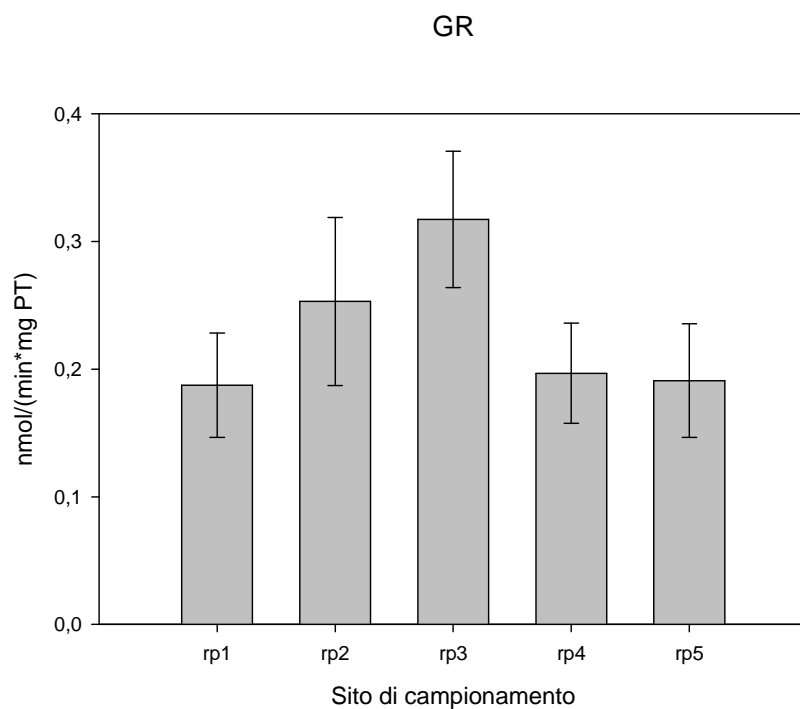


Fig. 24: Attività della GR nei punti di campionamento. Punto 3 significativamente differente ($p < 0,05$) rispetto al punto di controllo (rp5)

3.2.6- Perossidazione lipidica (LPO)

L'attività della perossidazione lipidica nelle ghiandole digestive di *Scrobicularia plana* varia da 0,013 a 0,037 $\mu\text{mol}/\text{mgPT}$ (Fig. 25). Sono presenti tre picchi di attività nelle zone 1, 2 e 4 che presentano una differenza significativa ($p < 0,05$) rispetto al punto 5 (controllo).

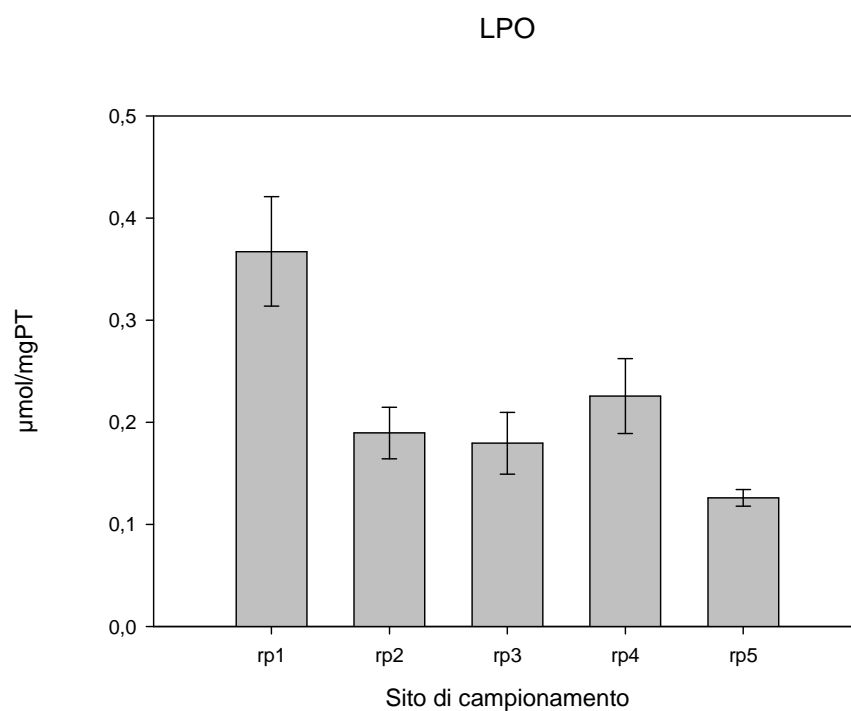


Fig. 25: Attività della LPO nei punti di campionamento. Punti 1, 2 e 4 significativamente differenti ($p < 0,05$) rispetto al punto di controllo (rp5)

3.2.7- Danno al DNA

L'attività del danno al DNA nelle ghiandole digestive di *Scrobicularia plana* varia da 0,16 a 1,33 $\mu\text{g}/\text{mgPT}$ (Fig. 26). È presente un picco di attività nella zona 1 che presenta una differenza significativa ($p < 0,05$) rispetto al punto 5 (controllo).

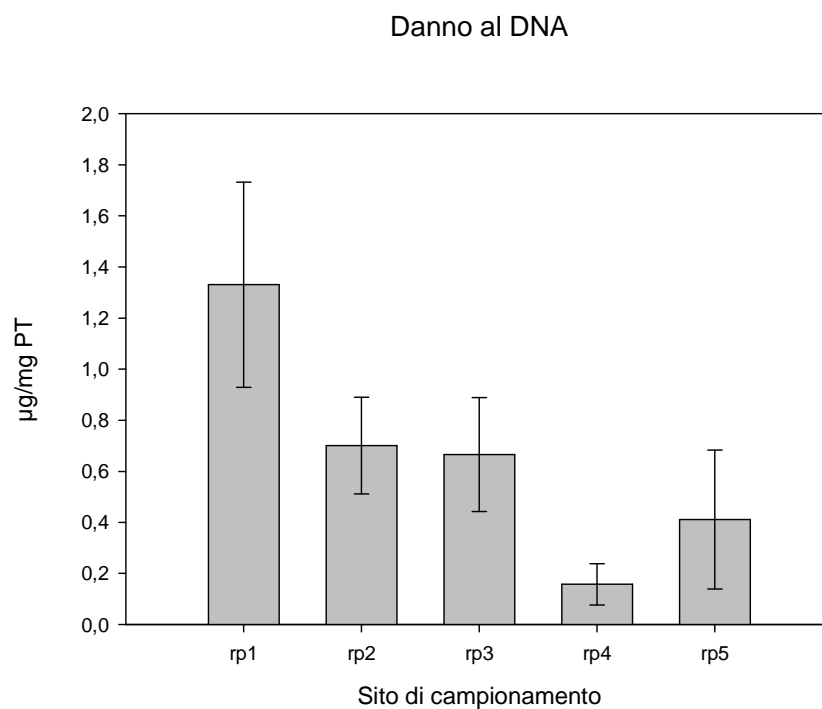


Fig. 26: Danno al DNA nei punti di campionamento. Punto 1 significativamente differente ($p < 0,05$) rispetto al punto di controllo (rp5)

Sono state analizzate le correlazioni tra i biomarker studiati nei tessuti di *Scrobicularia plana* tramite la correlazione di Pearson. I risultati dimostrano una correlazione negativa tra la zona di campionamento e attività dell'EROD ($p < 0,05$) e Danno al DNA e LPO ($p < 0,01$), dimostrano una relazione diretta tra GR, DBF e GST ($p < 0,01$), tra EROD, Danno al DNA e LPO ($p < 0,01$), infine una relazione diretta tra danno al DNA e LPO ($p < 0,05$) (Tab. 4).

Correlazione di Pearson	Sito di campionamento	GR	GPX	EROD	DBF	GST	Danno al DNA	LPO
Sito di campionamento	1							
GR	,030	1						
GPX	-,227	,313	1					
EROD	-,500*	-,354	-,055	1				
DBF	-,091	,858*	,163	-,255	1			
GST	,135	,758*	,219	-,282	,828**	1		
Danno al DNA	-,753**	-,074	,036	,628**	-,121	-,436	1	
LPO	-,644**	-,253	-,127	,869**	-,079	-,343	,503*	1

Tab. 4: Valutazione della correlazione di Pearson tra sito di campionamento e biomarker e tra i biomarker stessi.

