

Progetto - Projet

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



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

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

Partner responsabile - Partner responsable : Université de Toulon

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

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

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

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



**Interreg**



UNION EUROPEENNE  
UNIONE EUROPEA



**MARITTIMO-IT FR-MARITIME**

Fonds européen de développement régional  
Fondo Europeo di Sviluppo Regionale

**Prodotto n. T2.2.2**

## **Indice**

1 Introduzione.....	1
2. Mitili come bioindicatori.....	2
2.1 Metodologia di indagine da applicare ai mitili .....	4
Bigliografia.....	18

## 1 Introduzione

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

Il biomonitoraggio offre, quindi, dei vantaggi:

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

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

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

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

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

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

## **2. Mitili come bioindicatori**

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

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

alternativa, il loro reperimento è estremamente semplice grazie alla diffusa presenza di allevamenti specializzati nella produzione e commercializzazione a scopi alimentari in questo tipo di organismi. Anatomia, fisiologia e etologia di questi molluschi sono ampiamente conosciute proprio in virtù della loro ampia diffusione in ambiente ed al loro allevamento.

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

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

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

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

Dopo un definito periodo di mantenimento nell'ambiente oggetto di studio, gli organismi recuperati possono essere utilizzati per la determinazione analitica dei contaminanti bioaccumulati nonché per effettuare indagini a livello molecolare, cellulare, istologico, morfologico e fisiologico allo scopo di verificare eventuali variazioni indotte da uno o più contaminanti; tali alterazioni (*biomarkers*) (Fossi, 2001; Bianchi e Morri, 2003) possono anticipare i cambiamenti nei più alti livelli dell'organizzazione biologica (popolazioni, comunità, ecosistemi) (Sandulli, 2004). Di conseguenza, sono dei rapidi indicatori degli effetti biologici, dovuti ai contaminanti chimici, che si verificano più lentamente nel corso del tempo (Ortiz-Zarragoitia e Cajaraville, 2006).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- metalli pesanti: arsenico, cadmio, cromo totale, rame, mercurio, nichel, piombo, zinco e cromo esavalente, vanadio, alluminio e ferro come parametri aggiuntivi;
- idrocarburi policiclici aromatici: Acenaftilene, Benzo(a)antracene, Fluorantene, Naftalene, Antracene, Benzo(a)pirene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(k)fluorantene, Benzo(g,h,i)perilene, Acenaftene, Fluorene, Fenantrene, Pirene, Dibenzo(a,h)antracene, Crisene, Indeno(1,2,3,c-d)pirene e loro sommatoria;
- policlorobifenili: congeneri PCB 28, PCB 52, PCB 77, PCB 81, PCB 101, PCB 118, PCB 126, , PCB 138, PCB 153, PCB 156, PCB 169, PCB 180 e loro sommatoria;



- composti organostannici: tributilstagno;
- pesticidi organoclorurati: Aldrin, Dieldrin, Endrin, alfa-HCH, beta-HCH, gamma-HCH (Lindano), DDD, DDT, DDE (per ogni sostanza la somma degli isomeri 2.4 e 4.4), HCB, eptacloro e epossido.

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

#### *Metalli pesanti*

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

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

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

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

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

#### *Idrocarburi policiclici aromatici*

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

Si trasferiscono 10 g di campione umido omogeneizzato in una provetta monouso da 50 mL, unendo una barretta di ceramica per rompere gli agglomerati e mantenere omogeneo il

campione. Si aggiungono, quindi, 12 mL di acetonitrile e si pone la provetta su un agitatore orizzontale per 15 minuti. Si aggiungono 6 g  $MgSO_4$  e 1.5 g di NaCl, si agita per 1 minuto e si procede a centrifugare per 10 minuti a 5000 giri.

Per la procedura di estrazione in fase solida dispersiva (d-SPE, *dispersive Solid Phase Extraction*), si trasferiscono 4 mL del surnatante (acetonitrile) in provetta monouso da 15 mL contenente 400 mg di PSA, 400 mg di C18 *end capped*, 1200 mg  $MgSO_4$ , si agita per 1 minuto e si centrifuga 10 minuti per 3200 giri.

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

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

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

### *Policlorobifenili*

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

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

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

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

L'analisi dei campioni è abbinata da un bianco procedurale che deve seguire le stesse procedure a cui sono sottoposti i campioni. I risultati della determinazione del bianco vengono

utilizzati per correggere le misure dei campioni o per rilevare errori dovuti all'interferenza di contaminanti presenti nei reagenti.

