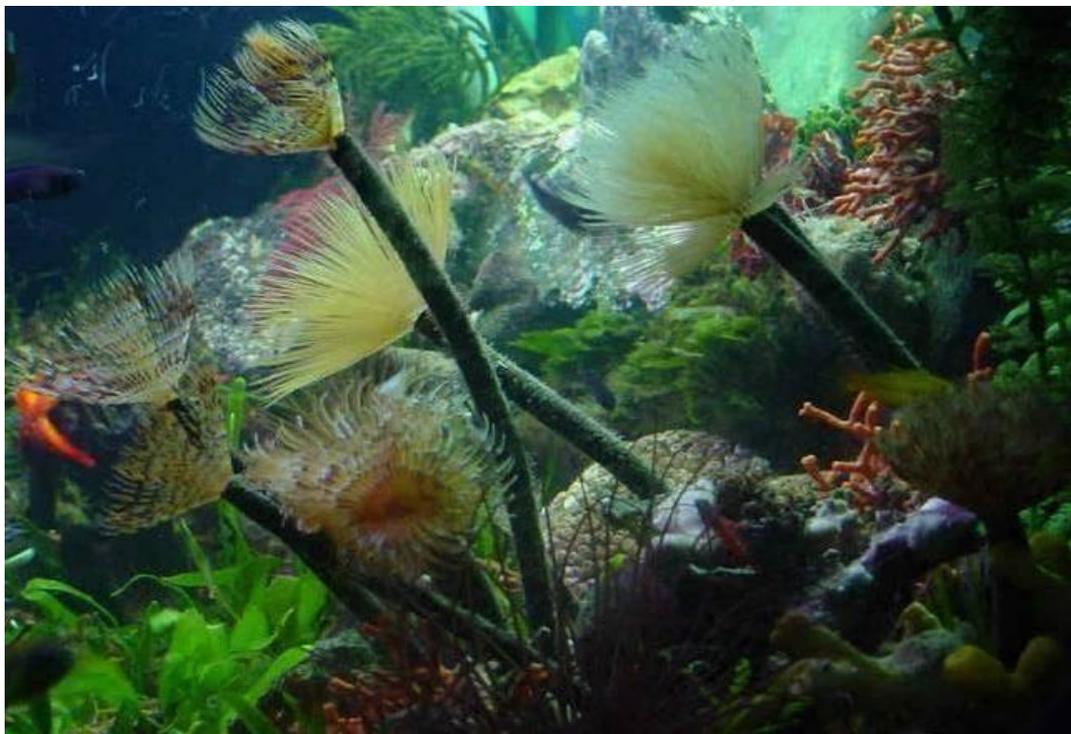




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO
FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA ANIMALE
“G.Reverberi”

DOTTORATO IN BIOLOGIA ANIMALE XXII CICLO

**Risposta funzionale di *Sabella spallanzanii*
a diversi livelli di contaminazione
e suo possibile uso come bioindicatore**



Dottoranda:
Dr.ssa Sabrina Frenna

Tutor:
Ch.^{mo} Prof. Antonio Mazzola

Coordinatore:
Ch.^{mo} Prof. Nicolò Parrinello

Co-Tutor:
Ch.^{mo} Prof. Santino Orecchio

Dr.ssa Salvatrice Vizzini



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO
FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA ANIMALE
“G.Reverberi”

DOTTORATO IN BIOLOGIA ANIMALE XXII CICLO

**Risposta funzionale di *Sabella spallanzanii*
a diversi livelli di contaminazione
e suo possibile uso come bioindicatore**

Dottoranda:
Dr.ssa Sabrina Frenna

Tutor:
Ch.^{mo} Prof. Antonio Mazzola

Coordinatore:
Ch.^{mo} Prof. Nicolò Parrinello

Co-Tutor:
Ch.^{mo} Prof. Santino Orecchio

Dr.ssa Salvatrice Vizzini

SOMMARIO

1. <u>INTRODUZIONE</u>	1
1.1 – Gli organismi bioindicatori: i policheti	2
1.1.1 – Forme e funzioni dei policheti	3
1.1.2 – <i>Sabella spallanzanii</i>	7
1.1.2 a - L'influenza di <i>Sabella spallanzanii</i> sull'ecosistema marino e il suo ruolo da bioindicatore	9
1.2 – I <i>biomarkers</i> negli studi eco tossicologici	12
1.3 – Bioaccumulo	
1.4 – Biodisponibilità	17
1.5 – Biotrasformazione	
1.6 – Metalli pesanti	18
1.6.1 – Aspetti tossicologici e bioaccumulo negli organismi marini	22
1.6.1a - Cadmio	26
1.6.1b - Cromo	
1.6.1c - Rame	27
1.6.1d - Nichel	
1.6.1e - Zinco	
1.6.1f - Piombo	28
1.6.1g - Vanadio	
1.6.1h - Mercurio	29
1.6.1i - Arsenico	
1.7 – Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)	30
1.7.1 – Aspetti tossicologici e bioaccumulo negli organismi marini	36
1.8 – L'acetilcolinesterasi (AChE)	41
1.9 – Glutazione S-transferasi (GST)	44
1.10 – Variazioni nella dieta: studio di isotopi stabili $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$	46
2. <u>OBIETTIVI</u>	47
3. <u>MATERIALI E METODI</u>	48
3.1 – AREE DI STUDIO	
3.2 – CAMPIONAMENTO E METODICHE ANALITICHE PER LE ACQUE	49
3.2.1 – Campionamento	
3.2.2 – Variabili chimico-fisiche	
3.2.3 – Nutrienti	50
3.2.3a - Azoto e fosforo totale	
3.2.3b - Nitriti	51
3.2.3c - Nitrati	
3.2.3d - Ortofosfati	
3.2.4 – Clorofilla-a	
3.2.5 – Isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$	52
3.2.6 – Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)	
3.2.6a - Estrazione	
3.2.6b - Analisi GC/MS	53

3.3 – CAMPIONAMENTO E METODICHE ANALITICHE PER I SEDIMENTI	54
3.3.1 – Campionamento	
3.3.2 – Determinazione del contenuto di acqua	55
3.3.3 – Determinazione del contenuto di sostanza organica	
3.3.4 – Fosforo totale	
3.3.5 – Azoto totale	
3.3.6 – Clorofilla-a e feopigmenti	56
3.3.7 – Metalli	
3.3.7a - Mineralizzazione	57
3.3.7b - Analisi atomica	
3.3.8 – Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)	58
3.3.8a - Preparazione del campione	
3.3.8b - Estrazione <i>soxhlet</i>	
3.3.8c - Analisi GC/MS	59
3.3.9 – Isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$	
3.4 – CAMPIONAMENTO E METODICHE ANALITICHE PER GLI ORGANISMI	
3.4.1 – Campionamento e <i>transplanting</i>	
3.4.2 – Idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nei tubi e nei corpi	64
3.4.2a - Manipolazione del campione	
3.4.2b - Estrazione <i>soxhlet</i>	
3.4.2c - Analisi GC/MS	
3.4.2d – Purificazione degli estratti dei corpi	65
3.4.3 – Metalli pesanti nei tubi e nei corpi	
3.4.3a - Mineralizzazione	
3.4.3b - Analisi atomica	66
3.4.4 – Isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$	
3.4.5 – Saggi di attività enzimatiche e determinazione quantitativa di proteine	67
3.4.5a - Acetilcolinesterasi (AChE)	
3.4.5b - Glutazione S-transferasi (GST)	
3.5 - ANALISI STATISTICA	68
4. <u>RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	70
4.1 – CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DELLE ACQUE	
4.1.1 – Variabili chimico-fisiche	
4.1.2 – Clorofilla <i>a</i> , forme organiche e inorganiche del fosforo e dell'azoto	71
4.1.3 – Isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$	76
4.1.4 – Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)	78
4.2 – CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DEI SEDIMENTI	82
4.2.1 – Clorofilla <i>a</i> , feopigmenti, fosforo e azoto totali	
4.2.2 – Isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$	85
4.2.3 – Contenuto di acqua e sostanza organica	86
4.2.4 – Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)	88
4.2.4a - Origine degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)	96
4.2.4b - Analisi multivariata nMDS	
4.2.5 – Metalli pesanti	101
4.2.5a - Fattore di arricchimento	106
4.2.5b - <i>Sediment Pollution Index</i> (SPI)	110

4.2.5c - Analisi multivariata nMDS	111
4.3 - Analisi multivariata su tutte le variabili della colonna d'acqua e dei sedimenti	112
4.4 - Idrocarburi policiclici aromatici in <i>Sabella spallanzanii</i>	114
4.4.1 – Tubi	
4.4.1a - Fonti di IPA nei tubi dei policheti	117
4.4.2 – Corpi	124
4.4.2a - Fonti di IPA nei corpi dei policheti	127
4.4.2b - Analisi Nmds	131
4.5 – Metalli pesanti in <i>Sabella spallanzanii</i>	133
4.5.1 – Tubi	
4.5.1a - Esperimento di <i>transplanting</i> Cala-Licata	
4.5.1b - Esperimento di <i>transplanting</i> Licata-Cala	135
4.5.1c - Esperimenti di <i>transplanting</i> Acquasanta-Cala e Acquasanta-Licata	137
4.5.1d – Origine dei metalli pesanti nei tubi	139
4.5.2 – Corpi	142
4.5.2a - Esperimento di <i>transplanting</i> Cala-Licata	
4.5.2b - Esperimento di <i>transplanting</i> Licata-Cala	144
4.5.2c - Esperimento di <i>transplanting</i> Acquasanta-Cala/Acquasanta-Licata	146
4.5.2d - Origine dei metalli pesanti nei corpi di <i>S. spallanzanii</i>	148
4.5.2e - Confronto con i dati di letteratura	151
4.5.3 – Analisi multivariata nMDS	152
4.6 – Isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ in <i>Sabella spallanzanii</i>	154
4.7 – Acetilcolinesterasi (AchE) e glutatione S-transferasi (GST)	158
4.8 – Analisi statistica su tutte le variabili dei tubi e dei corpi di <i>Sabella spallanzanii</i>	167
5. <u>CONCLUSIONI</u>	173
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	175

1. INTRODUZIONE

Il mare con le sue risorse rappresenta un importante patrimonio per tutte le forme viventi, uomo compreso, per tale motivo è fondamentale tenerne sotto controllo la salute.

Negli ultimi decenni, la crescente urbanizzazione della fascia marino costiera ha generato, a lungo andare, una forte pressione antropica tale da compromettere fortemente l'integrità dell'ecosistema marino.

Secondo la definizione dell'ONU l'inquinamento marino consiste nell' *“introduzione diretta o indiretta da parte dell'uomo, nell'ambiente, di sostanze e di energie capaci di produrre effetti negativi sull'intero ecosistema, sulle sue diverse componenti sia vegetali che animali, sulle risorse biologiche, sulla qualità delle acque, e di conseguenza anche sulla salute umana e sulle attività marittime”*.

La contaminazione delle zone costiere proviene maggiormente dalle attività agricole e industriali, e dagli insediamenti urbani responsabili della diffusione in mare di un enorme quantitativo di sostanze tossiche provenienti dai rifiuti (Martella *et al.*, 1997; Sumpter *et al.*, 1996; Duzzin *et al.*, 1986).

Gli effetti dell'inquinamento nell'ambiente marino possono verificarsi a differenti livelli di organizzazione biologica, a partire dal livello subcellulare fino a comportare cambiamenti a livello delle comunità (Bayne *et al.*, 1985).

Negli ultimi anni si è ritenuto utile disporre di vari programmi di biomonitoraggio che si basano sull'utilizzazione di *“bioindicatori”* intesi come *“organismi o sistemi biologici usati per valutare la variabilità, generalmente degenerativa, della qualità dell'ambiente, rivelando la presenza di composti inquinanti e il loro grado di concentrazione nelle acque, mediante identificabili alterazioni biochimiche, fisiologiche e morfologiche a loro carico”* (Bargagli *et al.*, 1998).

Un corretto biomonitoraggio, che preveda l'utilizzo di bioindicatori e permetta una buona interpretazione dei dati, richiede una buona conoscenza delle principali caratteristiche delle specie prese in esame: ciclo riproduttivo, anatomia, fisiologia, mobilità, nicchia ecologica e naturale, e bioaccumulo di sostanze dannose per l'organismo.

Le migliori specie bioindicatrici sono distribuite su un vasto areale, sono reperibili in tutti i periodi dell'anno e sono facilmente identificabili. Un bioindicatore può essere definito ottimale quando la concentrazione di un determinato inquinante risulta essere in relazione quantitativa alla risposta biologica della specie considerata (Nimis *et al.*, 1994).

1.1 – Gli organismi bioindicatori: i policheti

Tra gli invertebrati marini, i policheti sono organismi che ben si adattano a condizioni di stress ambientali. Essi sono ecologicamente importanti, e costituiscono il 30-80% del numero totale di fauna bentonica indipendentemente dalla profondità dell'oceano (Hutchings, 1998). Questi organismi sono importanti anche nella formazione delle comunità costiere, formando spesso densi aggregati su superfici sommerse.

Grazie alla loro distribuzione ubiquitaria negli ecosistemi marini, i policheti possono definirsi dei buoni bioindicatori.

Diversi autori hanno utilizzato nei loro studi varie specie di policheti come bioindicatori: *Amphitrite ornata*, *Capitella capitata*, *Chaetopterus variopedatus*, *Diopatra cuprea*, *Eurythoe complanata*, *Glycera americana*, *Harmothoe* sp., *Heteromastus filiformis*, *Lumbrineris fragilis*, *Lycastis ouanaryensis*, *Neanthes arenaceodentata*, *Nereis diversicolor*, *Nereis succinea*, *Perinereis aibuhitensis*, *Phyllodoce novaehollandiae*, *Pseudopotamilla ocellata*, (Cross *et al.*, 1970; Eriksen *et al.*, 1988; Athalye and Gokhale, 1991; Ying *et al.*, 1992; Mason e Storms, 1993; Moore e Dillon, 1993; Ishii *et al.*, 1994; Ahn *et al.*, 1995; Pesch *et al.*, 1995; Méndez e Paèz-Osuna, 1998; Selck *et al.*, 1999; Wen-Xiong *et al.*, 1999). In particolare tra le specie studiate *Nereis diversicolor* è stato dimostrato essere un ottimo bioindicatore ambientale con un ruolo ecologico altamente significativo (Díez *et al.*, 2000; Fourcy *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2006; Ait Alla *et al.*, 2006; Durou *et al.*, 2007, 2008; Sun Zhou, 2008; Montserrat *et al.*, 2008).

Non è quindi sorprendente che i policheti vengano utilizzati negli studi ecotossicologici; infatti, sono stati sviluppati protocolli che prevedono l'utilizzo di policheti nei test di tossicità acuta e cronica (Reish e Gerlinger, 1997; Nipper e Carr, 2003). Quasi 48 specie, appartenenti a 20 famiglie di policheti, sono state utilizzate per questi test, principalmente: Capitellidae, Dinophilidae, Dorvilleidae e Nereididae (Reish e Gerlinger, 1997).

