

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 - PESCI

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

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 - Pesci	Anna Reboa, Laura Cutroneo (UNIGE), Valentina Vitiello (ISPRA)	Marco Capello (UNIGE), Maria Elena Piccione (ISPRA)	Alberta Mandich (UNIGE), Véronique Lenoble (UTLN)
Data :	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 pesci.

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. Dans le détail de ce produit, on retrouve la méthodologie appliquée aux poissons.



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. Pesci come bioindicatori	2
2.1. Metodologia di indagine da applicare ai pesci	3
2.1.1 Protocollo da applicare durante la fase di campionamento	5
2.2.2 Protocollo da applicare in laboratorio.....	6
2.3 Analisi dei contaminanti nei tessuti dei pesci.....	13
Bigliografia.....	15

1 Introduzione

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

Il biomonitoraggio offre, quindi, dei vantaggi:

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

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

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

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

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

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

2. Pesci come bioindicatori

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

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

2.1. Metodologia di indagine da applicare ai pesci

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

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

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

2.1.1 Protocollo da applicare durante la fase di campionamento

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

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

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

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

2.2.2 Protocollo da applicare in laboratorio

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FEGATO

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

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

Le alterazioni, osservate per ogni campo, sono:

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

dove il valore w indica il grado di reversibilità:

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

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

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

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

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

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

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

BRANCHIE

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

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

Le alterazioni, osservate per ogni campo, sono:

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

dove il valore w indica il grado di reversibilità:

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

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

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

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

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

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

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

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

$$I_n = LI_n + GI_n$$

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

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

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

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

2.3 Analisi dei contaminanti nei tessuti dei pesci

Metalli pesanti

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

1. Determinazione del peso umido di ciascun campione
2. Digestione del campione tramite un processo di mineralizzazione con acqua regia (Metodo 3050B corretto con protocollo UNI EN 13657:2004 per campioni organici), il quale richiede:
 - addizione di 9 mL di acido cloridrico (HCl) e 3 mL di acido nitrico (HNO₃)
 - dopo 24 h a temperatura ambiente, trasferimento in un digestore (*Digi block* ED36S) a 40 °C per ~1 h aggiungendo alcune gocce di perossido di idrogeno puro (H₂O₂)
 - innalzamento della temperatura a 95 °C per ½ h
 - diluizione del campione fino al raggiungimento di 100 mL di volume
3. Determinazione dei metalli in traccia (Metodo 6010D) tramite ICP-OES (Optima 8300)

Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

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

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

Bigliografia

- Abdel-Moneim, A.M., Al-Kahtani, M.A., Elmenshawy, O.M., 2012. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere*, 88: 1028–1035. DOI 10.1186/s40201-015-0222-y
- Abrahamson, A., 2007. Gill EROD activity in fish: a biomarker for waterborne Ah-receptor agonists. *Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 311, 52 pp.
- Arockia Vasanthi, L., Revathi, P., Mini, J., Munuswamy, N., 2013. Integrated use of histological and ultrastructural biomarkers in *Mugil cephalus* for assessing heavy metal pollution in Ennore estuary, Chennai. *Chemosphere*, 91: 1156–1164.
- Au, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar. Pollut. Bull.*, 48: 817–834. DOI 10.1016/j.marpolbul.2004.02.032.
- Ben Ameer, W., El Megdiche, Y., de Lapuente, J., Barhoumi, B., Trabelsi, S., Ennaceur, S., Camps, L., Serret, J., Ramos-López, D., Gonzalez-Linares, J., Touil, S., Ridha Driss, M., Borràs, M., 2015. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. *Chemosphere*, 135: 67-74. DOI 10.1016/j.chemosphere.2015.02.050
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish. Dis.*, 22: 25-34. DOI 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x
- Bocca, B., Crebelli, R., Menichini, E., 2003. Presenza degli idrocarburi policiclici aromatici negli alimenti. Istituto Superiore di Sanità, Rapporti ISTISAN 03/22, pp. 45.
- 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.
- El-Moselhy, K.M., Othman, A.I., Abd El-Azem, H., El-Metwally, M.E.A., 2014. Bioaccumulation of heavy metals in some tissues of fish in the Red Sea, Egypt. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1:, 97-105. DOI 10.1016/j.ejbas.2014.06.001

- Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A., 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesqui. Vet. Bras.*, 27: 103-109. DOI 10.1590/S0100-736X2007000300004
- Giari, L., Simoni, E., Manera, M., Dezfuli, B.S., 2008. Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure. *Ecotox. Environ. Saf.*, 70: 400-410. DOI 10.1016/j.ecoenv.2007.08.013
- Giesy, J.P., Graney, R.L., Newsted, J.L., Rosiu, C.J., Benda, A., Kreis, R.G.Jr., Horvath, F.J., 1988. Comparison of three sediment bioassay methods using Detroit River sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7: 483-498.
- Giesy, J.P., Hoke, R.A., 1989. Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design. *J. Great Lakes Res.*, 15: 539-569.
- Gorbi, S., Regoli, F., 2004. Induction of cytochrome P4501A and biliary PAH metabolites in European eel *Anguilla anguilla*: seasonal, dose- and time-response variability in field and laboratory conditions. *Mar. Environ. Res.*, 58: 511-515.
- 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.
- 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.
- 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.

- Mitchell, S.O., Baxter, E.J., Holland, C., Rodger, H.D., 2012. Development of a novel histopathological gill scoring protocol for assessment of gill health during a longitudinal study in marine-farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquacult. Int.*, 20: 813–825. DOI 10.1007/s10499-012-9504-x
- Murtala, B.A., Abdul, W.O., Akinyemi, A.A., 2012. Bioaccumulation of heavy metals in fish (*Hydrocynus forskahlii*, *Hyperopisus bebe occidentalis* and *Clarias gariepinus*) organs in downstream Ogun coastal water, Nigeria. *J. Agr. Sci.*, 4: 51–59. DOI 10.5539/jas.v4n11p51
- Nebeker, A.V., McCrady, J.K., Shar, R.M., McAuliffe, C.K., 1983. Relative sensitivity of *Daphnia magna*, rainbow trout and fathead minnows to endosulfan. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2: 69-72.
- Poleksić, V., Lenhardt, M., Jaric, I., Djordjevic, D., Gacic, Z., Cvijanovic, G., Raskovic, B., 2010. Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758). *Environ. Toxicol. Chem.*, 29: 515– 521. DOI: 10.1002/etc.82
- Pretti, C., Cognetti-Varriale, A.M., 2001. The use of biomarkers in aquatic biomonitoring: the example of esterases. *Aquat. Conserv.*, 11: 299–303. DOI 10.1002/aqc.457
- Ravera, O., 2001. Monitoring of the aquatic environment by species accumulator of pollutants: a review. *J. Limnol.*, 60: 63–78. DOI 10.4081/jlimnol.2001.s1.63
- Richardson, N., Gordon, A.K., Muller, W.J., Pletschke, B.I., Whitfield, A.K., 2010. The use of liver histopathology, lipid peroxidation and acetylcholinesterase assays as biomarkers of contaminant-induced stress in the Cape stumpnose, *Rhabdosargus holubi* (Teleostei: Sparidae), from selected South African estuaries. *Water SA*, 36: 407-416.
- Schloesser, D.W. 1988. Zonation of mayfly nymphs and caddisfly larvae in the St. Marys River. *J. Great Lakes Res.*, 14: 227-233.
- Suarez Rocha, P., Luiz Luvizotto, G., Kosmehl, T., Böttcher, M., Storch, V., Braunbeck, T., Hollert, H., 2009. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. *Ecotox. Environ. Safe.*, 72: 1842-1848. DOI 10.1016/j.ecoenv.2009.04.013

- Van Dyk, J.C., Cochrane, M.J., Wagenaar, G.M., 2012. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. *Chemosphere*, 87: 301-311. DOI 10.1016/j.chemosphere.2011.12.002
- 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