* La correlazione è significativa allo 0.05 (a 2 code)

** La correlazione + significativa allo 0,01 (a 2 code)

3.3- Parametri abiotici

Di seguito i parametri abiotici dei punti di campionamento (Tab. 5).

Punto di campionamento	Ossigeno disciolto acqua superficiale (O2AS)	Ossigeno disciolto acqua interstiziale (O2AI)	Temperatura acqua superficiale (TAS)	Temperatura acqua interstiziale (TAI)	pH acqua superficiale (PHAS)	pH acqua interstiziale (PHAI)	Salinità acqua superficiale (SAS)	Salinità acqua interstiziale (SAI)	Potenziale redox acqua interstiziale (EHAI)
rp1	5,40	0,04	22,8	24,0	7,29	7,28	30,2	25,1	67,3
rp2	5,95	0,05	22,4	21,3	7,37	7,30	32,0	27,0	75,3
rp3	4,66	0,05	21,7	22,4	7,57	7,44	32,0	30,8	88,7
rp4	4,75	0,09	22,6	23,1	7,59	7,35	32,1	28,2	112,2
rp5	5,23	1,56	22,3	22,2	7,80	7,62	30,8	33,0	125,9

Tab. 5: Parametri abiotici dell'acqua superficiale (AS) ed interstiziale (AI)

I dati così archiviati sono poi stati rappresentati in grafici a colonne ponendo a confronto i dati delle acque superficiali e interstiziali.

Come supporto alla presa di visione del problema nel suo insieme si è scelto di rappresentare graficamente l'andamento dei dati abiotici raccolti rappresentandoli tramite simboli graduati in ArcGIS dove a simbolo più grande corrisponde un valore più alto della componente abiotica presa in esame.

La concentrazione di ossigeno varia di poco nell'acqua superficiale, mentre si vede una chiara riduzione dell'ossigeno a livelli in tracce man mano che ci si avvicina al punto di scarico delle acque residuali (Fig. 27).

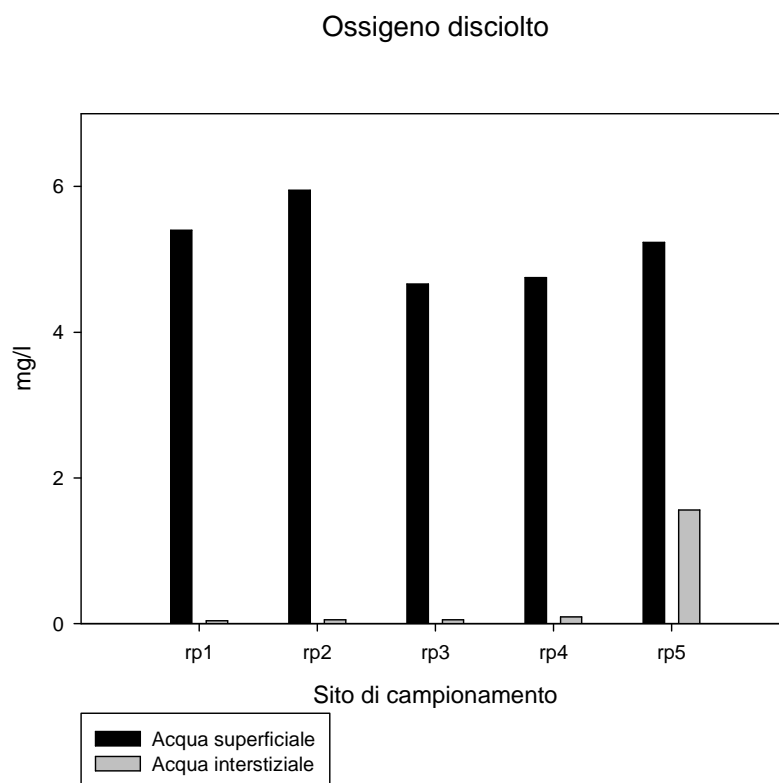


Fig. 27: Confronto fra ossigeno disciolto in acqua superficiale ed interstiziale nei punti di campionamento

Di seguito l'implementazione in ambiente GIS dei dati raccolti (Fig. 28) (Fig. 29).



Fig. 28: Distribuzione nei punti di campionamento dell'ossigeno disciolto nell'acqua superficiale (O2_AS)



Fig. 29: Distribuzione nei punti di campionamento dell'ossigeno disciolto nell'acqua interstiziale (O2_AI)

La temperatura non mostra differenze marcate nei punti di campionamento e fra acqua superficiale ed interstiziale. Solo nel punto di campionamento 1 mostra un valore leggermente più alto degli altri (Fig. 30).

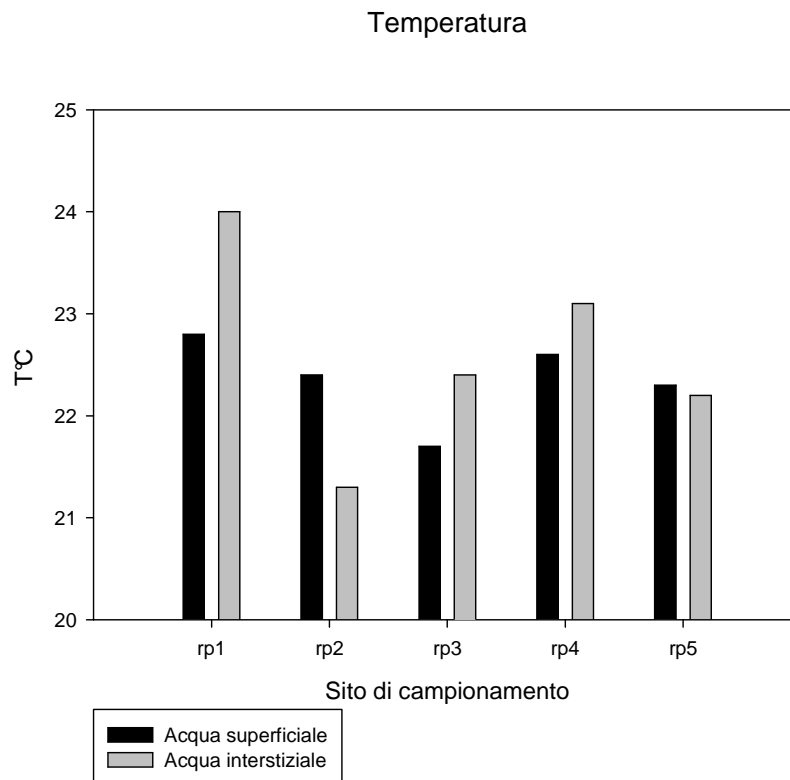


Fig. 30: Confronto fra temperatura in acqua superficiale ed interstiziale nei punti di campionamento

Di seguito l'implementazione in ambiente GIS dei dati raccolti (Fig. 31) (Fig. 32).