La preparazione prevede che il campione da analizzare sia liofilizzato prima di essere estratto, per eliminare l'umidità ed aumentare l'efficienza dell'estrazione. Viene pesata un'aliquota di campione omogeneizzato alla quale viene aggiunta la quantità nota dello standard di estrazione contenente i congeneri marcati ed essa viene sottoposta alla liofilizzazione.

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

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

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

### *Tributilstagno*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La quantificazione dell'analita avviene mediante spettrometria ICP-MS (ELAN 9000 PerkinElmer), utilizzando gli isotopi più abbondanti dello stagno:  $^{118}\text{Sn}$  e  $^{120}\text{Sn}$ . Si utilizza un micronebulizzatore PFA e una camera di nebulizzazione ciclonica raffreddata a 2 °C, per minimizzare la quantità di solvente in torcia; l'utilizzo di ossigeno post colonna diminuisce la quantità di sostanza organica che si deposita sull'interfaccia.

### *Pesticidi organoclorurati*

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

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

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

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

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

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

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

- il citocromo P450 come indicatore dell'esposizione a contaminanti organici PAH, PCB, ecc.;
- alterazioni del DNA dovute a mutageni inorganici o xenobiotici organici;

- inibizione dell'acetilcolinesterasi (AChE) indotta da organofosfori, carbammine, Cd, Pb, Cu, ecc.;
- sintesi delle metallotioneine a livello epatico e in altri tessuti a seguito dell'esposizione a metalli pesanti Zn, Cu, Cd, Hg, Fe, ecc.;
- stimolazione di enzimi antiossidanti (superossidodismutasi, catalasi, glutatione-transferasi) in seguito all'esposizione a ROS, radicali liberi, perossidazione lipidica;
- la vitellogenina, la cui produzione viene indotta da sostanze ad attività estrogenica (De Meo, 2011).

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

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

L'attività dell'acetilcolinesterasi viene misurata nell'emolinfa opportunamente centrifugata per 5 minuti a 3.000 xg. Il sovrantante viene utilizzato per determinare l'attività della

acetilcolinesterasi (AChE) secondo il metodo di Ellman alla temperatura di  $18 \pm 1$  °C, alla lunghezza d'onda di 412 nm, con coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ ) di  $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

La stabilità delle membrane lisosomiali viene misurata in emociti liberamente circolanti attraverso l'analisi del tempo di ritenzione del rosso neutro (NRRT). Dopo il prelievo le cellule sono lasciate aderire per 15 minuti a 4°C in camera umida. Le cellule sono quindi incubate con una soluzione di Rosso Neutro ed esaminate ad intervalli di 15 minuti (fino ad un tempo massimo di 120 minuti) per determinare il tempo al quale il 50% degli emociti presenta il Rosso Neutro non più compartimentalizzato nei lisosomi ma rilasciato nel citosol. La soluzione stock di Rosso Neutro è preparata dissolvendo 28.8 mg di colorante in 1 mL di dimetilsulfossido (DMSO) e conservata a 4 °C per non più di 3 settimane; al momento dell'analisi 10  $\mu\text{L}$  di soluzione stock sono diluiti in 5 mL di soluzione fisiologica.

Il rapporto granulociti su ialinociti viene analizzato su aliquote di emolinfa che vengono opportunamente disperse su vetrino. Dopo l'asciugatura, le cellule adese vengono fissate in Baker's Ca-formolo (10 mL di Formaldeide al 40%; 1 g di  $\text{CaCl}_2$ , NaCl al 2.5%, portato a volume con acqua distillata). I vetrini dopo essere risciacquati vengono colorati con colorante di Giemsa, prima di essere montati in gelatina di glicerolo. L'osservazione effettuata in microscopia ottica (1000x) consente la valutazione del numero di granulociti e ialinociti, dopo aver contato almeno 200 cellule per ogni campione.