Tra i policheti vi sono alcuni dei migliori rappresentanti d'invertebrati marini filtratori, che nutrendosi del particolato in sospensione, sono in grado di assumere gli inquinanti presenti nell'acqua o nel particolato di cui si cibano, attuando una serie di risposte adattative allo stress chimico e misurabili ai fini del monitoraggio ambientale (McElroy e Means 1988; McElroy 1990; Driscoll e McElroy 1996; Linke-Gamenick *et al.* 2000; Forbes *et al.* 2001; Christensen *et al.* 2002)..

Le specie appartenenti alla famiglia dei Sabellidae, sono filtratori molto efficienti, facilmente riconoscibili per la presenza di un'elaborata corona tentacolare che si espande

dal tubo in cui questi abitano. Un certo numero di studi sui Sabellidae hanno fornito informazioni dettagliate sugli organi di filtrazione e sui meccanismi di cattura delle particelle (Wells, 1952; Fitzsimons, 1965; Lewis, 1968; Bonar, 1972), ma ci sono poche informazioni sugli aspetti qualitativi e quantitativi del processo di filtrazione (Dales, 1957; Shumway *et al.*, 1988; Riisga e Ivarsson, 1990; Clapin, 1996; Licciano *et al.*, 2005; Stabili *et al.*, 2006).

A questa famiglia appartiene, la specie *Sabella spallanzanii* oggetto di studio di questa tesi, il cui ruolo da bioindicatore è stato in parte studiato da alcuni autori (Cavallo e Giangrande, 2002; Bocchetti *et al.*, 2004; Fattorini *et al.*, 2005), ma è ancora poco indagato.

1.1.1 – Forme e funzioni dei policheti

I policheti costituiscono la più grande classe di anellidi con circa 13000 specie quasi tutte marine, di cui almeno 800 presenti nel Mediterraneo. Essi presentano anche la massima irradiazione adattativa con riferimento alla forma del corpo, alle abitudini alimentari e agli habitat occupati. Nel mare i policheti si distribuiscono dalla zona intercotidale fino alle profondità abissali: alcune specie sono pelagiche, ma la maggior parte sono bentoniche e si ripartiscono fra il benthos fisso e quello mobile. Le forme sedentarie prediligono i fondi coerenti, rocciosi, ovvero si insediano sulla vegetazione sommersa o ancora sulle parti rigide di altri organismi (carapaci di granchi, conchiglie di gasteropodi e bivalvi); le forme erranti sono di solito più numerose sui fondi molli, dove possono spostarsi lungo l'interfaccia acqua-sedimento, oppure scavarsi una galleria in quest'ultimo.

Il corpo, lungo, sottile e verastro, è rotondeggiante dorsalmente e appiattito ventralmente ed è costituito da 200 o più metameri o segmenti simili. Le forme erranti hanno quasi sempre metameria omonoma, mentre le forme tubicole sedentarie hanno invece metameria eteronoma, soprattutto per il differenziarsi dei metameri anteriori in strutture per la presa del sedimento o per l'ancoraggio al tubo di abitazione o con significato branchiale.

I policheti presentano un capo differenziato costituito dal prostomio, dal metastomio o segmento boccale e dal peristomio (metameri II-IV/V). Il prostomio reca due corti tentacoli prostomiali mediali, un paio di palpi corti e tozzi e due paia di piccoli occhi dorsali. Il peristomio circonda la bocca ventrale e presenta quattro paia di tentacoli peristomiali dorsali. Questi organi di senso specializzati del tatto, dell'olfatto, e della vista servono per il reperimento del cibo, per sfuggire ai predatori e per altre attività. Su ciascun

lato di ogni metamero è presente un parapodio piatto e bilobato, con un ramo dorsale o notopodio ed un ramo ventrale o neuropodio; ciascuno di questi due lobi reca un cirro ed un ciuffo di setole, e all'interno di ognuno di essi vi sono due spesse acicule chitinose che servono per sostenere e muovere il parapodio (figura 1).

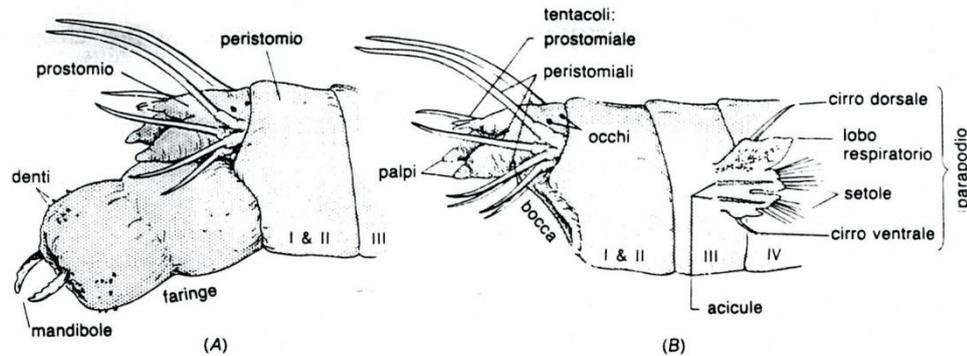


Fig. 1 - Polichete: regione cefalica vista dal lato sinistro. (A) Faringe estroflessa. (B) Faringe non estroflessa.

I parapodi servono per la locomozione sia nel caso dello strisciamento che del nuoto.

Le forme di locomozione nei policheti sono molte varie: alcune specie non si muovono affatto, infatti dopo il periodo larvale si fabbricano un tubo nel quale trascorrono tutto il resto della loro esistenza; le forme pelagiche nuotano aiutandosi con i parapodi, soprattutto con ondulazioni del corpo nel piano orizzontale, come pure numerose forme bentoniche, specialmente nel periodo riproduttivo; altri policheti come *Arenicola* e *Nereis* scavano nella sabbia o nel fango gallerie temporanee o permanenti strisciando per azione propulsiva dei parapodi o della ciliatura, di regola per ondulazioni del corpo nel piano orizzontale.

La parete del corpo (figura 2) è formata da un epitelio monostratificato che secerne una cuticola sovrastante per lo più sottile, non di rado responsabile dell'aspetto iridescente dell'animale.

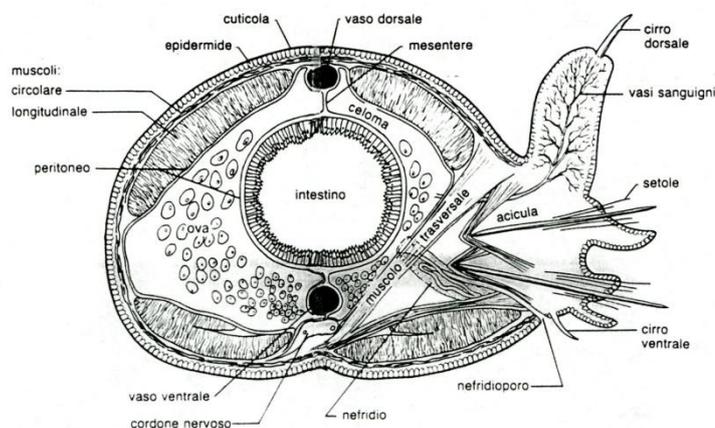


Fig. 2 - Polichete: sezione trasversale schematica.

Sotto l'epidermide si trova un sottile strato muscolare circolare e quattro grandi fasci muscolari longitudinali, due dorsali e due ventrali; in ciascun metamero sono situati i muscoli trasversali responsabili del movimento dei parapodi. La parete del corpo racchiude la cavità celomatica, tappezzata da peritoneo e suddivisa da setti trasversali o dissipamenti. Fra la parete del corpo e l'intestino sono presenti anche i mesenterici mediani, dorsali e ventrali, che dividono il celoma in due camere, destra e sinistra. Il liquido celomatico o linfa contiene varie cellule, tra cui leucociti con funzione fagocitaria: essa trae nutrimento dal sangue e raccoglie cataboliti e gameti.

Il sistema digerente è formato da un canale diritto che comprende: la bocca, una faringe estroflessibile con due mandibole cornee dentate, un corto esofago in cui sfociano due grandi ghiandole digestive e lo stomaco-intestino che si estende dal metamero XII fino all'ano. In alcune specie può esistere l'ingluvie o ventriglio e l'intestino può comprendere dei ciechi.

Estremamente varie sono le abitudini alimentari dei policheti. Alcuni policheti come *Nereis* sono polifagi, altri sono invece specializzati, e tra questi si distinguono forme macrofaghe e microfaghe. Tra i policheti macrofagi vi sono alcune forme fitofaghe e carnivore, le quali rappresentano la maggior parte dei policheti erranti comprese le forme pelagiche. Tra le forme microfaghe si distinguono diverse categorie: generi come *Arenicola* e *Capitella* che si alimentano ingoiando grosse quantità di substrato di cui utilizzano la porzione organica, rappresentata da detrito, diatomee e piccoli organismi. Altri policheti, invece, si nutrono staccando dai granuli di sabbia le minuscole alghe incrostanti. Molte forme sedentarie come *Terebella* e *Flabelligera* utilizzano per alimentarsi dei lunghi tentacoli periorali che allungano attorno a sé e sulla cui faccia ventrale si trova una doccia ciliata che lega le particelle di cibo e le trasferisce fino alla bocca come in un nastro trasportatore. Alcune forme sedentarie come *Sabella* praticano la vorticazione e la filtrazione dell'acqua raccogliendo mediante i tentacoli periorali le particelle in sospensione.

L'apparato circolatorio è formato da due vasi longitudinali (dorsale e ventrale) con rami trasversali in ciascun metamero diretti all'intestino, ai nefridi, alla parete del corpo e ai parapodi. Il plasma sanguigno è rosso, e contiene emoglobina disciolta e corpuscoli incolore. In alcune specie esistono pigmenti di altro tipo: la clorocruorina, ad esempio, è il pigmento respiratorio trovato nel sangue dei Sabellidae. In essa il gruppo prostetico è un derivato della protoporfirina, in cui il gruppo vinile è sostituito da un gruppo formile,

presentando così un'affinità con l'ossigeno inferiore a quella dell'emoglobina umana. Il pigmento è raramente contenuto in emazie che, se presenti, sono anucleate come nei mammiferi.

Gli scambi gassosi sono favoriti dalla ricca vascolarizzazione della parete del corpo; non di rado compaiono delle vere e proprie branchie, quasi sempre situate sui parapodi o in prossimità di questi, e possono avere forme diverse: filiformi, vescicolose, a pettine o ramificate. Tra i policheti sedentari alcuni (Terebellidae) possiedono branchie specializzate sui i primi 2-3 metameri, invece altri (Sabellidae) realizzano gli scambi gassosi mediante la corona di tentacoli che permette loro la presa del cibo.

L'escrezione è quasi sempre affidata ai metanefridi metamerici.

Il sistema nervoso è costituito da: un cervello, dei nervi diretti al capo e ai tentacoli, un cingolo periesofageo che collega il cervello con la catena gangliolare medio-ventrale e un paio di gangli e di nervi laterali in ciascun metamero. Esiste anche un sistema nervoso simpatico che innerva la faringe e la parte iniziale del tubo digerente.

I sessi dei policheti sono separati e le gonadi risultano evidenti solo nel periodo riproduttivo. Le uova e gli spermatozoi vengono prodotti da cellule del peritoneo celomatico e alla maturazione vengono emessi mediante i nefridi attraverso la parete del corpo. Le gonadi si trovano vicino le pareti dei vasi sanguigni dei parapodi o dei nefridi. Nelle famiglie più primitive esse sono presenti in quasi tutti i metameri, in altre famiglie (Sabellidi, Capitellidi, Ofeliidi, ecc.) sono localizzate, invece, nei metameri posteriori. In alcune forme ermafrodite i gameti dei due sessi possono originarsi nello stesso metamero oppure in metameri differenti. Talvolta si tratta di ermafroditismo simultaneo, altre volte invece di ermafroditismo successivo, con inversioni di sesso in qualche caso reversibile e in parte dipendenti da fattori ambientali (traumi meccanici, fame, presenza di individui conspecifici, ecc.). La fecondazione avviene in mare e lo zigote si sviluppa dando origine ad una trocofora ciliata che in seguito si trasforma in un giovane verme. La trocofora ha la forma di una trottola caratterizzata da una corona di ciglia (prototroco) poco al disopra della linea equatoriale e da un ciuffo di ciglia situato al polo superiore (piastra apicale). Al di sotto del prototroco si apre la bocca. In molte specie esistono forme di riproduzione asessuale, regolarmente alternata da quella sessuale.

1.1.2 - *Sabella spallanzanii*

Il polichete *S. spallanzanii* (Gmelin, 1971) (Sabellidae) (figura 3) meglio conosciuto con il vecchio nome di *Spirographis spallanzani* è una specie sedentaria ampiamente distribuita in tutto il Mar Mediterraneo e si trova comunemente sia in aree riparate poco profonde fortemente eutrofiche (ad esempio i mari interni, i porti, gli impianti di acquacoltura) (Currie *et al.*, 2000) che in aree più esposte e pulite fino a 30 metri di profondità.



Fig. 3- *Sabella spallanzanii*

Questa specie vive all'interno di un tubo pergamenaceo e fangoso, ancorato a fondi duri o sabbiosi, o a substrati artificiali, e può sporgere fino a 40 centimetri sopra il sedimento e seppellirsi in profondità fino a 10 centimetri. Morfologicamente presenta un corpo diviso in torace e addome caratterizzato da una corona di tentacoli, o corona branchiale spiralata, che aprendosi all'apice del tubo si estende fuori dal tubo e può raggiungere un diametro di 10-15 centimetri assolvendo alla funzione respiratoria e soprattutto a quella alimentare mediante la filtrazione. Essa è costituita da una serie di filamenti (radioli) con espansioni laterali, dette pinnule, che presentano una fine ciliatura dorsale con duplice funzione: aumentare la superficie adibita alla filtrazione e creare, con il loro battito, una microcorrente, per convogliare le particelle alimentari verso la bocca, situata alla base della corona stessa (Clapin e Evans, 1995) (figura 4).

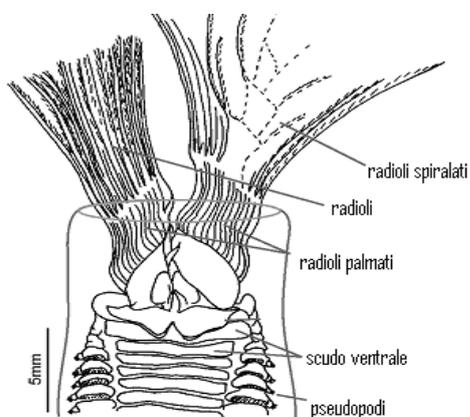


Fig. 4 - Corona branchiale (Clapin & Evans, 1995).

Questa specie forma comunemente dei ciuffi di due o più individui, creando come un tappeto di alimentazione che si estende oltre il sedimento (O'Brien e Keough, 2006). Quando l'anellide è disturbato si ritira nel tubo chiudendone l'apertura. Il tubo è spesso ricoperto da incrostazioni o organismi sessili e il colore del ventaglio varia dal bianco all'arancio, al rosso-marrone (CSIRO, 2001). La corona è composta da due lobi, di cui solo uno è a spirale (NIMPIS, 2002).