Fig. 31: Distribuzione nei punti di campionamento della temperatura nell'acqua superficiale (T_AS)

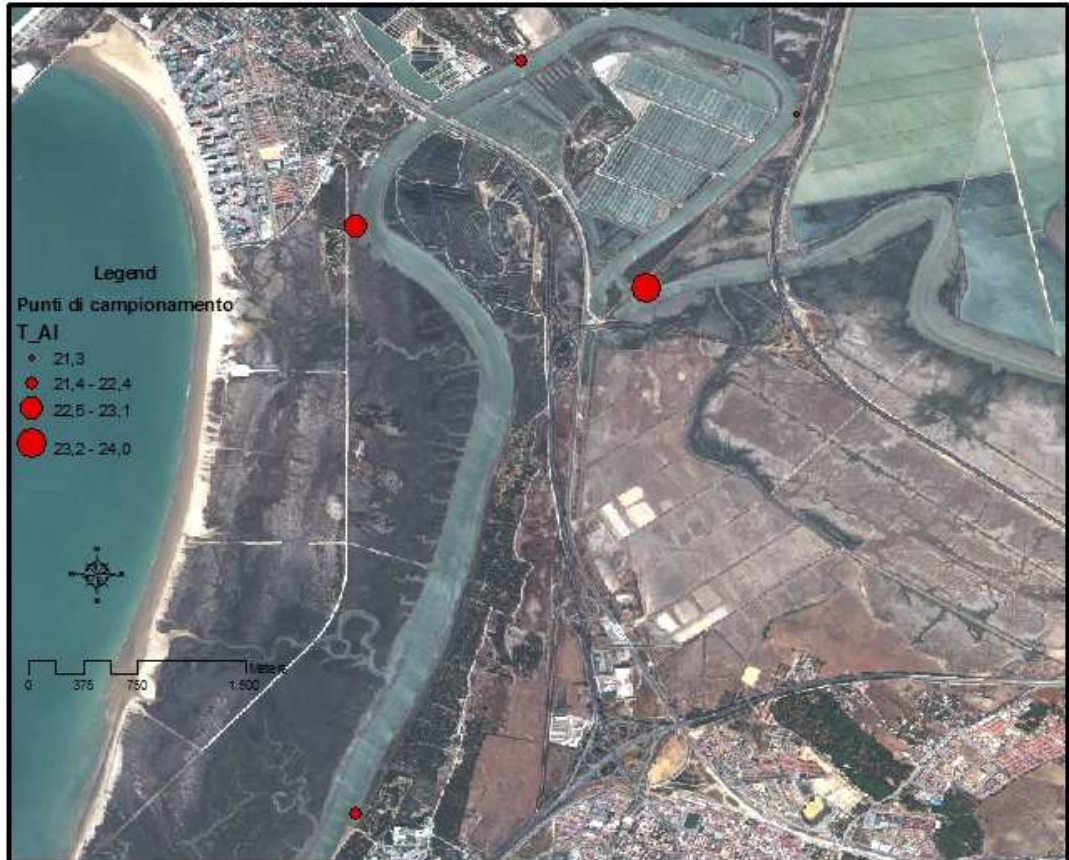


Fig. 32: Distribuzione nei punti di campionamento della temperatura nell'acqua interstiziale (T_AI)

Sia nell'acqua superficiale che nell'acqua interstiziale si vede un chiaro gradiente di aumento di pH man mano che ci si avvicina al mare aperto (Fig. 33).

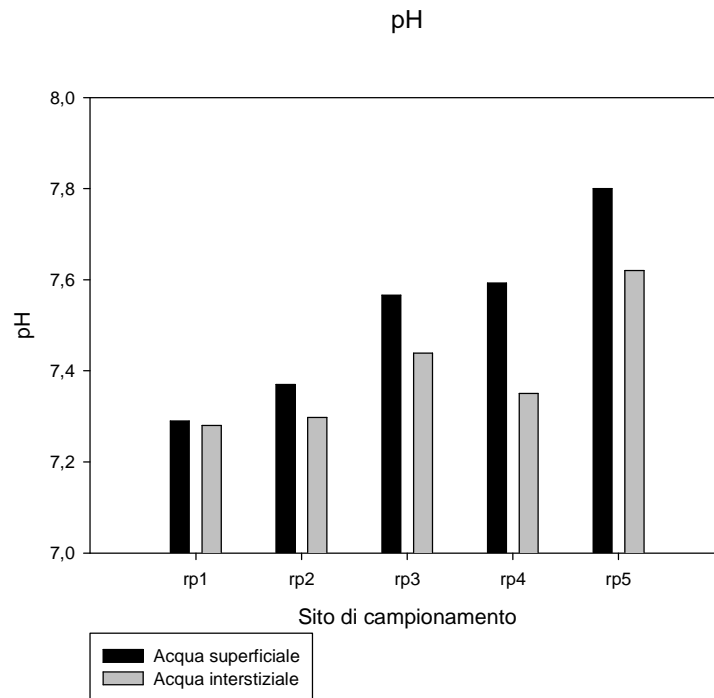


Fig. 33: Confronto fra temperatura in acqua superficiale ed interstiziale nei punti di campionamento

Di seguito l'implementazione in ambiente GIS dei dati raccolti (Fig. 34) (Fig. 35).



Fig. 34: Distribuzione nei punti di campionamento della temperatura nell'acqua superficiale (PH_AS)



Fig. 35: Distribuzione nei punti di campionamento del pH nell'acqua interstiziale (PH_AI)

La salinità non sembra variare in modo consistente nell'acqua superficiale mentre aumenta considerevolmente nell'acqua interstiziale avvicinandosi al mare aperto (Fig. 36).

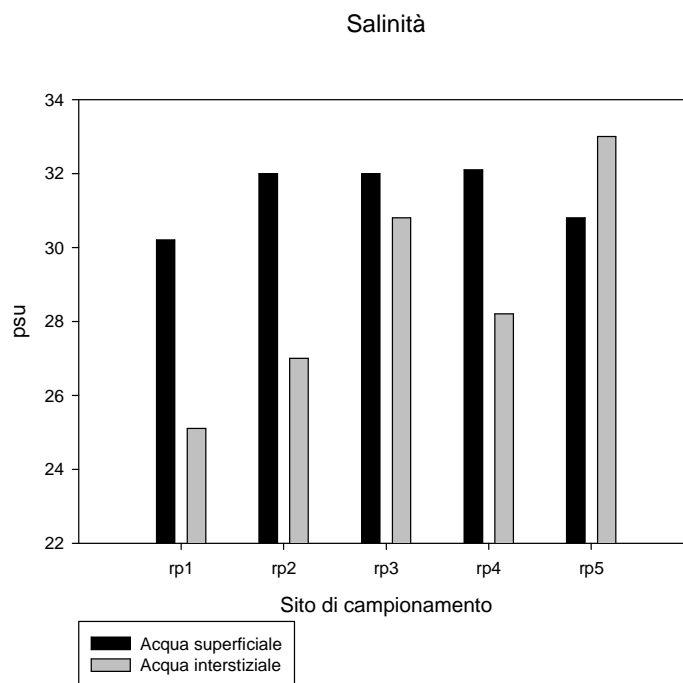


Fig. 36: Confronto fra salinità in acqua superficiale ed interstiziale nei punti di campionamento

Di seguito l'implementazione in ambiente GIS dei dati raccolti (Fig. 37) (Fig. 38).



Fig. 37: Distribuzione nei punti di campionamento della salinità nell'acqua superficiale (S_AS)



Fig. 38: Distribuzione nei punti di campionamento della salinità nell'acqua interstiziale (S_AI)

Il potenziale redox mostra una relazione diretta con l'avvicinarsi al mare aperto, aumentando allontanandosi dal punto di scarico (Fig. 39).

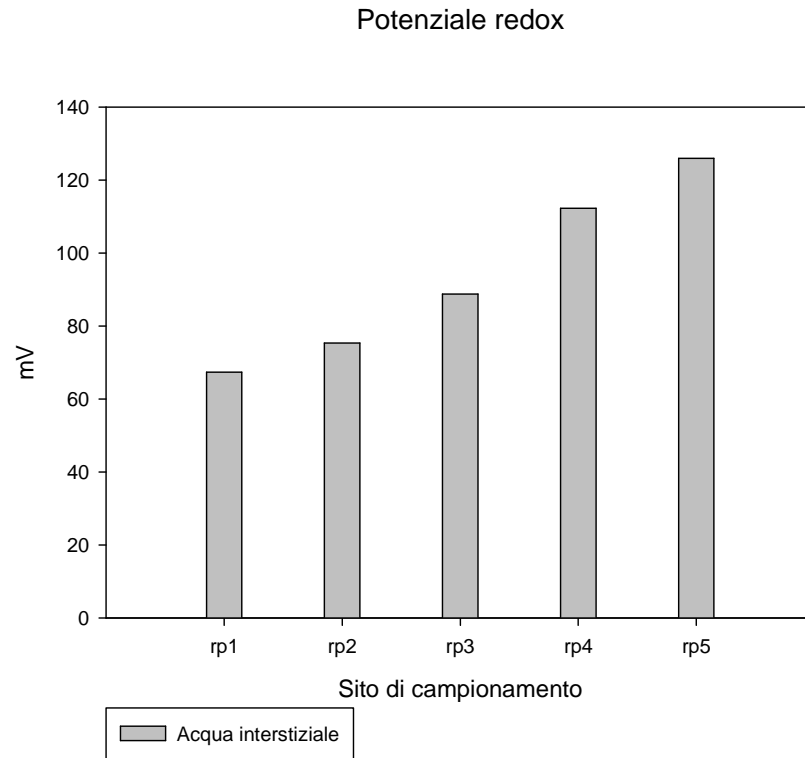


Fig. 39: Valori del potenziale redox in acqua interstiziale nei punti di campionamento

Di seguito l'implementazione in ambiente GIS dei dati raccolti (Fig. 40)



Fig. 40: Distribuzione nei punti di campionamento del potenziale redox nell'acqua interstiziale (E0_AI)

4.- Discussione

4.1- Parametri abiotici

È importante analizzare le componenti abiotiche di un sistema in quanto possono influenzare ampiamente la sopravvivenza e la fitness degli organismi che lo abitano, quindi una parte del mio studio è stata dedicata a questo.