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

L'analisi dell'accumulo di lipofusina viene effettuata su sezioni criostatiche di 8  $\mu\text{m}$  di ghiandola digestiva, fissate in Baker's Ca-formolo per 15 minuti a 4 °C; successivamente i vetrini vengono

risciacquati in acqua distillata ed immersi per 5 minuti nella soluzione di colorazione costituita da cloruro ferrico 1% e K-ferricianuro 1% (5:1) portata al volume di 50 mL con acqua distillata. I vetrini sono quindi lavati prima in acido acetico al 2% e poi in acqua distillata e infine montati in gelatina di glicerolo. Il software d'analisi d'immagine Image Pro Plus 6.2 viene utilizzato per determinare l'intensità di colorazione dei granuli di lipofuscina, evidenziati come granuli dal colore verde-azzurro all'interno dei tubuli della ghiandola digestiva dei mitili. L'accumulo di lipofuscina viene espresso in termini di intensità di colorazione per  $\mu\text{m}^2$  di tessuto totale.

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

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

L'analisi dei sistemi enzimatici antiossidanti viene effettuata su campioni di ghiandola digestiva omogenati (1:5 p/v) in un tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.5, con NaCl 2.5%, PMSF (fenilmetilsolfonilfluoruro) 0.1 mM e inibitori di proteasi: aprotinina 0.008 TIU/mL, leupeptina 1



$\mu\text{g/mL}$ , pepstatina  $0.5 \mu\text{g/mL}$ . Dopo centrifugazione a  $100.000 \text{ xg}$  per 1 ora a  $4^\circ\text{C}$ , la frazione citosolica è aliquotata e conservata a  $-80^\circ\text{C}$ . Le attività enzimatiche dei principali sistemi antiossidanti sono analizzate attraverso saggi spettrofotometrici a  $18^\circ\text{C}$ . L'attività della *catalasi* (CAT), sistema antiossidante che detossifica il perossido d'idrogeno catalizzando la sua trasformazione in acqua e ossigeno, viene valutata seguendo la diminuzione di assorbanza a  $\lambda=240 \text{ nm}$ ,  $\epsilon=-0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Il saggio è condotto per un minuto in un volume finale di 1 mL contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7, con  $\text{H}_2\text{O}_2$  12 mM ed opportune aliquote di campione. Gli enzimi *glutathione perossidasi* (GPx), Se-dipendenti e Se-indipendenti, agiscono nei confronti dei perossidi organici e inorganici riducendoli nei corrispondenti alcool. L'attività enzimatica viene misurata seguendo l'azione di un sistema di enzimi accoppiati dove il glutathione ossidato GSSG, formato nella reazione catalizzata dalla perossidasi, viene convertito in forma ridotta GSH per azione della glutathione reduttasi. Nel saggio viene seguito il consumo del NADPH tramite diminuzione di assorbanza a  $\lambda=340 \text{ nm}$ ,  $\epsilon=-6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . L'attività delle forme enzimatiche Se-dipendenti e dell'insieme di quelle Se-dipendenti e Se-indipendenti è stata misurata usando come substrato rispettivamente perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) per verificare l'efficacia di detossificazione degli enzimi su perossidi inorganici e idroperossido di cumene (CuPx) per valutarne l'azione su perossidi organici. La reazione è eseguita in un volume finale di 1 mL contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.5, EDTA 1 mM, GSH 2 mM, NADPH 0.24 mM, 0.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  o 0.8 mM CuPx, 1U GR ed opportune aliquote di campione. La famiglia enzimatica delle *glutathione S-transferasi* (GST) catalizza le reazioni di coniugazione tra diverse classi di molecole con il glutathione ridotto (GSH), diminuendone la reattività o rendendole maggiormente idrosolubili e quindi eliminabili dall'organismo. L'analisi è condotta tramite saggio spettrofotometrico seguendo l'andamento dell'assorbanza del complesso formatosi da GSH e 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) rilevata a  $\lambda=340 \text{ nm}$ ,  $\epsilon=-9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La reazione è seguita per un minuto in un volume finale di 1 mL contenente tampone K-fosfato 100 mM pH 6.5, CDNB 1.5 mM, GSH 1 mM ed opportune aliquote di campione. L'enzima *glutathione reduttasi* (GR), responsabile della trasformazione del glutathione ossidato GSSG nella forma ridotta GSH tramite l'utilizzo di NADPH, viene saggiato mediante l'analisi del decremento di assorbanza rilevata a  $\lambda=340 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = -6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , dovuta all'ossidazione del NADPH. La reazione viene