Clapin (1996) trova sperimentalmente che questa specie sia un filtratore meno efficiente di altre specie di Sabellidae, ed è per questa ragione che, molto probabilmente, la sua distribuzione è limitata ad aree eutrofiche.

Studi recenti hanno rilevato che in Australia Meridionale, Tasmania, Victoria e Australia Occidentale, *S. spallanzanii* è considerata un ospite infestante non indigeno, sia giunta da circa 10 anni (Clapin e Evans, 1995), colonizzando tratti di mare con caratteristiche simili a quelli osservati nel Mediterraneo. Infatti, questa specie è considerata altamente invasiva ed è stata introdotta di recente nei porti australiani in concomitanza con l'acquacoltura locale dei crostacei (Patti e Gambi, 2001).

Il ciclo vitale di *S. spallanzanii* è stato studiato nel Mediterraneo da Giangrande e Petraroli, (1994): la riproduzione si verifica in inverno e le larve lecitotrofiche rimangono più di 15 giorni in fase pelagica ed hanno un potenziale relativamente alto di dispersione (Giangrande *et al.*, 2000). Questa specie ha un accrescimento molto rapido, potendo raddoppiare le dimensioni del tubo in un solo anno. La taglia minima osservata per raggiungere la maturità è di circa 15 cm. Tuttavia, esemplari di taglia inferiore ai 20 cm sono sempre stati riscontrati di sesso maschile, mentre in quelli di taglia superiore ai 20 cm (eccezionalmente anche fino a 60 cm di lunghezza) sono stati riscontrati di sesso femminile. *S. spallanzanii* è una specie ermafrodita proterandrica ed il rapporto fra sessi è quasi sempre di 1:1. L'ovogenesi è piuttosto lunga (circa un anno), la spermatogenesi è molto più rapida (da settembre a dicembre), ma l'emissione dei gameti è sincronizzata (febbraio-marzo), e molto probabilmente su di essa incide il fotoperiodo e la temperatura dell'acqua che varia nel periodo della riproduzione tra 11-14°C. Lo sviluppo larvale lecitotrofico è una condizione presente in tutti i membri della famiglia dei Sabellidae (Rouse e Fitzhugh, 1994; Giangrande, 1997).

La durata media della vita è stata stimata di circa 4 anni.

Inoltre, questo anellide mostra grandi capacità rigenerative sfruttabili come potenziale riproduzione asessuale. Tipica è la rigenerazione della corona branchiale che spesso si

autotomizza se il verme non è in condizioni ottimali e per la quale occorre circa un mese per la completa rigenerazione. Da risultati emersi da recenti studi si evince che gli individui di *S. spallanzanii*, se distaccati dal loro sito originale, possono riposizionarsi su nuovo substrato, a condizione che esso non sia mobile, grazie alla secrezione di un muco che permette ad essa di riattaccarsi (Raganato *et al.*, 2001).

In questa specie una grande quantità di muco viene secreto quando gli organismi sono sottoposti a condizioni di stress differenti. Il muco ha principalmente una funzione difensiva contro gli invasori, come era già stato confermato da Canicattì *et al.*, (1992) che hanno evidenziato come esso possieda proteine termolabili biologicamente attive che producono emolisi negli eritrociti dei vertebrati. Le molecole sono probabilmente prodotte dalle ghiandole mucose che costituiscono l'apparato di secrezione dei Sabellidae (Fitzsimons, 1965). Inoltre, all'interno del muco, è stata studiata la presenza e la funzione di un lisozima importante nella difesa degli anellidi contro gli attacchi batterici. Questo elemento risulta importante visto che questa specie di polichete vive in ambienti eutrofici in cui i batteri, compresi gli organismi patogeni per l'uomo, sono abbondanti (Barg e Phillips, 1998). Oltre alla funzione difensiva del muco, è stato visto come esso rappresenti anche un mezzo ideale in cui le uova vengono emesse e fecondate. La presenza nel muco di entrambi i gameti, supporta l'ipotesi che la fecondazione non si verifichi nella colonna d'acqua, ma si svolga all'interno del tubo (Stabili *et al.*, 2009). Questa strategia di fertilizzazione, che non comporta la dispersione delle uova nella colonna d'acqua, assicura un elevato successo nella fecondazione e nella riproduzione di questa specie.

1.1.2 a - L'influenza di *Sabella spallanzanii* sull'ecosistema marino e il suo ruolo da bioindicatore

La specie *S. spallanzanii* è considerata una grave minaccia per le associazioni bentoniche in *habitat* caratterizzati sia da substrati duri che da substrati molli. La struttura fisica di questo anellide, che sporge dal substrato, può influenzare l'abbondanza delle specie e la composizione delle associazioni bentoniche (Woodin, 1981; Eckman, 1983; Cummings *et al.*, 2001). Essa può fornire un rifugio per la predazione e rappresentare un *habitat* secondario per le alghe e gli invertebrati sessili (Carey e Watson, 1992; Callaway, 2003). Altre specie di policheti non invasive, come *Conchilega lanice*, hanno mostrato di pregiudicare la diversità e l'abbondanza delle specie di fauna bentonica nei sedimenti circostanti (Callaway, 2003). Ci possono anche essere effetti indiretti attraverso alterazioni

dell'idrodinamica vicino al substrato (Eckman, 1983) che possono, a sua volta, pregiudicare la stabilità dei sedimenti circostanti (Woodin, 1983), la concentrazione di ossigeno o di materia organica presente (Merz, 1984; Woodin, 1983; O'Brien e Keough, 2006). Le variazioni dell'idrodinamismo, inoltre, possono influenzare la superficie di abitazione delle larve (Holloway e Keough, 2002b), che si affidano alle correnti per gli spostamenti e l'alimentazione (Graham e Sebens, 1996), e che cercano un substrato adatto per attaccarsi prima dello sviluppo (O'Brien, 2006).

Inoltre, alcune specie di policheti, come *Cuprea diopatra*, possono modificare la struttura della comunità circostante microbica (Phillips e Lovell, 1999), influenzando indirettamente la macrofauna che si nutre di detriti e di materia organica nel sedimento.

L'impatto sulla struttura della comunità microbica, mediante l'eliminazione attraverso organismi filtratori, risulta di notevole interesse. L'influenza dei macroinvertebrati sulle comunità batteriche è stata valutata principalmente per le popolazioni di molluschi (Wood, 1957; Ayres *et al.*, 1978; Bostock, 1979; Birkbeck e McHenry, 1982; Bolinches *et al.*, 1986; Prieur *et al.*, 1990; Yam *et al.*, 1999), descritti come serbatoi di vibroni (Kaysner *et al.*, 1989; Cavallo e Stabili, 2002), e per altri gruppi di alimentatori di sospensione, tra cui i policheti (Prieur *et al.*, 1990, Gili e Coma, 1998; Orejas *et al.*, 2000). Tali studi risultano di notevole importanza in considerazione del fatto che la diversità microbica è coinvolta nei cicli biogeochimici (Fuhrman *et al.*, 1994; Gonzales e Moran, 1997; Rehnstam *et al.*, 1993).

In generale, i filtratori macroinvertebrati marini hanno evoluto un grande numero di convergenze per la filtrazione di grandi volumi di acqua necessari al loro fabbisogno alimentare (Riisgard e Larsen, 2001b), influenzando l'importo globale di particolato abiotico e biotico in sospensione e contribuendo in tal modo al flusso di energia dal plancton agli organismi bentonici (Cloern, 1996; Doering e Oviatt, 1986; Loo e Rosenberg, 1989; Petersen e Riisga, 1992; Widdow *et al.*, 1998).

A riguardo la specie *S. spallanzanii* presenta un'ampia plasticità trofica, infatti studi più recenti hanno mostrato come essa si nutra non solo di fitoplancton (Shumway *et al.*, 1988; Riisgard e Ivarsson, 1990; Clapin, 1996), ma anche di particolato in sospensione (detriti organici di carbonio) e di altre forme viventi come i batteri (Cavallo e Giangrande, 2002; Licciano *et al.*, 2003; Cavallo *et al.*, 2003; Stabili *et al.*, 2005; Licciano *et al.*, 2005; Stabili *et al.* 2006). L'attività di filtrazione di *S. spallanzanii* è stata studiata da Lemmens *et al.*,

(1996), i quali hanno stimato, per essa, una capacità media di filtrazione di circa 12 m³/L per m² di *habitat*.

Il polichete è in grado di concentrare la fauna microbica e consentire l'individuazione delle specie batteriche, anche quando queste sono presenti nella colonna d'acqua a concentrazioni molto basse, fornendo un potenziale ruolo di questa specie nei programmi di "bioremediation" (Giangrande *et al.*, 2005; Stabili *et al.*, 2006). Inoltre, la capacità di *S. spallanzanii* di accumulare alcune specie di microrganismi, come ad esempio quelle del genere *Vibrio*, patogeni per i pesci, i crostacei e i molluschi, può avere una positiva applicazione ambientale (Licciano *et al.*, 2007).

È emerso da alcuni studi che *S. spallanzanii* risulta essere una specie molto resistente a diverse condizioni ambientali. Raganato *et al.*, (2001) hanno mostrato che il digiuno, in cattività, ha indotto negli individui dapprima, l'autotomia della corona tentacolare, e in seguito una riduzione delle dimensioni corporee e la formazione di un nuovo apparato filtrante, ma ad ogni modo gli individui hanno mostrato di poter sopravvivere a lungo (30 giorni). *S. spallanzanii* ha mostrato anche di tollerare ampiamente la diminuzione e l'instabilità della salinità (Raganato *et al.*, 2001). Pur essendo animali tipici di acque eutrofiche (Clapin, 1996), gli esemplari di questa specie immessi in un ambiente meso-oligotrofico, hanno mostrato una capacità di accrescimento notevole (Giacobbe *et al.*, 1996), con un aumento medio della taglia del 9,3% in 5 mesi, di divenire fertili e, per quanto riguarda il sesso femminile, di essere riproduttivamente maturi molto al di sotto della taglia ritenuta il limite inferiore di quella finora conosciuta, cioè circa 20 cm., ma con uova molto più piccole ed in numero minore (Raganato *et al.*, 2001) rispetto a quanto osservato in condizioni ambientali naturali (Giangrande e Petraroli, 1994).

Pertanto, l'abitudine sessile, il comportamento da filtratore e la sua capacità di dispersione e di colonizzazione di ambienti perturbati come le aree portuali, suggeriscono la possibilità per questo organismo di poter essere utilizzato come bioindicatore nei programmi di biomonitoraggio ambientale. L'uso di *S. spallanzanii* in campo ecotossicologico può essere preso in considerazione sulla base di specifiche risposte biologiche legate al metabolismo e ai meccanismi di detossificazione, anche se la maggior parte delle informazioni biochimiche e tossicologiche sui policheti sono limitate a poche specie, come ad esempio *Capitella* e alcuni Nereidi (Abele-Oeschger *et al.*, 1994; Marcano *et al.*, 1996; Abele *et al.*, 1998a; Lee, 1998; Forbes *et al.*, 2001; Christensen *et al.*, 2002), e pochissimi studi sono stati condotti su altre specie sedentarie.

1.2 – I biomarkers negli studi ecotossicologici

Nel XX secolo, molte migliaia di tracce organiche inquinanti, come ad esempio policlorurati bifenili (PCB), pesticidi organoclorurati (OCP), idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorodibenzofurani (PCDF) e diossine (PCDD) sono state rilasciate nell'ambiente. All'inizio degli anni sessanta l'umanità si è resa conto dei potenziali effetti negativi a lungo termine di queste sostanze chimiche per gli ecosistemi acquatici e terrestri. La destinazione finale per molti di questi contaminanti è l'ambiente acquatico (Stegeman e Hahn, 1994).

La valutazione del rischio ambientale (ERA) è un processo che comprende tutti o alcuni dei seguenti elementi: identificazione, valutazione dell'effetto, valutazione d'esposizione e caratterizzazione del rischio (Van Leeuwen e Hermens, 1995). Quando un composto tossico penetra in un ecosistema, sia questo marino, terrestre o d'acqua dolce, esso può provocare una serie d'alterazioni o danni a diversi livelli di complessità strutturale che vanno dal danno molecolare, fino a giungere ad alterazioni al livello d'organismi, popolazioni o comunità (Stebbing, 1985).

Tali scenari hanno attivato la ricerca per stabilire precoci segnali di allerta, o *biomarkers*, in grado di riflettere le risposte negative di un sistema biologico ai contaminanti ambientali di origine antropica (Bucheli e Fent, 1995).

Un *biomarker* può essere convenzionalmente definito come “una variazione indotta da un contaminante nelle componenti di un processo, di una struttura o di una funzione dell'organismo che possa essere misurata in un sistema biologico” (National Academy of Science, 1989). In altri termini, il *biomarker* consiste in una serie di risposte biologiche innescate dalla presenza di stimoli stressori, misurabili in maniera ripetibile e relativamente semplice. Tra esse sono compresi parametri fisiologici, biochimici e morfologici, analizzati a livello cellulare, tissutale, o dell'intero organismo. Un *biomarker* deve essere innanzitutto sensibile alla presenza di uno o più contaminanti, al fine di fornire informazioni circa la tossicità di una sostanza a concentrazioni inferiori a quelle pericolose per l'organismo. Anche la specificità biologica deve essere tenuta in considerazione: alcuni *biomarker* possono essere rappresentativi soltanto in certi gruppi animali e non in altri, mentre alcuni possono essere applicati universalmente.

In generale, i *biomarkers* possono essere suddivisi in tre classi:

- *biomarkers* di esposizione: per il rilevamento e la misurazione di una sostanza esogena o dei suoi metaboliti o il prodotto di un'interazione tra xenobiotici e qualche molecola bersaglio;
- *biomarkers* di effetto: alterazione all'interno dei tessuti o dei fluidi corporei di un organismo che può essere riconosciuto come associato allo stato di salute;
- *biomarkers* di suscettibilità: indica la capacità acquisita di un organismo di rispondere allo stress da esposizione ad una sostanza xenobiotica specifica compresi i fattori genetici e le modifiche in recettori che alterano la sensibilità di un organismo a tale esposizione.

Simultaneamente all'impatto negativo del contaminante, si sviluppano da parte dell'organismo delle risposte adattative allo stress chimico che mirano a riportare questo ad uno stato di omeostasi. Se l'esposizione è continua o aumenta, i processi compensativi diventano inefficienti ed iniziano meccanismi di allerta. Quando questi meccanismi non sono più sufficienti o vengono compromessi, il potenziale di sopravvivenza dell'organismo può cominciare a diminuire, e si giunge alla manifestazione visibile degli effetti tossici (Depledge e Fossi, 1994), con l'innescare di una cascata di risposte biologiche, ciascuna delle quali può fungere da *biomarker* (McCarthy *et al.*, 1991).