L'ossigeno disciolto misurato nelle acque interstiziali ha mostrato valori molto bassi in tutti i punti di campionamento tranne nel punto di controllo indicando un forte stress a livello dei sedimenti dovuta probabilmente all'alto carico di materiale organico scaricato dalla piscicoltura. Questo crea ambienti anossici nei sedimenti dal momento che i microorganismi e i batteri completano la sua mineralizzazione. La temperatura al contrario non mostra significative differenze o alterazioni dovute allo scarico di acque residuali.

Il pH presenta un aumento progressivo all'aumentare della distanza dalla fonte di scarico delle acque residuali, dai valori molto bassi (7,3-7,4) nei punti di campionamento 1 e 2 fino ai valori considerati nella norma sia nelle acque superficiali che interstiziali (7,6-7,8) nel punto di controllo.

Si ritiene l'abbassamento del pH sia determinato dalla degradazione della sostanza organica scaricata dalla piscicoltura.

La salinità nell'oceano varia dai 33 ai 37 psu; nel Rio San Pedro il valore nelle acque superficiali è di 30-30 psu; nelle acque interstiziali sono stati registrati valori molto bassi (24 psu nel punto 1). Questo può essere dovuto ad un evento piovoso accaduto pochi giorni prima in quanto l'unico apporto di acqua dolce del Rio San Pedro sono le piogge.

In chimica, ad ogni reazione di ossido-riduzione è associato un parametro, il potenziale standard di riduzione (E_0), che ne misura, in condizioni ambientali standard, il potenziale riferito all'elettrodo standard a idrogeno. Questo parametro può assumere valori positivi o negativi ed è un indicatore della spontaneità della reazione di ossido-riduzione: ogni specie chimica si trova in uno specifico stato di ossidazione; in presenza di un agente ossidante (o riducente) può ossidarsi (o ridursi) in virtù della differenza di potenziale standard di riduzione. Le specie con i più alti valori del potenziale di riduzione (E_0 positivo) si comportano come agenti ossidanti, mentre quelle con i più bassi valori si comportano come agenti riducenti. La specie chimica che si ossida quindi cede elettroni ed aumenta il numero di ossidazione (>n.o.), la specie chimica che si riduce invece acquista quegli elettroni, diminuendo il numero di ossidazione (<n.o.).

Nel nostro studio il potenziale redox aumenta nelle acque interstiziali man mano che ci si allontana dallo scarico delle acque residuali. Ciò dimostra che i sedimenti sono ricchi di ossigeno e quindi possono ossidare la materia organica aumentando il potenziale redox dell'acqua, mentre nelle zone vicine al punto di scarico l'ossigeno è a livelli talmente bassi che l'ossidazione è molto bassa abbassando così considerevolmente il potenziale redox dell'acqua.

I dati abiotici sono stati anche rappresentati in una mappa georeferenziata come supporto alla presa di visione del problema nel suo insieme.

4.2- Parametri biotici

Questa tesi è sviluppata all'interno di un progetto più ampio e rappresenta il punto di partenza di un lavoro di tre anni, durante i quali la scelta della specie bioindicatrice e dei parametri biotici potrà essere modificata o mantenuta grazie ai dati ottenuti nel presente lavoro.

Nella scelta delle specie per valutare la tossicità dei sedimenti devono essere presi in considerazione, insieme alle caratteristiche già descritte, la reattività delle specie, lo stadio vitale testato, la preferenza e la tolleranza alle dimensioni delle particelle (Martín-Díaz et al., 2007). In quest'ottica, Ramsäk et al. (2007) hanno stabilito che le specie utilizzate nei saggi biologici devono essere sensibili, e la misura dei biomarker deve fornire una risposta riproducibile. Gli inquinanti organici sono composti interessati nella produzione di specie reattive dell'ossigeno e la conseguente risposta compensatoria antiossidante. Questi composti posseggono una ridotta solubilità in acqua, perciò, gli organismi filtratori come alcuni bivalvi (*Mytilus galloprovincialis*) saranno meno esposti al contaminante rispetto ai detritivori (deposit-feeder), come i granchi o altri bivalvi (*Scrobicularia plana*). Dal momento che questi ultimi si cibano direttamente dal sedimento saranno più soggetti alle elevate concentrazioni di questi contaminanti (Ramsäk et al., 2007). Boehm et al., (1982) hanno suggerito che i detritivori rappresentano gli organismi ideali tramite i quali può essere monitorato l'esposizione del benthos agli inquinanti.

In generale i molluschi bivalvi marini hanno guadagnato un'importanza globale come bioindicatori di inquinamento marino e costiero; essi accumulano molto bene i contaminanti chimici ambientali e perciò sono stati largamente utilizzati in programmi di monitoraggio a livello nazionale ed

internazionale (Med Pol, UNEP Mediterranean Biomonitoring; OSPAR Convention, RA.MO.GE. Viarengo et al., 2007). La specie utilizzata in questo lavoro, *Scrobicularia plana*, rientra molto bene nei criteri per la selezione della specie indicatrice per gli studi con biomarker indicati da Leonzio et al. (2003).

È importante riconoscere che la risposta degli individui ai biomarker dipenderà sia dal carico di inquinante che l'organismo acquisisce sia dalla capacità dei suoi meccanismi metabolici di produrre una risposta. In altre parole nella comparazione di due individui, differenze nella risposta di un biomarker possono indicare differenze nel livello di esposizione all'inquinante a cui sono stati soggetti, o che gli organismi hanno ricevuto un'esposizione identica, ma hanno differenti capacità di risposta all'inquinante (Depledge, 1994).

4.2.1- Indice gonadosomatico ed epatosomatico

La valutazione di questi indici rappresenta un primo screening molto semplice e sensibile per determinare l'andamento generale dello stato di salute degli organismi nell'area di studio.

Esistono pochi studi sull'effetto che i contaminanti hanno sullo sviluppo delle gonadi e l'indice gonadosomatico può servire come indicatore delle loro condizioni (Fingerman et al., 1998). L'utilità delle informazioni fornite non riguarda solo l'individuo in sé, ma anche eventuali effetti dei contaminanti sulle generazioni future.

In questo studio l'indice gonadosomatico presenta valori bassi in tutti i punti di prelievo, che corrispondono a circa la metà dei valori riscontrati nel punto di controllo.

L'indice epatosomatico presenta una correlazione negativa significativa con i punti di campionamento e diminuisce man

mano che ci si allontana dal punto di scarico delle acque residuali.

Ciò può essere dovuto al fatto che in ambienti stressati l'organismo investe meno energia nello sviluppo delle gonadi (riproduzione) a favore di uno sviluppo di altri organi come la ghiandola digestiva o le branchie (sopravvivenza e crescita) (Martin Diaz et al., 2005).