effettuata in un volume di saggio finale di 1 mL contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7, GSSG 1 mM, NADPH 0,12 mM ed opportune aliquote di campione. Per la determinazione del *glutathione totale (GSH)* gli omogenati di ghiandola digestiva vengono preparati in acido sulfosalicilico 5% con EDTA 4 mM (1:5 p/v). I campioni vengono lasciati in ghiaccio per 45 minuti per la deproteinizzazione, poi centrifugati a 37.000 xg per 15 minuti. Il glutathione totale viene determinato nel sovranatante misurando per via spettrofotometrica, alla lunghezza d'onda  $\lambda=412$  nm, l'intensità di reazione tra i gruppi -SH e DTNB. Il saggio è condotto in tampone K-fosfato 100 mM pH 7, EDTA 1 mM, DTNB 0,1 mM, NADPH 0,24 mM, glutathione riduttasi 1 U ed opportune aliquote di campione. I valori di assorbanza ottenuti vengono quantificati mediante una curva di calibrazione standard a concentrazioni note di glutathione ridotto. La *Capacità Antiossidante Totale* viene stimata tramite il saggio TOSC che misura l'efficienza complessiva di un tessuto biologico di neutralizzare diverse forme di ROS tra cui i radicali perossilici (ROO•) e i radicali idrossilici (HO•). Le analisi vengono effettuate sulla componente citosolica dei campioni di ghiandola digestiva omogenati (1:5 p/v) in un *working-buffer* costituito da tampone K-fosfato 50 mM pH 7.5, NaCl 2.5%. Gli omogenati così ottenuti vengono centrifugati a 100.000 xg per 1 ora e 10 minuti a 4°C, e la frazione citosolica subaliquotata e conservata a - 80°C fino al momento delle analisi. Il saggio TOSC-A (*Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay*) prevede la reazione tra le diverse forme di radicali che vengono artificialmente generati, e l'acido  $\alpha$ -chetoy-metiolbutirrico (KMBA), che funge da substrato e si ossida liberando gas etilene. La produzione di etilene risulta quantitativamente diminuita in presenza di agenti antiossidanti (come quelli contenuti nel materiale biologico) che reagiscono con i radicali neutralizzandoli e sottraendoli alla reazione con il KMBA. I radicali perossilici (ROO•) vengono generati attraverso l'omolisi termica del 2,2'-azo-bis-amidinopropano (ABAP) mentre i radicali idrossilici (HO•) attraverso la reazione di Fenton ferro-ascorbato. Le reazioni vengono condotte in appositi contenitori di vetro da 10 mL (*vials*), sigillati con speciali tappi muniti di setto, mantenuti alla temperatura costante di 35°C in bagno termostatico continuamente agitato per consentire una generazione costante delle varie forme di radicali. Le condizioni finali di saggio sono le seguenti:

- per l'analisi con i radicali perossilici (ROO•): un volume variabile di campione, KMBA 0.2 mM e ABAP 20 mM in tampone K-fosfato 50 mM pH 7.4;

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

Il KMBA viene ossidato dalle diverse forme di radicali generando gas etilene. La formazione dell'etilene è monitorata nel tempo mediante analisi gas-cromatografica su colonna capillare "Supelco SPB-1" (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm) e mediante rivelatore FID (*Flame Ionization Detector*), utilizzando le seguenti condizioni strumentali: temperatura del forno pari a 35°C, temperatura del FID pari a 220°C, temperatura d'iniezione pari a 160°C, flusso d'idrogeno pari a 30 mL/minuto; flusso d'elio pari a 3 mL/minuto. La differenza di produzione d'etilene tra la reazione nei *vials* di controllo e la reazione nei *vials* contenenti i campioni, è calcolata matematicamente, integrando l'area al di sotto delle rispettive curve cinetiche della produzione d'etilene in funzione del tempo, considerando che ogni campione viene letto ogni 12 minuti per un tempo totale di saggio pari a 96 minuti. I risultati ottenuti permettono di quantificare il parametro TOSC, compreso tra 0 e 100, indice della capacità complessiva del campione analizzato, di neutralizzare le varie forme di specie reattive dell'ossigeno. Il valore TOSC sperimentale è ottenuto secondo la formula:

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

dove  $\int\text{SA}$  e  $\int\text{CA}$  sono gli integrali delle aree al di sotto delle curve che rappresentano rispettivamente le reazioni di un campione SA (*Sample Area*), e del controllo CA (*Control Area*).