L'utilizzo di *biomarkers* permette, attraverso lo studio delle risposte immediate, di prevedere il manifestarsi di effetti negativi a lungo termine come cancerogenesi, alterazioni patologiche, diminuzione delle capacità riproduttive e mortalità nell'ambito di una popolazione.

Le analisi chimiche effettuate sui diversi comparti abiotici (aria, acqua, sedimento) presentano lo svantaggio di fornire soltanto un dato puntiforme, sia spaziale che temporale, spesso non rappresentativo dell'evoluzione della contaminazione, e soggetto a notevole errore in caso di condizioni ambientali particolari. Il dato ricavato non fornisce, inoltre, nessuna indicazione sulla reale frazione di contaminazione biodisponibile, valore che può variare a seconda delle caratteristiche chimico-fisiche del composto. Alcune classi di contaminanti, come i metalli pesanti ed i composti organici persistenti, sono presenti nell'ambiente spesso a concentrazioni al di sotto della soglia analitica. Mediante il "biomonitoraggio", che viene definito come l'utilizzo regolare di organismi per la valutazione di cambiamenti della qualità delle acque o dell'aria (Cairns e Van Der Shalie, 1980), si può invece evidenziare la frazione biodisponibile del composto e il suo destino

lungo la rete trofica. Quindi, l'utilizzo dei *biomarkers* fornisce informazioni addizionali a quelle ricavate dal monitoraggio chimico o tossicologico.

Nel caso di uno *screening* ambientale, i *biomarkers* dovrebbero servire per compiere un'indagine preliminare (sistemi di *early warning*) volta a mettere in evidenza la presenza di una sostanza xenobiotica e poter prevedere l'impatto che questa potrebbe avere sull'ambiente, utilizzandone eventualmente una "batteria" nel caso non si conosca esattamente il tipo di contaminazione (Payne *et al.*, 1987).

Gli organismi residenti in un ambiente inquinato, non sono mai sottoposti all'effetto di un solo composto tossico, ma ad una miscela di composti, che interagiscono attivamente tra loro provocando nell'individuo una risposta cumulativa o sinergica. Oltre a fattori antropici l'organismo subisce condizionamento anche da parte di molti fattori naturali chimico-fisici (temperatura, salinità, ossigeno, ecc.), ecologici e fisiologici (stato nutrizionale, stato ormonale, età, ecc.) che influenzano in maniera notevole le risposte metaboliche dell'organismo e di conseguenza i *biomarkers*. Appare evidente che in natura non ci troviamo di fronte ad una singola reazione dose-effetto, ma di fronte una "famiglia" di reazioni dose-effetto, che corrispondono alle diverse interazioni della miscela di contaminanti con gli stress ambientali (McCarthy *et al.*, 1990).

Quindi l'interpretazione dei *biomarkers* si basa su un nuovo paradigma concettuale che può essere così riassunto: utilizzando i *biomarkers* non otteniamo la valutazione quantitativa dei livelli del composto tossico cui l'organismo è sottoposto, ma la determinazione del "livello di salute" in cui l'organismo si trova, nel suo passaggio dallo stato d'omeostasi alla malattia (McCarthy e Shugart, 1990; McCarthy *et al.*, 1990). Per questo motivo, è necessario conoscere approfonditamente la biologia e la fisiologia dell'organismo utilizzato, per poter minimizzare la probabilità di incorrere in errori di valutazione dovuti a cause diverse dall'esposizione ad uno xenobiotico quali fattori abiotici cui gli organismi sono sottoposti (Stegeman *et al.*, 1992). Il bioaccumulo di alcuni contaminanti ambientali persistenti nei tessuti animali può essere considerato un *biomarker* di esposizione a tali sostanze chimiche (NRC, 1987; WHO, 1993), anche se secondo altri autori (Van Gestel e Van Brummelen, 1994) questo non può essere considerato come tale in quanto non fornisce informazioni sugli scostamenti relativi allo stato di salute dell'organismo.

1.3 - Bioaccumulo

La valutazione della presenza di eventuali composti inquinanti e la conoscenza completa della condizione ecologica di un ecosistema sono presupposti assolutamente necessari per una corretta gestione e tutela dell'ambiente.

Il bioaccumulo di sostanze chimiche nel biota può essere un prerequisito per valutare gli effetti negativi di queste sugli ecosistemi (Franke *et al.*, 1994).

I livelli di contaminazione nel biota sono determinati in primo luogo dall'assorbimento e dalla cinetica di eliminazione, che sono specifici sia per le sostanze chimiche che per gli organismi (Gobas *et al.*, 1988). Un modello che illustra i processi che governano il bioaccumulo negli organismi acquatici è rappresentato in figura 5 (Van der Oost *et al.*, 1996a).

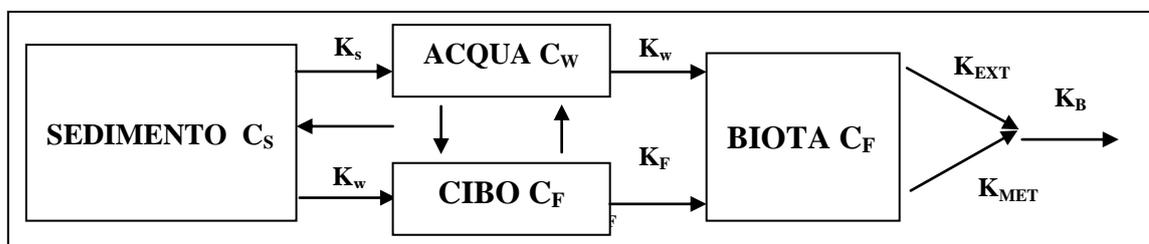


Fig. 5 - Modello di bioaccumulo negli organismi acquatici secondo Van der Oost *et al.*, 1996a.

Secondo questo modello, la concentrazione di una sostanza chimica nel biota (C_B) nell'unità di tempo (t) può essere espressa dalla seguente equazione:

$$dC_B/dt = [k_w C_W + K_F C_F] - K_B C_B = [k_w C_W + K_F C_F] - [K_{EXT} + K_{MET}]$$

C si riferisce rispettivamente alla concentrazione; k è una costante, e gli indici W , F , B , EXC e MET si riferiscono all'acqua, al cibo, alla flora e alla fauna, all'escrezione e al metabolismo, rispettivamente. L'assorbimento di inquinanti organici possono essere diretti attraverso lo scambio con la fase acquosa ($k_w C_W$), o indiretti, attraverso il consumo di alimenti contaminati ($K_F C_F$) (Thomann, 1989).

Il fattore di bioconcentrazione (BCF) di un prodotto chimico è il rapporto tra la sua concentrazione nell'organismo e nell'acqua durante lo stato stazionario o di equilibrio (Opperhuizen, 1991). Per la suddivisione delle sostanze chimiche tra l'acqua e la fase lipidica degli organismi, il BCF durante lo stato stazionario è espresso come:

$$BCF = K_w/K_b = C_B/C_W$$

L'assorbimento delle sostanze chimiche negli organismi dall'acqua segue, probabilmente, un meccanismo di diffusione passiva, analogo a quello del consumo di ossigeno (Thomann e Connolly, 1984). Il tasso di assorbimento dipende dalle concentrazioni delle sostanze nell'acqua, che sarà generalmente più elevato per i composti idrofobici (Gobas *et al.*, 1993). È stato visto che il tasso di assorbimento di sostanze chimiche idrofobiche nei pesci aumenta con il contenuto di lipidi nelle membrane biologiche (Spacie e Hamelink, 1982). Il destino delle sostanze chimiche è in gran parte determinato dall'assorbimento di queste nel particolato in sospensione e nei sedimenti (Loonen *et al.*, 1994a). L'assorbimento dipende quindi dalle caratteristiche dei sedimenti e delle sostanze chimiche coinvolte. Se le sostanze chimiche hanno una natura idrofoba il tasso di assorbimento si considera come una ripartizione tra l'acqua e la frazione organica nei sedimenti, quindi il coefficiente di assorbimento (K_{OC}) può essere espresso come:

$$K_{OC} = K_w/K_s = C_s/C_w$$

dove gli indici S e W si riferiscono rispettivamente al sedimento e all'acqua, rispettivamente. Se i processi di bioconcentrazione e di assorbimento nei sedimenti hanno raggiunto l'equilibrio, il fattore di bioaccumulo (BSAF) può essere espresso come:

$$BSAF = C_B/C_S = BCF / K_{OC}$$

Sia BCF che K_{OC} dipendono dall'idrofobicità dei composti chimici (Connor, 1984). Quindi esiste una relazione tra i valori logaritmici dei coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua ($\log K_{ow}$) e il BCF di composti organici. Devillers *et al.* (1996) hanno confrontato sette modelli lineari e non lineari di BCF con un set di dati sperimentali di 436 valori di BCF registrati per 227 sostanze chimiche, al fine di valutare la loro accuratezza. Inoltre, Thomann (1989) ha dimostrato come il tasso di escrezione di sostanze chimiche idrofobe da organismi acquatici, sia inversamente proporzionale al $\log K_{ow}$ dei composti. Questi studi sono indicativi del valore del K_{ow} per valutare il potenziale di bioaccumulo.

Connor (1984) ha mostrato un elevato BSAF per gli idrocarburi aromatici e gli organoclorurati con valori di K_{ow} elevati. In vari studi sul campo, tuttavia, i valori più elevati BSAF sono stati osservati, in particolare per i composti il cui $\log K_{ow}$ presentava valori superiori a 6 (Van der Oost *et al.*, 1996a; Leadly *et al.*, 1998).

1.4 - Biodisponibilità

L'uso di bioindicatori per il monitoraggio della qualità delle acque si basa essenzialmente sulla capacità degli organismi di accumulare contaminanti nei loro tessuti, in misura proporzionale alla loro biodisponibilità (Andral *et al.*, 2004). Per valutare il bioaccumulo, la misura della biodisponibilità della sostanza considerata è un fondamentale parametro per ottenere risultati validi (Franke *et al.*, 1994).

Belfroid *et al.* (1996), definiscono la biodisponibilità come la frazione di contaminante presente nel suolo/sedimento e nell'acqua che potenzialmente può essere utilizzata dagli organismi e assorbita dai loro tessuti. Quando la concentrazione negli organismi non è relativa alla concentrazione reale biodisponibile nell'acqua, questo potrebbe portare a una sottostima del potenziale di bioconcentrazione (Kristensen e Tyle, 1991). Deviazioni dei valori di BSAF possono quindi essere in parte dovuti a differenze nella biodisponibilità di contaminanti (Van der Oost *et al.*, 1996a).

Le caratteristiche dei sedimenti quali, la dimensione delle particelle e il contenuto di materia organica (OM) possono essere fattori importanti nel determinare la biodisponibilità di sostanze chimiche idrofobiche.

Belfroid *et al.*, 1996 hanno riportato dei risultati sull'influenza delle dimensioni delle particelle sulla biodisponibilità: gli organismi ingeriscono, preferenzialmente, le particelle più piccole del sedimento (arricchite in OM), e questo si traduce in un aumento dell'assorbimento del contaminante presente. La OM è la principale determinante dell'assorbimento di composti idrofobici dai suoli e dai sedimenti (Belfroid *et al.*, 1996); pertanto, la biodisponibilità di questi contaminanti, generalmente, diminuisce con l'aumento del contenuto di OM nel suolo e nei sedimenti (Landrum e Faust, 1991).

Inoltre, Belfroid *et al.*, (1996) hanno mostrato come l'assorbimento e la biodisponibilità di un contaminante possano dipendere anche dal tempo di permanenza di questo nel suolo e nei sedimenti, e da numerosi altri fattori, come il contenuto in argilla e il contenuto di umidità. Si è dimostrato che il bioaccumulo di contaminanti idrofobici diminuisce nell'ambiente con l'aumentare delle concentrazioni di materia organica disciolta (DOM) elevate a causa dell'alta capacità di legame di questa con i composti (Haitzer *et al.*, 1999).

1.5 - Biotrasformazione

Un organismo ha due modi principali di eliminare una sostanza, l'escrezione di questa nella sua forma originaria o la biotrasformazione del composto da parte dell'organismo.

La biotrasformazione, generalmente, porta alla formazione di un composto più idrofilo facilmente escreto dall'organismo (Vermeulen, 1996). L'organo più frequentemente coinvolto nella biotrasformazione di composti estranei è il fegato. La biotrasformazione può anche alterare la tossicità di un composto, rendendolo utile o più dannoso per l'organismo. Infatti, durante una reazione di detossicazione, la tossicità di un composto viene ridotta e l'escrezione aumenta. In caso di bioattivazione, tuttavia, il composto è trasformato in un metabolita reattivo, che è più tossico del composto originario.

Una maggiore eliminazione di contaminanti attraverso un'efficace biotrasformazione (metabolismo) possono causare deviazioni rilevanti dei valori di BSAF. Tuttavia, quando i tassi di assorbimento sono significativamente superiori ai tassi di *clearance* metabolica il bioaccumulo può ancora essere rilevante (Franke *et al.*, 1994).

1.6 – Metalli pesanti

Generalmente il termine *metalli pesanti* è adoperato per indicare quegli elementi che hanno densità maggiore di 5 g/cm³ e che provocano effetti dannosi sull'ambiente e sulla salute.

I metalli pesanti presentano una serie di proprietà che li contraddistinguono: si comportano in genere come cationi; i loro ossidi ed idrossidi in acqua sono insolubili o quasi; hanno una spiccata attitudine a formare complessi; hanno una grande affinità per i solfuri, nei quali tendono a concentrarsi; hanno diversi stati di ossidazione a seconda delle condizioni di pH ed pE.

I metalli pesanti nell'ambiente, ed in particolare nei corpi idrici, possono trarre origine da diverse fonti: erosione di formazioni minerali da parte degli agenti atmosferici, processi industriali di estrazione e di lavorazione dei minerali, utilizzazioni industriali dei metalli e dei loro derivati, scarichi che si originano da insediamenti residenziali, dilavamento e scarichi di zone agricole.

In aree marine costiere, la loro concentrazione generalmente aumenta, raggiungendo livelli di potenziale tossicità per gli ecosistemi (Elberling *et al.*, 2003).

La maggior parte dei metalli pesanti, anche quelli più tossici, ad esempio Pb, As, Cd ed Hg, sono normalmente presenti nei sedimenti (e nel suolo) in concentrazioni molto variabili comprese tra i mg/Kg (ppm) ed i µg/Kg (ppb).

Nella maggior parte degli ambienti acquatici, le concentrazioni di metalli disciolti nelle acque sovrastanti sono basse a causa della precipitazioni di questi come solidi o adsorbimento nelle particelle in sospensione che si depositano come sedimenti. Una volta

depositati nel sedimento, le reazioni biologiche, le ossido-riduzione e le reazioni di precipitazioni/dissoluzione determinano una stratificazione dei metalli nel disciolto e nel particolato con l'aumentare della profondità. La frazione ossidante dei sedimenti di solito si estende fino a una profondità di 2-5 mm (Kristensen, 2000). Ad una maggiore profondità il sedimento diventa sub-ossidante, cioè contenente miscele di fasi solide ossidanti (ad esempio osso-idrossidi Fe e Mn) in equilibrio con la fase disciolta ridotta (ad esempio Fe (II) e Mn (II)) (Simpson e Batley, 2003). Una volta che gli ossidrossidi di Fe e Mn sono facilmente riducibili a opera dei batteri solfatoriduttori, si esauriscono e si formano dei complessi di solfuri metallici la cui solubilità controlla la frazione dei metalli disciolti in soluzione (Di Toro *et al.*, 1992; Burdige, 1993).