4.2.2- Biomarker

La chimica analitica è ora talmente sofisticata che gli inquinanti possono essere individuati anche a concentrazioni molto basse; tuttavia poiché non informano dell'eventuale interazione con i tessuti biologici il loro valore è limitato (Peakall et al., 1999; Butterworth et al., 1995). Rispetto alle analisi chimiche, i biomarker hanno il vantaggio di poter dimostrare se un organismo è significativamente esposto o no ad un certo contaminante (Peakall et al., 1999; Lam et al., (2003). In questo senso i biomarker possono fornire informazioni sulla esposizione e sullo stato di salute degli individui. Comunque le analisi sugli effetti biologici non rimpiazzeranno mai totalmente le analisi chimiche. Perciò l'approccio con i biomarker va considerato come un importante approccio complementare alle analisi convenzionali (Depledge e Fossi, 1994).

Un importante vantaggio nell'uso dei biomarker è che forniscono una valutazione integrata nel tempo e nello spazio dei contaminanti biodisponibili, non solo relazionati alla loro presenza ma al loro effetto sugli organismi anche quando gli inquinanti non sono più presente (Amiard et al., 2000; Wells et al., 2001; Hardy et al., 2003; Vijayavelb e Balasubramaniana, 2008). In aggiunta, i biomarker possono dare indicazioni sulla distribuzione dei contaminanti nell'ambiente (Amiard et al., 2000). Non meno importante, le risposte dei

biomarker spesso persistono a lungo dopo un'esposizione transitoria ad un contaminante che è poi ad esempio stato degradato e non è più rilevabile chimicamente. I biomarker sono quindi definiti come indicatori a breve termine di effetti biologici a lungo termine (Cajaraville et al., 2000). Di conseguenza i biomarker possono rilevare eventi di inquinamento intermittenti che un monitoraggio di routine non rileverebbe. In aggiunta, l'utilizzo di una batteria di biomarker può rilevare la presenza di contaminanti la cui presenza non era stata presunta inizialmente (Wells et al., 2001; Handy et al., 2003).

I biomarker agiscono come strumenti "early warning" possedendo il potenziale di predire cambiamenti ad un livello più alto di organizzazione biologica es., popolazione, comunità, ecosistema (McCarty e Shugart, 1990; Lam et al., (2003) permettendo l'inizio di strategie di bioremediation prima che avvengano danni ambientali irreversibili con conseguenze ecologiche. Moore et al., (2004).

Le analisi tramite biomarker, sono in molti casi, considerevolmente meno dispendiose rispetto ad un'ampia gamma di sofisticate analisi chimiche (Wells et al., 2001; Handy et al., 2003; Lam et al., 2003). Allo stesso modo, nell'uso dei biomarker si devono considerare e avere ben chiari alcuni degli svantaggi, ad esempio il fatto che sono rare le pubblicazioni nelle quali sono state misurate solo i biomarker (Gray 2003), in più alcuni autori come Cajaraville et al., (2000); Handy et al. (2003) e Van der Oost et al.,(2003) suggeriscono che non sarebbero da usare mai soli, ma incorporati come end point alternativi nel processo di analisi dei rischi, in aggiunta affermano che non sempre i biomarker danno risposte positive causa-effetto.

Il maggiore svantaggio nell'uso dei biomarker è relazionata all'interferenza con altri fattori ambientali specialmente quando si utilizzano organismi in situ.

Lam et al., (2003) e Moore et al., (2004) suggeriscono, per fare in modo che gli strumenti di valutazione del rischio siano efficaci, che i biomarker siano capaci di fornire dati relazionati a processi ecologici significativi, il che richiede una conoscenza migliore di come i biomarker si relazionano allo stato di salute in modo da sviluppare i loro valori interpretativi. Infine Martin Diaz et al., (2004) specificano che per usare i biomarker come strumento per determinare la tossicità dell'ambiente acquatico sia importante stabilire un end point ben definito e tenere in conto non solo delle metodologie di laboratorio ma anche dei rilievi su campo e della scelta della specie biondicatrice più indicata.

Riteniamo che in altri studi l'uso dei biomarker si sia dimostrato utile nello stabilire evidenze dell'esposizione a xenobiotici.

Le valutazioni condotte sui biomarker mostrano che l'attività della EROD viene indotta nei punti di campionamento 1 e 4, segno che in queste zone gli organismi investono molta energia negli enzimi della Fase I quindi nella biotrasformazione degli xenobiotici in composti generalmente più solubili in acqua e quindi più facilmente escreti. Inoltre il risultato del test di Pearson mostra una correlazione negativa rispetto alla distanza dalla piscifattoria. Infatti si nota una diminuzione nell'attività dell'EROD con l'allontanarsi dal punto di scarico delle acque residuali, segno che man mano che ci si allontana dalla supposta fonte di inquinamento l'attività dei meccanismi di detossificazione tende a riportarsi ai valori di controllo.

Molti studi condotti in laboratorio e in campo, utilizzano in varie combinazioni sia singoli xenobiotici che loro miscele, come pure acque superficiali, effluenti di scarico ed anche sedimenti (Melancon et al., 1989; Holm et al., 1993; Viganò et al., 1995; Parrot et al., 1995; Viganò et al., 1998b). Nella larga maggioranza dei casi, è stato possibile osservare un

incremento dose-dipendente dell'attività enzimatica, e nello specifico dell'attività EROD è stato documentato come essa venga indotta da inquinanti come PCB i PCDD i PCDF ecc. la cui presenza è stata riscontrata in precedenti lavori effettuati in questa zona (Perez et al., 2004) (Solé et al., 2009).

Questi inquinanti sono composti principalmente di sintesi che resistono alla degradazione biologica e chimica. Per le loro caratteristiche chimico-fisiche sono particolarmente predisposti a causare fenomeni di bioaccumulo, bioconcentrazione e biomagnificazione, rappresentando quindi un alto fattore di rischio per tutte le specie marine. Si accumulano prevalentemente nei grassi, infatti una peculiarità di questi composti è la loro elevata lipoaffinità che li rende anche per questo motivo difficilmente eliminabili dagli organismi. Sono inoltre contraddistinti da un'elevata persistenza, sia come principi attivi sia con le loro forme metaboliche. Gli effetti dovuti alla esposizione cronica a questi composti (come nel caso degli organismi presi in esame) sono disfunzioni del sistema immunitario, anomalie riproduttive e comportamentali e carcinogenesi.

Osserviamo comunque che negli organismi analizzati, l'attività della DBF, enzima che come l'EROD catalizza le reazioni della Fase I, non ha mostrato differenze significative nella sua attività.

L'attività della GST, enzima della Fase II che ha una funzione detossificante tramite la formazione di coniugati che inattivano e inducono l'eliminazione del composto xenobiotico, ed una funzione antiossidante mitigando l'effetto di specie reattive dell'ossigeno (Landis e Yu, 1994; Newman e Unger, 2003; Landis e Yu, 2004), non mostra differenze significative fra i punti di campionamento.

I risultati sono in contraddizione con molti studi precedenti; Wright e Welbourn, (2002) infatti affermano che il livello di GSH nelle ghiandole digestive mostra un'alterazione in

concomitanza all'esposizione ad agenti chimici che possono essere potenzialmente substrati o che formano intermedi reattivi dell'ossigeno. Dall'altro lato i nostri risultati sono in accordo con Van der Oost et al., (2003) che riportano molti esempi in cui non si osserva differenza di attività dell'enzima GST fra i siti contaminati da PAH, PCB, etc e i siti di controllo. Anche Cossu et al., (1997) riportano che le risposte della GST agli inquinanti nelle specie acquatiche sono conflittuali in quanto non si osserva sempre una relazione tra inquinante e induzione enzimatica.

È noto che gli xenobiotici possono produrre effetti tossici relazionati allo stress ossidativo. La tossicità dell'ossigeno è definita come effetti dannosi dovuti a specie reattive dell'ossigeno citotossiche, anche chiamati radicali liberi (Di Giulio, 1989).

Di Giulio et al., 1989 hanno osservato che il sistema antiossidante agisce per prevenire il danno ossidativo eliminando le specie reattive dell'ossigeno e può essere indotto come risposta adattativa dopo l'esposizione a PAH, permettendo all'organismo di dominare totalmente o parzialmente lo stress ossidativo in ambienti inquinati.

In questo lavoro è stato preso in considerazione l'enzima parte del sistema di difesa antiossidante GPX, che però non mostra differenze significative fra i siti di campionamento anche se si può notare un calo dell'attività con l'allontanarsi dal punto di scarico delle acque residuali.