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

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

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

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

## Bigliografia

- Adams, S.M., Shorey, C.D., 1998. Energy dispersive spectroscopy of granular concretions in the mantle of the freshwater mussel *Hyridella depressa* from Lake Burragorang as a technique to monitoring metals in aquatic systems. *Aquatic. Toxicol.*, 44: 93-102.
- Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar. Pollut. Bull.*, 49: 704 -712.
- Beone, G.M., Ravera, O., 2003. Vantaggi e limiti del monitoraggio ambientale mediante l'analisi chimica dei Lamellibranchi. *Studi Trent. Sci. Nat. Acta Biol.*, 80: 79-84.
- Bianchi, C.N., Morri, C., 2003. Indicatori biologici ed ecologici nell'ambiente marino. In: Ferretti O. (ed), *Studi per la creazione di strumenti di gestione costiera: Golfo del Tigullio*. ENEA, Centro Ricerche Ambiente Marino, La Spezia: 111-120.
- Bryan, G.W., Langston W.J., 1992. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special references to UK estuaries: a review. *Environ. Pollut.*, 76: 89-131.
- Byrne, M., Vesk, P.A., 2000. Elemental composition of mantle tissue granules in *Hyridella depressa* (Unionida) from the Hawkesbury - Nepean River system, Australia: influence from catchment chemistry. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*, 51: 183-192.
- Ciborowski, J.J.H., Corkum, L.D. 1988. Organic contaminants in adult aquatic insects of the St. Clair and Detroit rivers, Ontario, Canada. *J. Great Lakes Res.*, 14: 148-156.
- De Kock, W.C., Kramer, K.J.M., 1994. Active biomonitoring (ABM) by translocation of bivalve molluscs. In: K.J.M. Kramer (ed), *Biomonitoring of coastal waters and estuaries*. CRC Press Inc.: 51-84.
- De Meo, E., 2011. La vitellogenina in *Mytilus galloprovincialis* e la sua utilizzazione quale biomarcatore dello stato d'inquinamento del Golfo di Napoli. (Ph. D. tesi) Università Federico II, Napoli, Italia, 80 pp.
- Fossi, M.C., 2000. Biomarkers. Strumenti di diagnosi e prognosi ambientale. Rosini Editrice: 134 pp.
- Fossi, M.C., 2001. Biomarkers: strumenti di diagnosi e prognosi ecotossicologica dell'ambiente marino costiero. *Biol. Mar. Medit.*, 8 (2): 146-154.

- Foulkes, E.C. (Ed.). 1982. Biological Roles of Metallothionein. Elsevier: 327 pp.
- Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., Fabbri, E., 2011. The  $\beta$ -blocker propranolol affects cAMP-dependent signaling and induces the stress response in Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, 101(2): 299-308.
- Giesy, J.P., Graney, R.L., Newsted, J.L., Rosiu, C.J., Benda, A., Kreis, R.G.Jr., Horvath, F.J., 1988. Comparison of three sediment bioassay methods using Detroit River sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7: 483-498.
- Giesy, J.P., Hoke, R.A., 1989. Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design. *J. Great Lakes Res.*, 15: 539-569.
- Girón-Pérez, M.I., 2010. Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution. *IS J.*, 7: 149-156.
- Goldberg, E.D., 1975. The Mussel Watch. *Mar. Pollut. Bull.*, 6: 111-113.
- Gorbi, S., Virno Lamberti, C., Notti, A., Benedetti, M., Fattorini, D., Moltedo, G., Regoli, F., 2008. An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 65: 34-49.
- Gupta, S.K., Singh, J., 2011. Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: a review. *IIOAB J.*, 2: 49-57.
- Jones, R.A., Lee, G.F., 1978. Evaluation of the elutriate test as a method of predicting contaminant release during open water disposal of dredged sediment and environmental impact of open water dredged material disposal. Volume I: Discussion. U.S. Army Corps of Engineers, Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS. Technical Report D78-45.
- Klaverkamp, J.F., Dutton, M.C., Majewski, H.S., Hunt, R.V., Wesson, L.J., 1991. Evaluating the effectiveness of metal pollution controls in a smelter by using metallothionein and other biochemical responses. In: M.C. Newman and A.W. McIntosh (Eds.). *Metal Ecotoxicology. Concepts & Applications*. Lewis Publ.: 33-64.
- Lee, G.F., Jones, R.A., Saleh, F.Y., Mariani, G.M., Homer, D.H., Butler, S.S., Bandyopadhyay, P., 1978. Evaluation of the elutriate test as a method of predicting contaminant release during open water disposal of dredged sediment and environmental impact of open