I processi sulle fasi solide, costituite dal materiale particellato e dal sedimento, vengono indicati in letteratura in modo generale come “*sorption processes*” e svolgono un ruolo molto importante nella regolazione della concentrazione dei metalli nelle acque marine. Essi, infatti, rappresentano il primo stadio dell'insieme dei fenomeni che portano alla rimozione delle specie metalliche disciolte e alla loro associazione con il sedimento di fondo.

I sedimenti contaminati possono trasformarsi a loro volta in dispersori, divenendo essi stessi una fonte dalla quale le sostanze inquinanti possono essere rilasciate e disperse nuovamente nell'ambiente rendendole di nuovo biodisponibili. Pertanto, i sedimenti marini sono ecologicamente dei componenti importanti dell'*habitat* acquatico, ma anche una riserva di contaminanti, e possono essere, dunque, utilizzati come indicatori sensibili per il monitoraggio di ambienti acquatici (Ergin *et al.*, 1991; Atgin *et al.*, 2000).

In linea generale, l'adsorbimento sulla superficie delle fasi solide è basato sui legami di Van der Waals responsabili delle relativamente deboli interazioni ione-dipolo o dipolo-dipolo. Le fasi solide naturali attive, in tali processi, sono principalmente gli ossidi di Fe e di Al, i minerali argillosi, la silice, le sostanze organiche. I siti attivi presenti sulla superficie della fase solida e legati nei vari materiali a Fe, Al, Si, Ti, ecc., sono principalmente i gruppi -OH. E' chiaro che un aumento dei siti -OH e l'aumento del pH spostano l'equilibrio del processo nel senso di un maggiore adsorbimento.

Le concentrazioni dei metalli dipendono dalla reattività degli stessi, dalle caratteristiche chimiche delle matrici, e dalla presenza di substrati reattivi nelle acque riceventi.

Gli ioni metallici in un sedimento possono essere in equilibrio tra la fase acquosa (acqua interstiziale) e quella solida e subire numerose reazioni (figura 6).

La fase solida di un sedimento è costituito prevalentemente da:

- minerali primari formatisi dal raffreddamento dei magmi fusi (silicati, feldspati, olivine, pirosseni, miche, anfiboli rappresentano la frazione sabbiosa del sedimento);
- minerali secondari (ossidi di Fe, Al e Mn e minerali non cristallini noti come la frazione argillosa dei sedimenti);
- sostanze umiche, ossia una miscela eterogenea di prodotti derivanti dalla decomposizione microbica della sostanza organica;
- biomassa costituita dalla materia organica vivente;
- precipitati (carbonati, fosfati e solfuri);
- colloidali, ossia una fase solida *mobile* formata da particelle di dimensioni comprese tra i nano ed i micrometri.

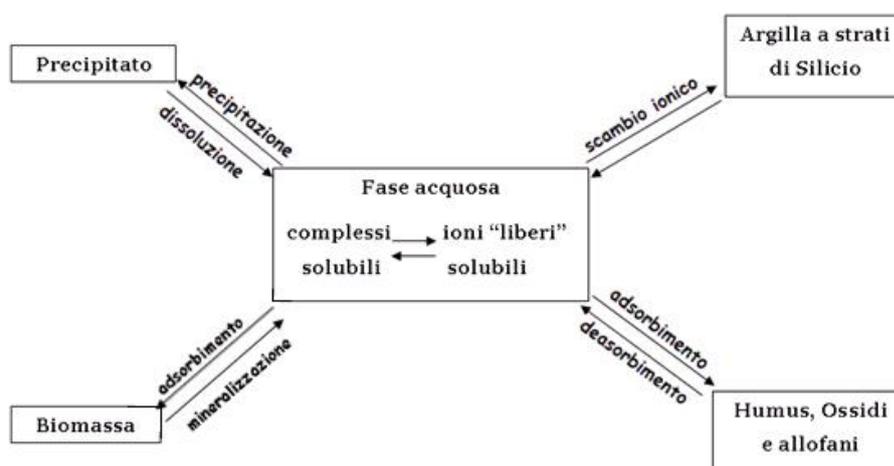


Fig. 6 - Equilibri chimici degli ioni metallici nei sedimenti

L'acqua interstiziale, nota come la fase acquosa del sedimento, generalmente contiene gas e sali disciolti (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ , K^+) che possono essere facilmente scambiati.

La bio-disponibilità dei metalli nei sedimenti dipende da interazioni di diverso tipo che si instaurano tra gli ioni metallici ed i costituenti della matrice solida: scambi ionici (adsorbimento-desorbimento); adsorbimenti specifici o complessazione superficiale; equilibri chimici (solubilità, redox, acido base, ecc.); immobilizzazione da parte della materia vivente.

I metalli in tracce, presenti nel suolo o nei sedimenti, possono esistere come differenti specie chimiche. Il rischio tossicologico dei metalli pesanti presenti nei sedimenti, come

già accennato, non dipende esclusivamente dal loro contenuto totale ma, principalmente dalle forme chimiche che essi assumono e dalla loro mobilità bio-geochimica.

In sedimenti poco contaminati, questi metalli si trovano principalmente sotto forma di silicati e minerali primari e costituiscono specie relativamente immobili. Nelle zone contaminate i metalli in tracce sono generalmente presenti in altre forme, più disponibili. Negli studi ambientali, la determinazione della forma chimica dei metalli legati alla fase solida o al sedimento fornisce importanti informazioni sulla loro disponibilità e tossicità, in confronto al contenuto totale.

I metalli presenti nelle forme solubili, scambiabili ed inorganiche sono quelli a maggior mobilità e anche maggiormente “biodisponibili”, mentre le forme chimiche legate agli ossidi a basso o ad elevato ordine cristallino sono più stabili e possono essere rilasciati solo in seguito a una forte sollecitazione esterna.

Il processo di identificazione e quantificazione delle differenti specie, forme e fasi in cui l’elemento si trova è definito *speciazione*.

Le fasi che maggiormente destano interesse nello studio dei sedimenti sono:

- **frazione scambiabile:** è costituita dai metalli debolmente adsorbiti alla superficie del sedimento mediante interazioni elettrostatiche e possono essere rimossi variando la forza ionica del mezzo;
- **frazione carbonatica:** in questa fase i metalli sono presenti o sotto forma di carbonati o co-precipitati con essi;
- **frazione legata a ossidi di ferro e manganese:** questi ossidi sono eccellenti accumulatori di metalli in tracce e sono termodinamicamente instabili in condizioni anossiche (basso potenziale di riduzione);
- **frazione organica:** la componente organica dei sedimenti è costituita da una grande molteplicità di composti, pertanto è impossibile definire univocamente la effettiva composizione. Alla sua formazione concorrono diversi fattori, quali l’accumulo dei prodotti del metabolismo e della decomposizione di organismi animali e vegetali, e la sedimentazione della materia organica particolata (*POM*) della colonna d’acqua. La presenza di un così elevato numero di composti organici, spesso in concentrazione assai ridotta rispetto ai macrocomponenti chimici dell’ambiente marino, conferisce al sedimento una elevata capacità sequestrante nei confronti di ioni metallici grazie alla presenza di gruppi funzionali (carbossilici, amminici, fenolici, sulfidrilici) con un elevato potere legante.

▪ **frazione residua:** contiene principalmente minerali primari e secondari che possono contenere metalli in tracce, all'interno della loro struttura cristallina. Questi metalli, però, sono poco disponibili nelle normali condizioni ambientali.

Il destino e la tossicità dei metalli nei sedimenti dipende dalla ripartizione di questi tra le particelle di sedimento e l'acqua interstiziale (Calmano *et al.*, 1993; Simpson, 2005). I metalli disciolti nell'acqua interstiziale sono biodisponibili e più tossici di quelli presenti nel particolato (Chapman *et al.*, 1998). I processi fisici (ad esempio correnti, disturbi di origine antropica) e l'attività degli organismi bentonici possono causare la risospensione dei sedimenti e un'alterazione della stratificazione e rimescolamento con l'acqua ossigenata sovrastante. Questa risospensione dei sedimenti e miscelazione altera la ripartizione dei metalli in acqua e nei sedimenti, e la speciazione dei metalli nella fase disciolta, ovvero nell'acqua interstiziale e nelle acque sovrastanti (Riedel *et al.*, 1997; Kristensen, 2000; Simpson *et al.*, 2002).

Le caratteristiche chimico-fisiche alterano la biodisponibilità dei metalli nell'acqua interstiziale (Ciutat e Boudou, 2003; Simpson e Batley, 2003) e il tasso di rilascio dei metalli dai sedimenti (Simpson *et al.*, 2002). In particolare le variazioni di pH, salinità, concentrazione di ossigeno disciolto e quantità di particolato in sospensione influenzano il destino dei metalli rilasciati dai sedimenti (Eggleton e Thomas, 2004; Simpson *et al.*, 2004). Sostanza organica e pH hanno dimostrato di essere tra i fattori più importanti (Nahmani *et al.*, 2007) e variano sia tra i siti (Hernandez *et al.*, 2003; Lukkari *et al.*, 2004) che tra i tipi di *habitat* (Kapusta *et al.*, 2003). Alterazioni apportate alle variabili chimico-fisiche possono alterare la concentrazione biodisponibile dei pesanti metalli, e quindi modificare sostanzialmente gli effetti ecologici di questi contaminanti sugli organismi marini (Mclusky *et al.*, 1986; Abele, 1989; Persoone *et al.*, 1989; Allen e Hansen, 1996; Batley *et al.*, 1999; Lorenzo *et al.*, 2002).

1.6.1 – Aspetti tossicologici dei metalli

I metalli differiscono dai composti organici tossici in quanto non risultano completamente degradabili; visto che essi non possono essere trasformati, se non eccezionalmente, risultano praticamente indistruttibili e, quindi, si accumulano nell'ambiente.

I metalli pesanti rappresentano, quindi, assieme a tutte le altre sostanze non degradabili, un problema grave di inquinamento ambientale e una seria minaccia per l'ambiente marino.

In tempi brevi, i metalli possono subire diluizione o precipitazione e, se restano in soluzione, venire assorbiti da materiale organico o inorganico per essere poi assunti dagli organismi marini. Le branchie, oltre ad essere il principale organo deputato agli scambi gassosi, rappresentano un importante punto di assorbimento dei metalli presenti. Da queste i metalli, dopo essere stati assorbiti, sono veicolati, tramite il circolo sanguigno, all'intero corpo e accumulati in specifici organi. Attraverso il canale alimentare vengono assorbiti metalli in sospensione, metalli presenti nei sedimenti, metalli contenuti nel cibo e anche una parte di quelli in soluzione.

Il grado di assorbimento dei metalli pesanti dipende dalla "speciazione" del metallo: in generale, la forma ionica semplice è assorbita più rapidamente di quella complessata.

L'effetto tossico si esplica attraverso il legame, spesso assai stabile (covalente), con gruppi funzionali reattivi delle molecole organiche: ossidrilici (-OH), carbossilici (COO⁻), fosforilici (OPO₃H⁻), carbonilici (=CO), sulfidrilici (SH), amminici (NH₂), imminici (=NH), andando ad alterare il metabolismo per un'azione diretta sugli enzimi (Grandini, 1993). Diverse molecole organiche essenziali per le normali attività biochimiche cellulari, vengono inattivate dal legame con il metallo: ciò comporta danni cellulari permanenti; ovviamente, il danno, data l'ubiquità dei gruppi funzionali reattivi con i quali i metalli si legano, è esteso a più organi e apparati, spiegando perché queste sostanze siano tutte tipicamente dei veleni ad azione lesionale diffusa (Al-Yousuf *et al.*, 2000).

Elementi quali mercurio (Hg), cadmio (Cd), rame (Cu), zinco (Zn) sono considerati i più pericolosi sotto l'aspetto ecotossicologico (Spry e Wiener, 1991). Allo stesso tempo, Cu e Zn sono micronutrienti essenziali dei siti attivi di alcuni enzimi e servono come regolatori di molte funzioni biochimiche. Invece, le funzioni biologiche di Cd e Hg fino ad oggi sono sconosciute. Tuttavia, anche gli elementi biogeni, se presenti in eccesso, sono tossici per gli organismi.

Gli organismi acquatici sono in grado di accumulare metalli pesanti fino a concentrazioni di decine o addirittura migliaia di volte superiori rispetto alle concentrazioni presenti nell'ambiente (Perevoznikov e Bogdanov, 1999; Podgurskaya *et al.*, 2004; Sobolev, 2005; Gremyachikh, 2006). Gli ioni di Cu, Zn, Hg e Cd entrano far parte dell'organismo, in particolare nei pesci, attraverso il cibo (Brown *et al.*, 1990; Bury *et al.*, 2003). Negli invertebrati gli ioni metallici possono anche penetrare attraverso la cuticola (Robinson, 2003).

Le modalità di assorbimento dipendono da una serie di fattori: l'alimentazione, il comportamento alimentare, il ciclo vitale, le dimensioni corporee e la durata di esposizione dalla stagione, dal sesso, dallo stato fisiologico, dalla temperatura e dal pH dell'acqua (Gerhard, 1993; Perevoznikov e Bogdanov, 1999; Komov *et al.*, 2004; Pourang *et al.*, 2005).

I metalli pesanti si accumulano in molti organi importanti (Perevoznikov e Bogdanov, 1999; Popov *et al.*, 2002; Komov *et al.*, 2004). Il più delle volte le più alte concentrazioni si trovano nel fegato di pesce, nei reni, nelle branchie (Perevoznikov e Bogdanov, 1999; Farkas *et al.*, 2003), e in alcuni casi nell'intestino (Farag *et al.*, 1995; Sobolev, 2005). L'ordine in cui gli organi sono sensibili agli effetti dei HM possono variare in casi di esposizione acuta e cronica (Brown, 1990). La distribuzione viscerale del Hg negli organi e nei tessuti mostra spesso il seguente ordine: muscoli>fegato>milza>intestino>cervello>gonadi (Stepanova e Komov, 1997; Farkas *et al.*, 2003). Ciò è dovuto a un elevato contenuto di proteine nei muscoli funzionali (-SH, -NH₂, -COOH, -OH) con alta affinità per Hg. Negli invertebrati i metalli pesanti associati agli alimenti si accumulano notevolmente a livello intestinale, mentre quelli presenti nell'acqua si accumulano prevalentemente in altri organi (Cain *et al.*, 1992; Craig *et al.*, 1999).