Nonostante sia meno coinvolto nella difesa antiossidante, la GR riveste un ruolo molto importante nel mantenere l'omeostasi GSH/GSSG in condizioni di stress ossidativo (Winston e Di Giulio, 1991). La GR catalizza la trasformazione della forma ossidata del bisolfuro del glutatione (GSSG) alla sua forma ridotta (GSH), con la concomitante ossidazione del NADPH a NADP+. In questo studio si è verificato un innalzamento significativo dell'attività della GR nel punto di campionamento 3 rispetto al controllo, segno che è in atto uno

stress ossidativo e l'organismo spende più energia nel mantenimento dell'omeostasi GSH/GSSG.

La perossidazione lipidica è una conseguenza molto importante dello stress ossidativo. Il processo della LPO si attua in una catena di reazioni e, come nel caso del ciclo redox, mostra l'abilità di una singola specie di radicali di propagare un gran numero di reazioni biochimiche dannose (van der Oost, et al., 2003).

I dati ottenuti in questa tesi mostrano come l'attività della LPO sia significativamente più alta nei punti di campionamento 1, 2 e 4, segno di un forte stress ossidativo a cui l'organismo viene sottoposto. Inoltre il risultato del test di Pearson mostra una correlazione negativa rispetto alla distanza dei siti di campionamento dalla piscifattoria, indicando una diminuzione nell'attività della LPO e quindi dello stress ossidativo, con l'allontanarsi dal punto di scarico delle acque residuali.

I composti organici persistenti (POP) sono solitamente presenti nel mare a concentrazioni molto basse. Comunque, a causa della loro persistenza, sono accumulati nei tessuti degli organismi marini ad alte concentrazioni, spesso più alte di quelle riscontrate in ambiente di molti ordini di grandezza. I POP non provocano solo un effetto tossico generale, ma sono conosciuti anche per essere genotossici alterando l'integrità della struttura del DNA, sia direttamente che attraverso i loro metaboliti (Shugart, 1995). I composti genotossici come i POPs possono causare mutagenesi (Siu et al., 2004).

In questo studio si è riscontrato un picco significativo del danno al DNA nel punto 1. Un'attività così alta fornisce una forte indicazione del fatto che nell'organismo sta agendo un fattore di stress genotossico rilevante che va tenuto in considerazione.

Inoltre il risultato del test di Pearson mostra una correlazione negativa rispetto alla distanza dei siti di campionamento dalla piscifattoria, indicando una diminuzione nell'attività del danno al DNA con l'allontanarsi dal punto di scarico delle acque residuali. Quindi man mano che ci si allontana dalla supposta fonte di inquinamento, diminuisce il livello di danni che i composti chimici xenobiotici provocano all'organismo.

Quando una forza pro-ossidante supera le difese antiossidanti, si stabilisce uno stress ossidativo (Doyote et al., 1997). Ci sono casi in cui l'esposizione prolungata a contaminanti può anche risultare in un impoverimento dei componenti della risposta antiossidante all'effetto tossico (Reid et al., 2003).

In questo studio si è riscontrato un impoverimento nell'induzione della EROD che presenta valori differenti nei vari punti di campionamento, ma presenta al contempo valori molto bassi di attività ed una correlazione positiva con danno al DNA e LPO, segno che l'induzione è attiva ma molto ridotta. Anche tra GST e GR esiste una correlazione diretta, segno dell'alta attività della GST che necessita un'alta attività della GR nel mantenimento dell'omeostasi GSH/GSSG necessaria al suo funzionamento ottimale.

La correlazione diretta tra danno al DNA e LPO è sintomo di un elevato stress ossidativo sia a livello cellulare che a livello nucleare.

5.- Conclusioni

I risultati del presente lavoro hanno evidenziato l'alterazione di alcuni biomarker correlati allo stress ossidativo nelle ghiandole digestive del bivalve *Scrobicularia plana*, presumibilmente conseguente allo scarico di acque residuali di una piscicoltura.

L'attività di EROD, GR, danno al DNA e LPO mostrano differenze significative fra i punti di studio e il punto di controllo dimostrando insieme ai dati abiotici un impatto negativo da parte della piscicoltura effettuata in questa zona. EROD e GR mostrano come l'organismo metta in atto meccanismi di difesa allo stress derivato da inquinanti organici persistenti (POP) mentre LPO e danno al DNA mostrano che nonostante le difese messe in atto gli organismi presentano conseguenze dello stress. I dati abiotici supportano questo stress mostrando una modificazione delle acque superficiali e interstiziali con l'avvicinarsi alla fonte di inquinamento: si rileva infatti una diminuzione dell'ossigeno disciolto, e del potenziale redox nelle acque interstiziali e del pH sia nelle acque superficiali che interstiziali. La variazione di questi parametri può rappresentare un ulteriore fattore di stress per gli organismi presi in esame e più in generale per gli organismi presenti nell'area di studio come *Nereis diversicolor* (detritivoro), *Carcinus maenas* (detritivoro), *Ruditapes philippinarum* (filtratore). Un'ulteriore dato a supporto di queste conclusioni è rappresentato dall'indice gonadosomatico ed epatosomatico che dimostrano come ci sia una differenza significativa tra gli organismi prelevati nei siti di studio e il sito di controllo, denotando uno stress nell'organismo che nelle zone di impatto presenta un HSI molto alto segno che l'organismo spende più energia per la sopravvivenza, quindi aumenta le dimensioni di organi come

ghiandola digestiva e branchie, per avere una maggior possibilità di successo nella sopravvivenza, e al contrario non investe energie per la riproduzione limitando lo sviluppo delle gonadi. Nel punto di controllo gli organismi presentano gonadi molto sviluppate e strutture per l'alimentazione e assimilazione del cibo ridotte, segno che possono investire energie per la riproduzione possedendo una buona fitness.

La qualità delle acque del fiume Rio Pedro è dunque da tenere costantemente monitorata, e occorre condurre analisi chimiche sulle acque di scarico della piscicoltura per risalire con precisione ai composti chimici che vengono riversati nel fiume. Si può ipotizzare che fra questi, oltre ai contaminanti convenzionali, vi siano anche vari farmaci usati in acquicoltura, che come emerge dalla più recente letteratura hanno rilevanti ed indesiderati effetti sugli organismi non-bersaglio (Christen et al., 2010). Questo studio conferma l'utilità del bivalve *Scrobicularia plana* come bioindicatore della qualità del fiume, e suggerisce di includere nella batteria di biomarker da utilizzare il test dei micronuclei, per stabilire se vi siano effetti genotossici irreversibili (Viarengo et al., 2007).

Ringraziamenti

I miei più sinceri ringraziamenti vanno, innanzitutto, alla Professoressa E. Fabbri per avere accettato di seguirmi e aiutarmi come sempre in modo ineccepibile anche a distanza in questo progetto, alla professoressa Laura Martin Diaz per avermi accolto e aiutato in tutte le fasi di questa tesi.

Grazie! Ai miei genitori, come mi avete insegnato, se desideri veramente qualcosa cerca di ottenerla con tutte le tue forze! Siete il pilastro portante della mia vita e vi devo tanto... molto più di quello che potrò mai "restituirvi" in una vita intera. Una volta vi ho scritto che ogni passo che farò, ogni città che mi vedrà, in ogni momento della mia vita, sarete SEMPRE nel mio cuore... è così ogni giorno della mia vita

Grazie! Alla mia sorellina, continuerò a vederti come quella bambina che si metteva a mangiare con me sul tappeto quando la mamma non c'era, con quella piccola complicità che ci legava. Ora siamo tutti e due più grandi ma quella complicità ci lega tutt'ora e io ti voglio un bene che nemmeno immagini nonostante a volte dica che sei stregna! Sei la mia sorellina adorata, e lo sarai per sempre.

Grazie! A Linda... grazie di cuore per l'amore che mi dai, grazie perché per la prima volta nella vita sono me stesso in ogni sfaccettatura, grazie perché nonostante la distanza per 5 lunghi mesi mi facevi sentire al caldo col tuo amore, mi hai aspettato con amore, mi hai dato la forza di sorridere quando avrei voluto spaccare tutto, mi hai dato la forza di essere me stesso... ed è il regalo più bello che abbia mai ricevuto. Ti amo.