- water dredged material disposal. Volume II: Data Report. U.S. Army Corps of Engineers, Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS. Technical Report D78-45.
- Malins, D.C., Ostrander G.K. (Eds.), 1994. Aquatic Toxicology. Molecular, biochemical and cellular perspectives. Lewis Publ.: 539 pp.
- Malueg, K.W., Schuytema, G.S., Gakstatter, J.H., Krawczyk, D.F., 1983. Effect of Hexagenia on *Daphnia* response in sediment toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem., 2: 73-82.
- Martin-Diaz, M.L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., Fabbri, E., 2009. Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol., 94: 177-185.
- Munawar, M., Hänninen, O., Roy, S., Munawar, N., Kärenlampi L., Brown, D., 1995. Bioindicators of environmental health. SBP Academic Publ.: 265 pp.
- Nebeker, A.V., McCrady, J.K., Shar, R.M., McAuliffe, C.K., 1983. Relative sensitivity of *Daphnia magna*, rainbow trout and fathead minnows to endosulfan. Environ. Toxicol. Chem., 2: 69-72.
- O' Connor, T.O., Cantillo, A.Y., Lauenstein, G.G., 1994. Monitoring of temporal trends in chemical contamination by the NOAA National Status and Trends Mussel Watch Project. In: K.J.M. Kramer (ed), Biomonitoring of coastal waters and estuaries, CRC Press Inc.: 29-50.
- Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville M.P., 2006. Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 50: 361-369.
- Phillips, D.J.H., Segar, D.A., 1986. Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: programme design imperatives. Mar. Pollut. Bull., 1: 10-17.
- Pretti, C., Cognetti-Varriale, A.M., 2001. The use of biomarkers in aquatic biomonitoring: the example of esterases. Aquat. Conserv., 11: 299-303. DOI 10.1002/aqc.457
- Ravera, O., 2001. Monitoring of the aquatic environment by species accumulator of pollutants: a review. J. Limnol., 60: 63-78. DOI 10.4081/jlimnol.2001.s1.63
- Regoli, F., Pellegrini, D., Cicero, A.M., Nigro, M., Benedetti, M., Gorbi, S., Fattorini, D., D'Errico, G., Di Carlo, M., Nardi, A., Gaion, A., Scuderi, A., Giuliani, S., Romanelli, G., Berto, D., Trabucco,

- B., Guidi, P., Bernardeschi, M., Scarcelli, V., Frenzilli, G., 2014. A multidisciplinary weight of evidence approach for environmental risk assessment at the Costa Concordia wreck: Integrative indices from Mussel Watch. *Mar. Environ. Res.*, 96: 92-104.
- Sandulli, R., 2004. Il ruolo degli indicatori biologici nella valutazione dello stato dell'ambiente marino. *Biol. Mar. Medit.*, 11 (2): 185-192.
- Scarpato, A., Giordano, P. Calabretta, E., Romanelli, G., Amici, M., Amato, E., Cicero, A.M., 2006. Sviluppo di una rete di sorveglianza della qualità delle acque marino-costiere del Mediterraneo nordoccidentale attraverso l'uso di bioindicatori (Mussel Watch attivo): approccio metodologico e risultati preliminari. *Biol. Mar. Medit.*, 13 (1): 423-433.
- Schloesser, D.W. 1988. Zonation of mayfly nymphs and caddisfly larvae in the St. Marys River. *J. Great Lakes Res.*, 14: 227-233.
- USEPA, 1998. Method 7471B (SW846): Mercury in solid or semisolid waste (Cold-Vapor Technique). Washington, DC.
- USEPA, 2010. Method 1668C Chlorinated biphenyl congeners in water, soil, sediment, biosolids, and tissue by HRGC/HRMS. Washington DC.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, F., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146(3): 281-300.
- Wang, W.-X., Fisher, N.S., 1999. Delineating metal accumulation pathways for aquatic invertebrates. *Sci. Total Environ.*, 237/238: 459-472.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G., 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal. Chim. Acta*, 606: 135-150. DOI 10.1016/j.aca.2007.11.018