Sono stati ipotizzati tre meccanismi di trasporto dei metalli attraverso le membrane biologiche: la diffusione passiva, la diffusione facilitata tramite proteine trasportatrici della membrana, l'accesso attraverso i principali canali ionici (ad esempio, i canali del Ca) in associazione con pompe di ioni attivi, e l'endocitosi (Simkiss e Taylor, 1995). È ormai assodato che gli invertebrati acquatici sono in possesso di strategie molto diverse per l'assunzione e lo smaltimento dei metalli accumulati, per cui ci sono differenze enormi di concentrazioni di metalli nel tessuto nei diversi *phyla* (Rainbow, 1998, 2002). I metalli pesanti si distribuiscono su tutte le frazioni subcellulari. Nel citoplasma gli ioni metallici liberi o interagiscono con ligandi ad alto peso molecolare (metallo-enzimi) o a basso peso molecolare (metallotioneine, glutatione), o si depositano nei lisosomi lasciando la cellula mediante esocitosi (Serra *et al.*, 1996; Bury *et al.*, 2003; Giguère *et al.*, 2003; Kraemer *et al.*, 2005). La sintesi di metallotioneine (proteine citoplasmatiche contenenti fino al 30% di cisteina) è uno dei più importanti meccanismi di protezione, che agisce quando la concentrazione di HM aumenta nei pesci e negli invertebrati (Brown *et al.*, 1990; Giguère *et al.*, 2003; Chowdhury *et al.*, 2005).

Negli invertebrati acquatici alcuni ioni di metalli pesanti (Fe, Mn e Pb) assorbono grandi quantità sulla superficie del corpo e si legano alla cuticola, mentre il Cd, Cu e Zn si accumulano all'interno delle cellule, prevalentemente nel citosol (Cain *et al.*, 1992; Wallase *et al.*, 2003). Il rame e lo zinco penetrano attraverso le membrane cellulari degli invertebrati mediante trasportatori attivi, mentre gli ioni Cd penetrano attraverso i canali del calcio per diffusione (Craig *et al.*, 1999; Grosell e Wood, 2002).

I meccanismi di detossificazione sono strettamente connessi alla specie, e quindi possono essere diversi. Per esempio, nel mitile *Crenomytilus grayanus* (Dunker), i metalli si legano prevalentemente alle proteine citoplasmatiche, mentre, nella vongola *Modiolus kurilensis* (Bernard), si legano alle proteine di membrana (Podgurskaya *et al.*, 2004).

Studi sui crostacei zooplanctonici, sulle larve di insetti e sui pesci predatori hanno mostrato che la barriera intestinale è relativamente impermeabile al Hg inorganico, e nel caso di assimilazione di questo nell'organismo, esso viene eliminato più velocemente come mercurio metilato (Berntssen *et al.*, 2004). Il metilmercurio è lipofilo, il che spiega la sua maggiore tossicità rispetto al Hg inorganico. La lipofilia facilita la penetrazione attraverso le membrane biologiche e la barriera intestinale, e questo contribuisce al trasporto nei visceri (Spry e Wiener, 1991). Tra gli effetti vi sono: la compromissione dello stato d'immunità (Mikryakov *et al.*, 2001), i cambiamenti nel comportamento (Campbell *et al.*, 2005), la crescita e lo stato nutrizionale (Sarnowski, 2003), le attività degli enzimi digestivi (Golovanova, 2008), l'efficienza di assimilazione degli alimenti (James *et al.*, 1995), e stato metabolico dei carboidrati (Bhatkar *et al.*, 2004). L'accumulo di Hg induce effetti teratogeni, mutageni e gonadotossici (Kuzubova *et al.*, 2000; Samson e Shenker, 2000; Talikina e Komov, 2003) e provoca danni ai lipidi, alle proteine e al metabolismo peptidico (Nemova, 2005). Il cadmio può compromettere l'equilibrio ionico e alterare la permeabilità delle membrane cellulari (Viarengo, 1985). Il nickel può causare mutagenicità nelle cellule (Fletcher *et al.*, 1994). Negli invertebrati acquatici Cu, Zn, Hg, Cd determina cambiamenti morfologici (Moore *et al.*, 2002; Gremyachikh *et al.*, 2006), fisiologici (tasso di crescita, il nuoto di velocità, consumo di cibo, l'intensità del respiro, la produttività, di sopravvivenza, e cicli di vita) (Gerhard, 1993; Fargasova, 1997; Barata *et al.*, 2002; La Breche *et al.*, 2002).

I fattori biotici e abiotici possono cambiare notevolmente la tossicità e la biodisponibilità di HM per gli organismi acquatici (Alabaster e Lloyd, 1980; Konovalov, 1999; Roy e Campbell, 1995; Mason, 2000; Taylor *et al.*, 2000; Straus, 2003; Pourang, 2004). Ad

esempio, la presenza in acqua di agenti chelanti può determinare un calo della tossicità dei metalli pesanti (Konovalov, 1999; Kjoss *et al.*, 2005).

1.6.1 a - Cadmio

Il cadmio (Cd) viene considerato tossico anche a basse concentrazioni; pur essendo un elemento ubiquitario sulla crosta terrestre, è presente normalmente in bassissime quantità ed accompagna come impurezza altri metalli, soprattutto lo zinco. Il Cd presenta tenori medi molto bassi nella crosta terrestre (0,2 ppm); le acque oceaniche ne contengono solo 0,05 µg/l e le acque continentali incontaminate presentano tenori inferiori in genere a 0,1 µg/l. Il cadmio può presentare tre stati di ossidazione +2, +1 e 0, ma in condizioni naturali è presente essenzialmente come Cd²⁺ che è caratterizzato dalla spiccata tendenza a formare complessi sia inorganici che organici.

In ambiente acquatico, questo elemento è caratterizzato dalla presenza di complessi clorati e, nella sua forma ionica, viene principalmente utilizzato come pigmento.

Presenta la caratteristica di essere facilmente assorbibile e difficilmente eliminabile dall'organismo (Reilly, 1991).

Come per l'As, una parte considerevole del Cd antropogenico viene immesso nell'ambiente tramite l'atmosfera. Ciò dipende dall'elevata volatilità del Cd metallico e di molti altri suoi composti.

1.6.1 b - Cromo

Il cromo è uno dei metalli più interessanti sotto il profilo ambientale e tossicologico perché può presentare in natura due stati di ossidazione: +3 e +6. L'elemento si comporta in maniera completamente diversa in funzione dello stato sotto il quale si presenta, proprio come se si trattasse di due elementi differenti. Il cromo è presente, nei minerali conosciuti, sempre allo stato trivalente se si escludono i rarissimi rinvenimenti di cromati, come ad esempio la crocoite PbCrO₄.

Nelle acque naturali possono essere presenti entrambe le forme: il Cr(III) è una specie sostanzialmente immobile perché forma idrossidi insolubili, mentre il cromo Cr(VI) si comporta come un elemento con elevata mobilità geochimica, intesa come tendenza a passare nella fase acquosa ed a permanervi come composto stabile.

Molte sostanze riducenti presenti nelle acque naturali, come ad esempio quelle organiche, sono capaci di ridurre il Cr(VI) a Cr(III). In soluzione acquosa il Cr(III) può formare

complessi con sostanze organiche legandosi essenzialmente a O, N e S. Le concentrazioni di cromo nelle acque naturali incontaminate sono comprese in generale tra 0,1 e 10 µg/l, ma concentrazioni fino a 30 µg/l non sono rare. Le acque oceaniche mediamente contengono 0,05 µg/l. Queste concentrazioni sono molto basse, in rapporto al contenuto medio della crosta terrestre.

1.6.1 c - Rame

La concentrazione di rame nelle acque degli oceani generalmente non supera valori di 4 µg/l. Concentrazioni maggiori si possono trovare in acque costiere e negli estuari soggetti a fenomeni di inquinamento (10-50 µg/l). Le principali specie inorganiche di rame presenti nell'acqua di mare sono Cu^{++} idrato, CuOH^+ . Il rame è un costituente essenziale per la vita di molti organismi, come costituente di enzimi redox.

Il rame (Cu) come metallo essenziale, presenta delle concentrazioni che sono in parte controllate da meccanismi omeostatici; se, però, viene assunto in dosi elevate e per lunghi periodi diventa tossico (Lundebye *et al.*, 1999; De Boeck *et al.*, 1995). Il rame è importante come cofattore di metalloenzimi in cui il metallo è presente in quantità stechiometriche fisse rispetto all'apoproteina (Grandini, 1993).

1.6.1 d - Nichel

È un metallo duro, malleabile, usato nelle leghe e nella placcatura di altri metalli perché resistente all'ossidazione. Il nichel è impiegato nei materiali ceramici, in elettronica e in particolari nelle pile (ad esempio le pile Ni/Cd). È stato dimostrato che è un elemento essenziale per gli animali. Il nichel presenta una bassa tossicità comparabile allo zinco, manganese e cromo, e non si accumula nei tessuti. Il contenuto di nichel delle acque oceaniche è 0,3 µg/l mentre quello delle acque continentali varia da 0,1 a 5 µg/l. Nella crosta terrestre mediamente presenta una concentrazione di 75 ppm (U.S. EPA United States Environmental Protection Agency 1985).

1.6.1 e - Zinco

Lo zinco (Zn) manifesta la sua tossicità ad elevate concentrazioni, distruggendo il tessuto epiteliale delle branchie e producendo cambiamenti nella composizione chimica del fegato e del tessuto muscolare (Malik *et al.*, 1998). È parte di metallo-enzimi in cui svolge un ruolo non solo catalitico ma anche di regolazione e strutturale.

Il potenziale redox influenza la speciazione dello zinco: in acque riducenti, infatti, in presenza di zolfo, precipita come ZnS che riduce, in questo modo, la concentrazione di Zn libero nella colonna d'acqua. In mare aperto, invece, a pH >8 si trovano le forme idrate ZnOH e Zn(OH)₂. Lo zinco forma complessi con la DOM (materia organica disciolta) e la loro stabilità dipende dal pH e dalla presenza di altri ioni: in condizioni acide predomina la forma Zn²⁺, in condizioni alcaline, invece, la forma complessata Zinco-DOM e le forme ZnCO₃ e ZnOH. Lo Zn²⁺ è la forma più tossica; i complessi organici e inorganici, invece, diminuendo la concentrazione di zinco libero, risultano meno tossici.

1.6.1 f - Piombo

Il piombo (Pb), non possedendo alcuna funzione fisiologica, è considerato un elemento non essenziale per la vita.

Il piombo, nelle acque naturali, è presente in concentrazioni molto basse; la solubilità rappresenta il meccanismo principale che controlla la concentrazione e la speciazione di questo metallo. Il Pb²⁺ è la forma più tossica; le forme carbonato, invece, attenuano la tossicità del metallo, diminuendo la concentrazione di piombo libero. Anche la DOM sembra influenzare la tossicità del metallo nell'ambiente acquatico.

È un metallo molto duttile e malleabile, generalmente in si trova natura associato a zinco, argento e rame. Nelle acque oceaniche è presente a concentrazioni dell'ordine di 0,1 µg/l mentre nei fiumi e laghi a concentrazione di 1 -2 µg/l.

1.6.1 g -Vanadio

Il vanadio nell'ambiente può essere presente in stati di ossidazione II, III, IV e V. I suoi composti più comuni sono trivalenti, ma la forma pentavalente è la più solubile ed è la forma predominante nelle acque superficiali. Il vanadio si può trovare nei sedimenti e nel suolo sottoforma di vanadati e in vari complessi organici. Il vanadile forma complessi stabili con gli acidi umici. Nei sedimenti e nei suoli, il V è presente principalmente come V(IV) chelato a leganti organici (Schloesser *et al.*, 1988). Si trova anche in rocce fosfatiche ed in alcuni minerali di Fe e sottoforma di complessi organici in sostanze petrolifere; inoltre, può sostituire gli atomi di Fe nei suoi ossidi. In natura esistono circa 65 tipi di minerali differenti contenenti vanadio. La più importante fonte del metallo sono la carnotite, la roscoelite, la vanadinite e la partorite. Il metallo si presenta bianco brillante e duttile. Circa l'80% del V estratto è usato come costituente di acciai.

1.6.1 h - Mercurio

Particolare attenzione viene posta al mercurio (Hg), in quanto è, probabilmente, uno dei metalli maggiormente pericoloso da un punto di vista ambientale. Oltre allo stato elementare, il mercurio esiste nello stato mercurio (I) e mercurio (II), nel quale ha perso, rispettivamente, uno e due elettroni. I composti chimici del mercurio (II) sono più numerosi di quelli del mercurio (I) (Boening, 2000). Oltre ai semplici sali, come i cloruri, i nitrati e i solfati, il mercurio (II) forma un'importante classe di composti organo-metallici. Questi sono caratterizzati dal collegamento del mercurio ad uno o due atomi di carbonio per formare composti del tipo $RHgX$ e $RHgR'$, dove le R e la R' rappresentano la parte organica. I più numerosi sono quelli del tipo $RHgX$, dove X può essere un'anione. Il legame carbonio-mercurio è chimicamente stabile: non si dissocia in acqua né per l'azione di acidi deboli o basi. Una volta in ambiente acquatico, il mercurio metallico viene trasformato in mercurio organico (metil e dimetil mercurio) che, essendo biologicamente disponibile, diventa di maggiore rischio sanitario per gli organismi. Il mercurio naturale deriva dal degassamento della crosta terrestre attraverso i vulcani e, probabilmente, attraverso l'evaporazione degli oceani. Il mercurio elementare sotto forma di vapore è leggermente solubile in acqua, ma è facilmente trasportabile nell'atmosfera.

Le principali fonti di inquinamento da mercurio sono le industrie elettrolitiche, la combustione fossile, l'utilizzo di fungicidi alchil-mercurici, ecc. (Boening, 2000).

La tossicità del mercurio nei confronti della fauna marina risulta elevata. Inoltre, il metallo è in possesso di spiccate capacità di bioaccumulo nei tessuti e di biomagnificazione; infatti, entra nella catena alimentare attraverso il plancton, gli invertebrati, i pesci sino ai grandi predatori che manifestano le concentrazioni maggiori perché questo elemento viene eliminato con difficoltà dall'organismo (Miganti *et al.*, 1996).

1.6.1 i – Arsenico

L'interesse generale per l'arsenico nell'ambiente marino è legato al potenziale di tossicità di questo elemento. L'arsenico si accumula nelle cellule sia come trivalente (arsenito) o pentavalente (arseniato). L'arsenito è considerata la specie più tossica (Del Razo *et al.*, 2001) e la sua tossicità comporta l'inibizione del metabolismo aerobico e del legame covalente della cisteina negli enzimi della catena respiratoria (Chen *et al.*, 1998). Tuttavia Pedlar *et al.*, (2002) suggeriscono che, sebbene in grado di legarsi ai gruppi tiolici, non provoca notevole stress ossidativo nelle cellule o tessuti.

Composti dell'arsenico metilati come il metilarsonato (MMA), dimetilarsonato (DMA), ossido di trimetilarsine (TMAO) e tetrametilarsonium (TETRA) sono considerati moderatamente tossici (Phillips, 1990), mentre composti dell'arsenico organici come l'arsenobetaine (ASB), l'arsenocholine (ASC) e l'arsenosugars (ASS) non sono nocivi (Gebel, 2001). È importante discriminare le diverse forme chimiche di questo elemento, che in molti casi si accumulano a livelli moderatamente elevati. In organismi acquatici composti tossici dell'arsenico non-organico sono, in genere, le forme predominanti che, probabilmente, rappresentano i prodotti finali di un processo di detossicazione (Francesconi *et al.*, 1998; Gailer *et al.*, 1994).