Grazie! Al Gabri, amico impagabile, impareggiabile... unico. Sei l'amico che ogni persona desidererebbe. Purtroppo le nostre strade si sono separate, ma la nostra amicizia continua sempre più forte, la distanza non ha smorzato l'amicizia così forte

che ci lega. Grazie per l'aiuto anche in questa tesi, grazie per le risate, grazie per essere sempre come sei, non cambiare mai anche se la gente non capisce o ti rema contro... la tua forza e determinazione mi ha ispirato nei momenti bui della mia carriera universitaria. Grazie amico.

Grazie! A Matte, sei entrato come un raggio di sole nella vita di mia sorella e in te ho trovato subito un amico! Grazie di tutto Matte.

Grazie! A Sca, sei stato il mio capo scout, un confidente, un compagno di giochi e di riflessioni ma soprattutto un amico, ogni volta che avevo bisogno tu c'eri e non sai quanto apprezzi ogni istante passato al tuo fianco.

Grazie! A Rob, sono entrato negli scout grazie a te, mi hai fatto vivere esperienze indimenticabili, mi sei stato vicino, ci siamo aiutati a vicenda (mi hai aiutato molto più tu in realtà) e mi mancano tanto le giornate passate a camminare, chiacchierare ed imparare da te... ricordi il bottiglione di te in pulmino alle 3 di notte fermi a fare benzina? È un ricordo che anche a distanza di anni mi fa sorridere!

Grazie! A tutti i miei compagni di pallavolo. Stern, il calcetto con te è diventato uno sport incredibilmente bello hihi; Riva, sei un persona che apprezzo moltissimo e giocare senza di te non è più la stessa cosa; Cerquo, abbiamo giocato tanti anni insieme, ma l'anno scorso mi ha lasciato un bel ricordo nonostante le brutte esperienze vissute fra noi si è creato un bellissimo rapporto p.s. la franziskainer del melarancio ci aspetta hihi; a Pietro, i Fox, a Dima ma soprattutto alla mittttica BUBAAAAAA grazie a tutti amici.

Bibliografia

Alla, A. A. - Mouneyrac C. - Durou, C. - Moukrim, A. - Pellerin, J. (2006)

Tolerance and biomarkers as useful tools for assessing environmental quality in the Oued Souss estuary (Bay of Agadir, Morocco)

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 143: 23-29

Amiard, J. C. - Caquet, T. - Lagadic, L. (2000)

Biomarkes as tools for environmental quality assessment

Science Publishers, Inc. USA. Pp xvii-xxvii

Amin, O. - Comoglio, L. (2002)

Toxicidad del petróleo diesel en el primer estado larval de la centolla (*Lithodes santolla*) y del centollón (*Paralomis granulosa*)

Rev. Biol. Mar. Y Oceanog. 37(2): 139-144.

Arillo, A. - Viganò, L. (2002)

Metodo per test di tossicità a breve termine (7 giorni) su sedimento con trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)

Messa a punto dei protocolli per valutare tossicità e bioaccumulabilità Rapporti 25/2002 pag: 15-22

Bebianno, M. J. - Lopes, B. - Guerra, L. - Hoarau, P. - Ferreira, A. M. (2007)

Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: Effect of abiotic factors

Environment International 33: 550-558

Benedetti-Cecchi L. (2003)

Disegno sperimentale ed analisi di ipotesi in ecologia

Biol. Mar. Medit. 10 (Suppl.): 433-484

Bikham, J. W. - Sandhu, S. - Hebert, P. D. N. - Chikhi, L. Athwal, R. (2000)

Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations implications for biomonitoring and ecotoxicology Mutat. Res. 463: 33-51

Blasco, J. - Saenza, V. - Gomez-Parrab A. (2000)

Heavy metal fluxes at the sediment|water interface of three coastal ecosystems from south-west of the Iberian Peninsula
The Science of the Total Environment 247: 189-199

Boldina-Cosqueric, I. - Amiard, J. C. - Amiard-Triquet, C. - Dedourge-Geffard, O. - Metais, I. - Mouneyrac, C. - Moutel, B. - Berthet, B. (2010)

Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* as tools for the assessment of estuarine sediment quality
Ecotoxicology and Environmental Safety 73: 1733-1741

Burgeot, T. - Bocquene, G. - Porte, C. - Dimeet, J. - Santilla, R. M. - García de la Parra, L. M. - Pfohl-Leskowicz, A. - Raoux, C. Galgani, F. (1996)

Bioindicators of pollutant exposure in the Northwestern Mediterranean
Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 131: 125-141

Butterworth, F. M. (1995)

Introduction to biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change
A Handbook., Plenum Press, New York. Pp 1-8

Cajaravillea, M. P. - Bebianno, M. J. - Blasco, J. - Ported, 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

The Science of the Total Environment 247: 295-311

Carballeira, C. - Martín-Díaz, M.L. - Del Valls, T. A.

Biomonitorización de los efluentes de piscifactorías marinas instaladas en tierra: biomarcadores moleculares en mejillón native

XIII Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas

Carlos Sola, J. (1997)

Reproduction, population dynamics, growth and production of *Scrobicularia plana* da Costa (pelecypoda) in the Bidasoa estuary, Spain

Netherlands Journal of Aquatic Ecology Vol. 30, No. 4: 283-296

Casagrande, C. - Boudouresque, C. (2005)

Abundance, Population Structure and Production of *Scrobicularia plana* and *Abra tenuis* (Bivalvia: Scrobicularidae) in a Mediterranean Brackish Lagoon, Lake Ichkeul, Tunisia

Internat. Rev. Hydrobiol. Vol. 90, No. 4: 376-391

Christen, V. - Hickmann, S. - Rechenberg, B. - Fent, K. (2010)

Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action
Aquat. Toxicol. 96: 167-181

Cossu, C. - Doyotte, A. - Jacquin, M. C. - Babut, M. - Extinger, A. - Vasseur, P. (1997)

Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in fresh water bivalves, *Unio tumidos*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies

Ecotox and Environ safety. 38: 122-131

De la Paz, M. - Gomez-Parra, A. - Forja, J. (2008)

Tidal-to-seasonal variability in the parameters of the carbonate system in a shallow tidal creek influenced by anthropogenic inputs, Rio San Pedro (SW Iberian Peninsula)

Continental Shelf Research 28: 1394- 1404

Del Valls, T. A. - Conrado, M. (2000)

Advances in marine ecotoxicology: laboratory tests versus field assessments data on sediment quality studies

Cienc. Mar. 26 (1): 39-64

Depledge, M. H. (1994)

The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools

Department of environmental Biology Siena University, Siena Italy. Lewis Publishers. Pp 260-272

Diviacco, G. - Morri, C. - Tunesi, L. (2003)

La cartografia del bentos

Biol. Mar. Medit. 10 (Suppl.): 367-394

Donnini, F. - Dinelli, E. - Sangiorgi, F. - Fabbri E. (2007)

A biological and geochemical integrated approach to assess the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy)

Environment International 33: 919-928

Ferrón, S. - Ortega, T. - Forja, J.-M. (2009)

Benthic fluxes in a tidal salt marsh creek affected by fish farm activities: Río San Pedro (Bay of Cádiz, SW Spain)

Marine Chemistry 113: 50-62

Fossi, M. C. - Leoncio, C. (2004)

Nondestructive biomarkers in vertebrales

Department of environmental Biology Siena University, Siena Italy. Lewis Publishers. Pp 272-293

Gomez-Gutierrez, A. - Garnacho, E. - Bayona, J. - Albaiges, J. (2007)

Assessment of the Mediterranean sediments contamination by persistent organic pollutants

Environmental Pollution 148: 396-408

Gonzalez-Vila, F. J. - Mancha, A. - Almendros, G. - Martin, F.- Del Rio, J. C. (1996)

Changes in the physico-chemical characteristics and lipid composition in sediments from productive aquaculture ponds after a short-term shrimp growth experiment

Aquaculture 144: 121-131

Gray, J. S. (1992)

Biological and ecological effects of marine pollutants and their detection

Mar. Pollut. Bull. 25: 48-50

Izquierdo, C. - Usero, J. - Geacia, I. (1997)

Speciation of heavy metals in sediments from Salt marshes on the Southern Atlantic coast of Spain

Mar. Pollut. bull. 34(2): 123- 128.