1.7 – Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

Circa 43.000 tonnellate di idrocarburi policiclici aromatici sono scaricati nell'atmosfera ogni anno, e circa 230.000 tonnellate entrano negli ambienti acquatici (Eisler, 1987). Questi composti sono ubiquitari dell'ambiente (Laflamme e Hites, 1978) e documenti storici riflettono il crescente contributo delle attività antropiche al mantenimento di livelli elevati di IPA (Laflamme e Hites, 1978; Wakeham *et al.*, 1980; Gschwend e Hites, 1981). Elevate concentrazioni di IPA si trovano nei sedimenti costieri delle città urbane e industrializzate (Lipiatout e Salot 1991; Hong *et al.*, 1995; Connell *et al.*, 1998).

Gli IPA sono un'ampia classe di molecole contenenti anelli aromatici fusi insieme attraverso coppie di atomi di carbonio condivisi fra anelli adiacenti. Queste molecole sono di particolare interesse a causa della loro diffusione e distribuzione in tutto l'ambiente, e soprattutto per le loro proprietà tossiche e cancerogene (Hoffman *et al.*, 1984; Pruell e Quinn, 1985).

I 17 inquinanti più indagati, che ad oggi, la *Unites States-Enviromental Protection Agency (US-EPA)* ha inserito nella lista dei “*priority pollutants*” sono riportati in figura 7.

I vari membri della classe differiscono l'uno dall'altro proprio per il tipo di connessione tra gli atomi di carbonio. Si può avere, per l'appunto, la fusione di soli anelli aromatici, ed in questo caso gli IPA sono classificati come *alternanti* (come antracene, fenantrene, pirene e benzo[*a*]antracene), mentre sono *non alternanti* se nella struttura sono coinvolti sia anelli aromatici che non aromatici (come fluorene, perilene e indeno[1,2,3-*cd*]pirene) (Harvey, 1998).

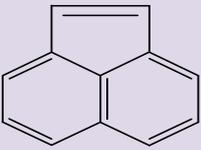
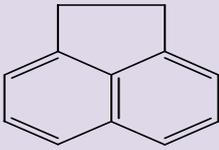
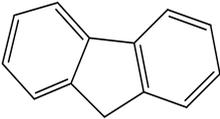
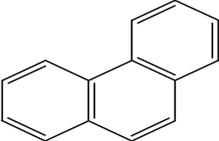
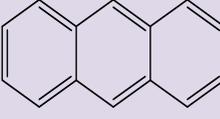
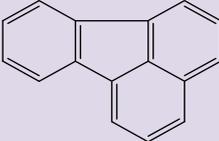
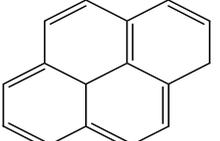
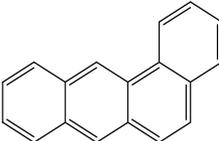
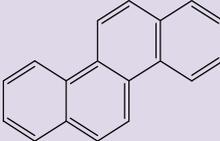
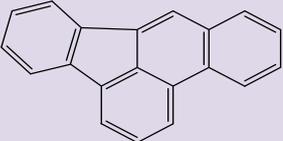
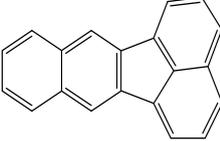
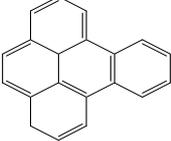
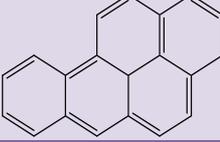
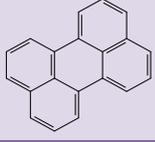
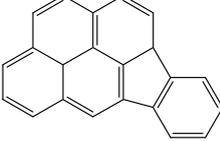
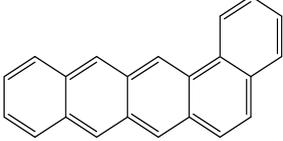
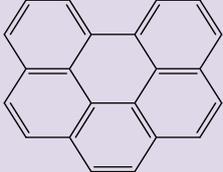
Nome composto	Formola di struttura	Nome composto	Formola di struttura
Acenaftilene		Acenaftene	
Fluorene		Fenantrene	
Antracene		Fluorantene	
Pirene		Benzo[a]antracene	
Crisene		Benzo[b]fluorantene	
Benzo[k]fluorantene		Benzo[e]pirene	
Benzo[a]pirene		Perilene	
Indeno[1,2,3-cd]pirene		Dibenzo[a,h]antracene	
Benzo[g,h,i]perilene			

Fig. 7 - Strutture dei 16 IPA inseriti nella lista dei “priority pollutants” dall’USEPA (United States-Environmental Protection Agency).

Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici sono composti estremamente stabili, solidi a temperatura ambiente, poco solubili in acqua con costante di ripartizione ottanolo/acqua $\log K_{ow} = 3-8$ (Karcher, 1988), pertanto le loro concentrazioni in acqua sono molto basse (Nesterova *et al.*, 1982). Tanto più alto è il loro peso molecolare, tanto maggiore sarà la loro idrofobicità (Gewend *et al.*, 1981) (Tabella 1).

Tabella 1 – Proprietà chimico-fisiche degli IPA

	Anelli	PM (g/mol)	logK_{ow}	S (g/m³)
Acenaftilene	3	152	-	-
Acenaftene	3	154	4,00	3,80
Fluorene	3	166	4,18	1,90
Fenantrene	3	178	4,57	1,10
Antracene	3	178	4,54	0,045
Fluorantene	4	202	5,22	0,26
Pirene	4	202	5,18	0,132
Benzo[a]antrcene	4	228	5,91	0,011
Crisene	4	228	5,75	0,002
Benzo[b]fluorantene	5	252	-	-
Benzo[k]fluorantene	5	252	-	-
Benzo[e]pirene	5	252	-	-
Benzo[a]pirene	5	252	6,04	0,0038
Perilene	5	252	6,25	0,0004
Indeno[1,2,3-cd]pirene	6	276	6,58	-
Dibenzo[a,h]antracene	5	278	6,75	0,0006
Benzo[g,h,i]perilene	6	276	-	$2 \cdot 10^{-5}$

Come conseguenza della loro natura idrofobica, gli IPA negli ambienti acquatici tendono rapidamente ad associarsi al particolato in sospensione ed ai sedimenti (Karickhoff *et al.*, 1979).

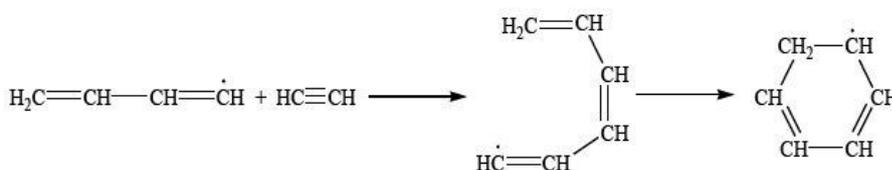
In generale le due principali fonti di IPA nell'ambiente sono i combustibili fossili, principalmente petrolio greggio, e la combustione incompleta dei materiali organici come legno, carbone e petrolio. Questi composti entrano a far parte dell'ambiente marino sia per via atmosferica che idrica, anche se poche informazioni esistono sugli ingressi per via fluviale.

Gli IPA presenti nell'atmosfera possono entrare nella colonna d'acqua direttamente attraverso gli scambi gassosi tra aria-acqua, la deposizione secca di particelle in sospensione nell'aria o la deposizione umida della pioggia, e, indirettamente, dal deflusso urbano (Hoffman *et al.*, 1984, 1985; Dickhut e Gustafson, 1995; Dickhut *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2002).

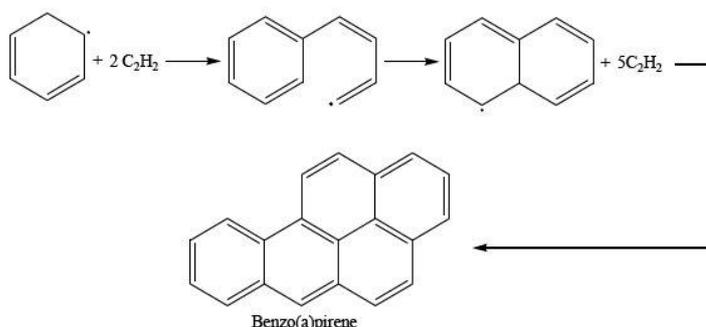
Il meccanismo di formazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici, durante un processo di combustione, è piuttosto complesso ed è dovuto principalmente alla ripolimerizzazione di frammenti di idrocarburi che si formano durante il processo di *cracking* delle molecole più grosse del combustibile. Dopo il *cracking* e la combustione parziale si assiste alla prevalenza di frammenti contenenti due atomi di carbonio; due frammenti C₂ possono combinarsi formando una catena di radicali C₄:



Il radicale che ne risulta può successivamente aggiungere un altro acetilene e ciclizzare in modo da produrre un anello a sei componenti:



Attraverso altre addizioni i radicali ciclizzati danno successivamente luogo a catene laterali che formano gli anelli benzenici condensati:



La reazione di ripolimerizzazione avviene soprattutto in condizioni di carenza di ossigeno; in genere, la velocità di formazione degli IPA aumenta al diminuire del rapporto ossigeno/combustibile (Baird e Cann, 2004).

Le fonti di IPA di origine antropica possono essere pirolitiche e petrogeniche: le prime comprendono i processi di combustione ed incenerimento dei rifiuti, invece gli IPA introdotti nell'ambiente attraverso la contaminazione da petrolio o derivati dal petrolio, come le maree nere, i materiali di costruzione di strade e vari prodotti di raffineria, sono considerati come fonti petrogeniche (Youngblood e Blumer, 1975). I modelli molecolari generati da ogni fonte, tuttavia, sono come le impronte digitali, che permettono di ipotizzare i processi che generano gli IPA, studiando la loro distribuzione nei campioni. Gli IPA petrogenici sono generalmente caratterizzati da basso peso molecolare (LMW) e possiedono fino a quattro anelli, mentre i composti ad alto peso molecolare (HMW), contenenti quattro, cinque e sei anelli, sono considerati IPA pirolitici (Witt, 1998). Gli LMW sono altamente tossici, ma non cancerogeni per un ampio spettro di organismi marini, mentre i composti HMW sono meno tossici, ma possono avere un maggiore potenziale cancerogeno (Neff, 1979; Kennish, 1997).

In condizioni di anaerobiosi alcuni IPA possono anche derivare da precursori biogeni come alcuni pigmenti e gli steroidi (Wakeham *et al.*, 1980).

Gli IPA derivati da processi naturali sono il perilene, il retene, il fenantrene e gli omologhi. Essi sono anche formati naturalmente durante incendi boschivi o eruzioni vulcaniche (Suess, 1976; Shabad e Initskii, 1979). Sia i derivati dalla combustione che i combustibili fossili raggiungono prima o poi l'ambiente marino (Hites *et al.*, 1980; Boehm e Farrington, 1984; Prahl *et al.*, 1984; Voudrias e Smith, 1986; Bidleman *et al.*, 1990; Bouloubassi e Saliot, 1993; Bieger *et al.*, 1996; Maruya *et al.*, 1996; Simcik *et al.*, 1996; Wakeham, 1996; Bixian *et al.*, 2001; Mazeas e Budzinski, 2001; Countway *et al.*, 2003). I derivati dai combustibili fossili (petrolio) sono preferenzialmente biodegradabili rispetto a quelli derivati dai processi di combustione (Jones *et al.*, 1986).

Le attività antropiche sono generalmente riconosciute comunque come tra le più importanti fonti di IPA rilasciate nell'ambiente. I valori di base degli IPA nei sedimenti sembrano restare in un *range* compreso tra 0,01 e 1 mg/kg di peso secco. I livelli più elevati di petrolio nei sedimenti del fondo in genere si trovano alle foci dei fiumi, degli estuari, nelle baie, nelle aree di regolari di trasporto marittimo e di produzione di petrolio. Il perilene è considerato un marcatore dell'origine terrestre della materia organica nei sedimenti (Sportsol *et al.*, 1983; Colombo *et al.*, 1989; Budzinski *et al.*, 1997). Le concentrazioni di IPA nei sedimenti sono influenzate dalla composizione chimica dei campioni, dal contenuto di materia organica e dal contenuto di acqua (Kim *et al.*, 1999). In generale, i

sedimenti con alto contenuto di acqua (40% = fango) sono caratterizzati da elevati valori di IPA, invece la sabbia (20% di acqua) da un basso contenuto di questi composti (Belahcen *et al.*, 1997). I sedimenti con alto contenuto di sostanza organica sono caratterizzati da elevate concentrazioni di IPA (Witt, 1995). Le coppie di isomeri di IPA possiedono proprietà chimico-fisiche simili e quindi hanno simili affinità e distribuzione con le particelle e le altre matrici ambientali, anche se gli isomeri possono avere caratteristiche diverse a seconda della fonte d'origine (Dickhut *et al.* 2000). Il rapporto di alcune coppie di isomeri specifici di IPA può essere applicato come tracciante chimico per dedurre le possibili fonti di IPA in matrici ambientali.

Alcuni fattori all'interno o sulla superficie dei sedimenti, come la ripartizione degli IPA tra la fase solida e la fase acquosa, la bioturbazione ad opera di organismi, la degradazione selettiva microbica, la fotoossidazione e l'ossidazione chimica possono contribuire alla degradazione degli IPA e influire, dunque, sulla loro composizione complessiva (Hinga *et al.*, 1980; Gearing *et al.*, 1980; Lee e Ryan, 1983; Readman *et al.*, 1984).

Nel corso degli ultimi due decenni è stato mostrato con crescente evidenza che gli IPA, in condizioni anaerobiche, possono essere degradati da batteri della denitrificazione (McNally *et al.*, 1998) e dai solfo-riduttori (Coates *et al.*, 1997; Hayes *et al.*, 1999). Tuttavia, la degradazione anaerobica degli IPA è stata osservata, principalmente, in ambienti fortemente contaminati. Probabilmente le comunità microbiche in ambienti fortemente contaminati possono adattarsi ed acquisire la capacità di degradare gli IPA in condizioni anaerobiche (Coates *et al.*, 1997).

La concentrazione di IPA nei sedimenti varia, dunque, con le stagioni, poiché l'intensità di degradazione dipende dai cambiamenti stagionali: durante il periodo invernale la bassa temperatura limita la decomposizione microbica degli IPA e la fotoossidazione di questi composti, che essendo correlata all'intensità luminosa, è quindi più bassa nel periodo autunnale (Readman *et al.*, 1984; Whitehouse, 1984). La decomposizione fotochimica avviene mediante reazione con radicali -OH (Valerio *et al.*, 1984).