- Landis, W. G. - Yu, M. H. (2004)
Introduction to environmental toxicology
Impacts of chemicals upon ecological systems. Third Edition.
Lewis publishers U. S. A. Pp 484.
- Landis, W. G. - Yu, M. H. (2004)
Introduction to environmental toxicology. Impacts of chemicals upon ecological systems. Third Edition
Lewis publishers U. S. A. pp 484
- Leonzio, C. - Fossi, M. C. - Marsili, L. - Casini, S. (2003)
Indagini eco tossicologiche sugli organismi del benthos
Biol. Mar. Medit. 10 (Suppl.): 549-576
- Lorenti, M. - De Falco, G. (2003)
Misura e caratterizzazione di variabili abiotiche
Biol. Mar. Medit. 10 (Suppl.): 1-42
- Martín-Díaz, M. L. - Bamber, S. - Casado-Martinez, C. - Sales, D. - Del Valls, T. A. (2004)
Toxicokinetics of heavy metals from a mining spill using *Carcinus maenas*
Marine Environ Res. 58: 833-837.
- Martín-Díaz, M. L. - Blasco, J. - Sales, D. - Del Valls, T. A. (2004)
Biomarkers as tools to assess sediment quality. Laboratory and field Surveys.
Trends Anal. Chem. 23: 10- 11.
- Martín-Díaz, M.L. - Tuberty, S.R. - McKenney, Jr, C.L. - Sales, D. - Del Valls, T.A. (2005)
Effects of cadmium and zinc on *Procambarus clarkii*: Simulation of the Aznalcóllar mining spill
Ciencias Marinas, 31(1B): 197-202
- Martín-Díaz, M. L. - Villena-Lincoln, A. - Lamber, S. - Blasco, J. - Del Valls, T. A. (2005)
An integrated approach using bioacumulation and biomarker measurements in female shore crab *Carcinus maenas*
Chemosph. 58:615-626.

Martín-Díaz, M. L. - Blasco, J. - Sales, D. - Del Valls, T. A. (2007) **Biomarkers study for sediment quality assessment in spanish ports using the crac *Carcinus maenas* and the clam *rudithapes philippinarum***

Arch. Environ Contam Toxicol. 53: 66-77.

Martín-Díaz, M. L. - Blasco, J. - Sales, D. - DelValls, T.A. (2007)

Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports

Environmental Pollution xx 1-10

Martín-Díaz, M. L. - Blasco, J. - Sales, D. - Del Valls, T. A. (2007b) **Field Validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports.**

Environ. Pollut. Bull. 1-10. Doi: 10.1016/j.envpol.2007.03019.

Martín-Díaz, M. L. - Kalman, J. - Riba, I. - De la Reguera, D. - Blasco, J. - Del Valls, T. A. (2007)

The use of metallotionein-like-proteins (MTLP) kinetic approach for metal bioavailability monitoring in dredged material

Environ Int. 33: 463-468.

Martín-Díaz, M. L. - Jiménez-Tenorio, N. - Sales, D. Del Valls, T. A. (2008)

Accumulation histopathological damage in the clam *Ruditapes philippinarum* and the crac *Carcinus maenas* to assess sediment toxicity in spanish ports.

Chemosphere: *accepted*.

Martín-Díaz, M. L. - Del Valls, T. A. - Riba, I. Blasco, J. (XXXX)

Integrative Sediment quality assessment using a biomarker approach: Review of 3 years of field research.

Martínez, G. V. A. (2008)

Sublethal Effects Responses To Assess Toxicity Of Prestige Oil Spill Contaminated Sediments: Application Of A Battery Of Biomarkers Under Laboratory Conditions.

Tesis de Master en Gestión del Agua y Costera

McDaid Kapetsky, J. - Aguilar-Manjarrez, J. (2007)
Geographic information systems, remote sensing and mapping for the development and management of marine aquaculture
FAO Fisheries Technical Paper No. 458: 125 pp

Mendiguchía, C. - Moreno, C. - Manuel-Vez, M. - García-Vargas, M. (2006)
Preliminary investigation on the enrichment of heavy metals in marine sediments originated from intensive aquaculture effluents
Aquaculture 254: 317-325

Mouneyrac, C. - Linot, S. - Amiard J.-C. - Amiard-Triquet, C. - Métais, I. - Durou, C. - Minier, C. - Pellerin, J. (2008)
Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of contamination
General and Comparative Endocrinology 157: 133-133

Peakall, D. B. - (1994)
Biomarkers: the way forward in environmental assessment
Toxicol. Ecotoxicol. News 1: 55-60.

Peakall, D. B. (1999)
The use of biomarkers in hazard assessment. In: Peakall D B, Walker C, Migula P (Ed.). Biomarkers: a Pragmatic basis for remediation of severe pollution in Eastern Europe
Kluwer Academia Publishers. London U K. Pp 123-133

Peakall, D. B. - Walker, C. - Migula, P.
Biomarkers: a Pragmatic basis for remediation of severe pollution in Eastern Europe
Kluwer Academia Publishers. London U K. Pp 123-133

Perez, E. - Blasco, J. - Solè, M. (2004)
Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Cadiz bay (SW Spain)
Marine Environmental Research 58: 275-279

Ramšak, A. - Stopar, K. - Sepčić K, Berden-Zrimec, M. - Bajt, O. - Malej, A. (2007)

Reflection of hydrocarbon pollution on hepatic EROD activity in the black Goby (*Gobius Níger*)

Environ. Toxicol. and Pharmacol. 24: 304-310.

Ruppert, E. E. - Barnes, R. D. - Fox, R. S. (2004)

Zoologia degli invertebrati

Edizione Piccin, pp: 407-458

Solé, M. - Kopecka-Pilarczyk, J. - Blasco, J. (2009)

Pollution biomarkers in two estuarine invertebrates, *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*, from a Marsh ecosystem in SW Spain

Environment International 35: 523-531

Tovar, A. - Moreno, C. - Manuel-Vez, P. - Garcia-Vargas, M. (2000)

Environmentale impacts of intensive aquaculture in marine waters

Wat. Res. Vol. 34, No. 1, pp. 334-342

Tovar, A. - Moreno, C. - Manuel-Vez, P. - Garcia-Vargas, M. (2000)

Environmental implications of intensive marine aquaculture in earthen ponds

Marine Pollution Bulletin Vol. 40, No. 11, pp. 981-988

Van der Oost, R. - Beyer, J. - Vermeulen, N. (2003)

Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review

Environmental Toxicology and Pharmacology 13: 57-149

Van Gestel, C. - Van der Waarde, J. - Derksen, J. - Van der Hoek, H. - Veul, M. - Bowens, S. - Rush, B. - Kronenburg, R. - Stokman, G. (2001)

The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils

Environ. Toxicol. Chem. 20 (7): 1438-1449

Viarengo, A. - Canesi, L. - Pertica, M. - Mancinelli, G. - Acconido, R. - Smaal, A. C. - Orunasu, M. (1995)
Stress on stress response: A simple Monitoring tool in the assessment of a general stress Síndrome in Mussels
Mar. Environ. Res. 39: 245-248

Viarengo, A. - Mancinelli, G. - Martino, G. - Perina, M. - Canesi, L. - Mazzucotelli, A. (1998)
Integrated cellular stress indice in trace metal contamination: Critical evaluation in a field study
Mar. Ecol. Progr. Ser. 46: 65-7

Viarengo, A. - Lowe, D. - Bolognesi, F. - Fabbri, E. Koehler, A. (2007) **The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms**
Comp. Biochem. Physiol. C 146: 281-300

Vidala, M. L. - Basseres, A. - Narbonnea, J. F. (2002)
Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea*
Comparative Biochemistry and Physiology Part C 132: 93-104

Wright, D. A. - Welbourn, P. (2002)
Environmental toxicology
Cambridge environmental chemistry series, 11. Cambridge University Press. United Kingdom. Pp 630