Gli idrocarburi policiclici aromatici associati ai sedimenti possono essere risospesi nella colonna d'acqua ad opera di processi fisici oppure essere rielaborati dagli organismi bentonici (Baker *et al.*, 1991; Lipiatou *et al.*, 1993). L'influenza della bioturbazione sulla degradazione degli IPA è stata esaminata in passato (Bauer *et al.*, 1988; Kure e Forbes, 1997; Madsen *et al.*, 1997). Il destino degli IPA in ambienti bioturbati sembra anche

dipendere dal comportamento alimentare degli organismi bentonici e dall'idrofobicità del composto (Kure e Forbes, 1997; Madsen *et al.*, 1997).

Il *microlayer* di superficie (<1 mm di superficie di acqua) è un potenziale sito di arricchimento dei composti organici idrofobici come i pesticidi e gli idrocarburi policiclici aromatici. Studi precedenti indicano che i contaminanti organici, ivi compresi i pesticidi organoclorurati (Bidleman e Oleney, 1974; Wu *et al.*, 1980; Hardy *et al.*, 1987) e gli IPA (Marty e Saliot, 1976; Hardy *et al.* 1987, 1990) sono spesso in alte concentrazioni nel *microlayer*. Questa è anche una zona importante dal punto di vista biologico, spesso utilizzato dai pesci e da altri invertebrati nei primi stadi di vita (Shanks, 1983; Hardy *et al.*, 1987). Quindi l'accumulo di sostanze inquinanti nel *microlayer* rappresenta un rischio potenziale per gli organismi marini (Hardy *et al.*, 1987; Kocan *et al.*, 1987; Word *et al.*, 1987).

1.7.1 – Aspetti tossicologici degli idrocarburi policiclici aromatici

Dal momento che questi composti sono biologicamente disponibili, si accumulano nei tessuti degli organismi e possono influire negativamente sul biota (McElroy *et al.*, 1989; Meador *et al.*, 1995). Grazie alla loro elevata lipofilia questi composti si accumulano preferibilmente nello strato lipidico animale e anche piccole concentrazioni di IPA in mare e nei sedimenti possono avere effetti negativi sugli organismi acquatici (Krahn *et al.*, 1986; McElroy *et al.*, 1989; Long e Morgan, 1991).

Gli IPA come benzo [a] antracene, benzo [b] fluoranthene, benzo [k] fluorantene, il benzo [a] pirene, crisene, dibenzo [a, h] antracene e indeno [1,2,3 -- c, d] pirene hanno un effetto mutageno e un potenziale effetto genotossico (Arcos e Argo, 1975; WHO, 1989).

Per il benzo[a]pyrene (BaP) è stata di recente provata la cancerogenicità sull'uomo, con conseguente riclassificazione da 2B (possibile cancerogeno) a 1 (cancerogeno per l'uomo) secondo la classificazione IARC (*Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum.*, 2008). Il BaP e sostanzialmente tutti gli IPA più pesanti del fluorantene, per la loro capacità di accumularsi nei suoli e nei sedimenti e le loro proprietà di bioconcentrazione, sono anche classificati come PBTs (Persistent, Bioaccumulable, and Toxic) secondo i criteri EPA 2009. Un secondo esempio di IPA di cui si conosce il potenziale cancerogeno è il benzo[a]antracene (quattro anelli condensati).

Le posizioni relative degli anelli condensati degli IPA svolgono un ruolo importante nel determinarne il livello di potenzialità cancerogena negli animali da esperimento. Gli IPA

presentano, infatti, una regione di recesso o “*bay region*” (figura 8) formata da una ramificazione nella sequenza degli anelli benzenici: l’organizzazione degli atomi di carbonio nelle regioni recesso conferisce un alto grado di reattività biochimica all’IPA:

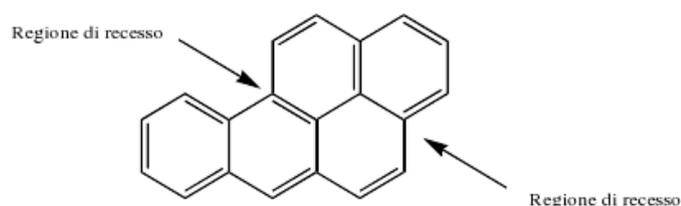
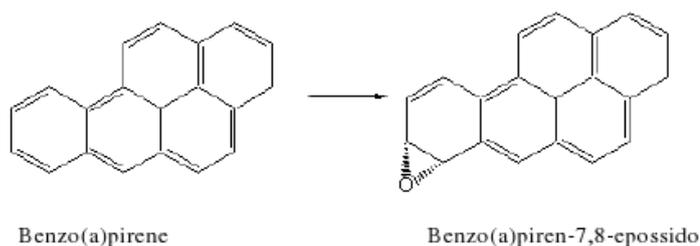


Fig. 8 - Bay region

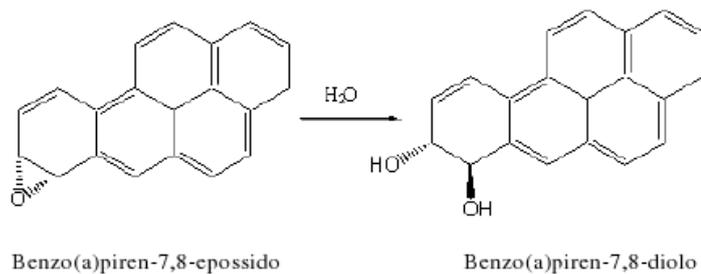
Le molecole di IPA non sono infatti agenti cancerogeni di per sé; esse devono andare incontro a trasformazioni attraverso varie reazioni metaboliche che avvengono nell’organismo, prima che si producano le vere specie cancerogene.

L’azione mutagena del benzo[*a*]pirene (BaP) inizia con la sua metabolizzazione in vari tessuti e organi (polmoni, pelle, esofago, colon, fegato, placenta, ecc.) e in genere il primo passo del suo metabolismo, finalizzato ad aumentarne l’idrofilicità e facilitarne l’escrezione attraverso urine e feci, è un’ossidazione. La reazione è catalizzata dal sistema enzimatico citocromo P450 associato al reticolo endoplasmatico delle cellule e porta alla formazione di epossidi e specie idrossilate in varie posizioni, che possono subire a loro volta ulteriori trasformazioni metaboliche. Quindi mentre il BaP in sé è chimicamente inerte (precancerogeno, richiede bioattivazione), nel corso di queste reazioni metaboliche possono formarsi degli intermedi elettrofili (cancerogeni e genotossici) capaci di interagire con varie macromolecole biologiche, tra cui il DNA.

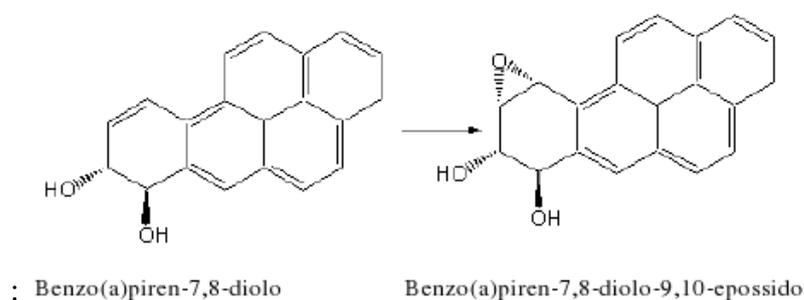
La prima trasformazione del BaP è dunque l’eossidazione nelle posizioni 7 e 8, le più reattive, che rappresentano la cosiddetta regione K:



L’eossido subisce quindi un attacco nucleofilo da parte dell’acqua, con formazione di un diolo, più idrosolubile e quindi più facilmente eliminabile:



Il benzo[a]pirene-7,8-diolo che non viene escreto dall'organismo può essere ulteriormente epossidato:



Il diolo epossido viene legato al DNA attraverso un attacco nucleofilo, ad esempio da parte dell'adenina. L'attacco covalente del grosso residuo idrocarburico rappresenta un evidente danno per il DNA. Questo danno provoca delle mutazioni e di conseguenza un aumentato rischio di cancerogenesi.

1.8 – L'acetilcolinesterasi (AChE)

L'acetilcolinesterasi è un enzima ubiquitario del regno animale che ha la funzione di scindere, a livello dello spazio sinaptico, le molecole del neurotrasmettitore acetilcolina nei suoi due componenti: l'acido acetico e la colina (figura 9).

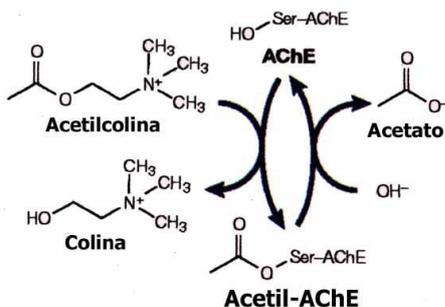


Fig. 9 - La reazione enzimatica dell'AChE (modificato da Soreq & Seidman, 2001).

L'acetilcolina media la comunicazione tra cellula e cellula a livello sinaptico ed è specifica delle giunzioni neuro-muscolari o sinapsi colinergiche che rappresentano un classico esempio di trasmissione chimica a livello sinaptico. In particolare, essa si trova nei muscoli striati con una concentrazione che aumenta in proporzione all'estensione dell'innervazione presente nel tessuto ed opera anche a livello delle sinapsi del sistema parasimpatico.

Nelle sinapsi colinergiche, le piccole vescicole sinaptiche presenti nel bottone sinaptico contengono grosse quantità di acetilcolina che viene prodotta dalla colina per mezzo dell'acetiltrasferasi. Quando la membrana del bottone sinaptico viene stimolata dall'arrivo di un potenziale d'azione, si aprono particolari canali per il Ca^{2+} voltaggio-dipendenti ed un flusso di ioni Ca^{2+} penetra all'interno del bottone sinaptico inducendo la fusione delle vescicole contenenti acetilcolina con la membrana presinaptica ed il rilascio del neurotrasmettitore nello spazio sinaptico. Il legame dell'acetilcolina a recettori specifici presenti nella membrana postsinaptica causa l'apertura di canali ionici permeabili sia al Na^+ che al K^+ il sodio si riversa rapidamente all'interno e nello stesso tempo il potassio fluisce all'esterno; poiché il gradiente del sodio attraverso la membrana è maggiore di quello del potassio, l'ingresso del sodio supera di gran lunga quello del potassio determinando la depolarizzazione della membrana postsinaptica e generando un nuovo potenziale d'azione. Dopo pochi millisecondi il canale si chiude e rimarrà chiuso fino a quando la concentrazione dell'acetilcolina, nello spazio sinaptico, si riduce a 10 nM. Prima dell'arrivo di un altro potenziale l'acetilcolina rimasta, deve essere degradata rapidamente per ripristinare la sensibilità dei recettori e l'eccitabilità della membrana postsinaptica. Questa reazione è catalizzata dall'acetilcolinesterasi (Garret *et al.*, 1998).

Le colinesterasi (ChE) vengono classificate a seconda della specificità del substrato che idrolizzano. Il nome delle ChE viene attribuito a seconda del substrato (ASCh, BSCh, PrSCh) che viene maggiormente idrolizzato (AChE, BChE, PrChE). Tra i vari phyla e anche tra le varie specie può esistere la diversità nel rapporto quantitativo tra gli enzimi suddetti (Moralev e Rozengart, 2001).

Il ruolo classico (neurotrasmissione) dell'AChE è stato studiato da molti autori e risulta essere ben chiaro, mentre i ruoli della butirrilcolinesterasi (BChE), della propionilcolinesterasi (PrChE) e quelli non classici dell'AChE sono ancora in fase di studio. Nei suoi ruoli non classici l'AChE potrebbe essere coinvolta nella proliferazione, nella migrazione e nella differenziazione cellulare, durante l'osteogenesi, lo sviluppo del tubo neurale, l'apoptosi, l'ematopoiesi, nella formazione di tumori delle cellule neurali e

non neurali e nelle placche amiloidi che si formano nella sindrome di Alzheimer (Grisaru *et al.*, 1999; Soreq *et al.*, 1991, 2001; Zhang *et al.*, 2002; Rees *et al.*, 2003; Vidal, 2005; Pick *et al.*, 2004).

Grazie agli studi ai raggi X (Habig *et al.*, 1988), condotti sulla struttura dell'acetilcolinesterasi in *Torpedo californica* (Elasmobranchi, Torpediniformes, Torpenidae), è stato possibile evidenziare il sito attivo dell'enzima, e precisamente esso risulta avere la forma di un'ansa dove si presume siano presenti molecole come la serina, l'istidina e l'acido glutammico. L'AChE può presentarsi sotto forme molecolari globulari o asimmetriche, costituite da subunità che possono essere monomeriche, dimeriche o trimeriche; le diverse conformazioni molecolari dipendono dalle condizioni fisiologiche e dal livello di sviluppo dell'esemplare studiato (Massoulié *et al.*, 1984). Nell'anellide *S. spallanzanii* sono state riconosciute due forme dimeriche di AChE (DS e HSDS) codificate ciascuna da 2 geni differenti, ma entrambe svolgono la stessa funzione (Talesa *et al.*, 1997).

La reazione catalitica inizia con un processo di acetilazione, durante il quale il gruppo acetato ($\text{CH}_3\text{CO}-$) dell'acetilcolina si lega per mezzo di un legame covalente alla serina del sito attivo e viene liberata una molecola di colina. In seguito, data l'instabilità del legame covalente, il gruppo acetato viene liberato rapidamente (figura 10).

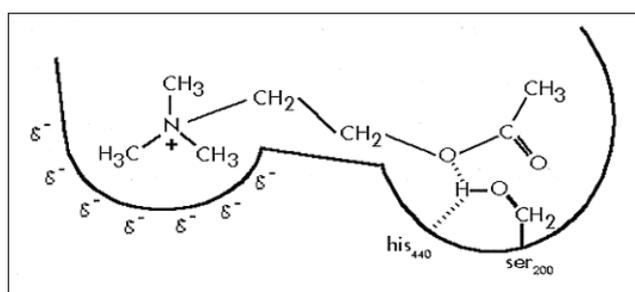


Fig. 10 – Sito attivo dell'enzima acetilcolinesterasi.

Molti autori hanno utilizzato l'AChE come *biomarker* di effetti neurotossici in programmi di biomonitoraggio (Guilhermino *et al.*, 1998; Cajaraville *et al.*, 2000).

L'inibizione dell'attività acetilcolinesterasica è un effetto biologico di esposizione specifica ai pesticidi organofosforici e ai carbammati (Galgani e Bocquenè, 1990; Scott, 1990; Jain-Rang *et al.*, 1998; Yadav *et al.*, 1998; Gill *et al.*, 1990; Rao *et al.*, 1991; Chambers *et al.*, 1992; Sanchez-Hernandez *et al.*, 1998; Fulton e Key, 2001).

Diverse ricerche hanno provato che anche altri tipi di contaminanti come metalli (Guilhermino *et al.*, 1998; Sturm *et al.*, 1999), detergenti (Regoli e Principato, 1995; Payne *et al.*, 1996; Labrot *et al.*, 1996; Guilhermino *et al.*, 1998; Sturm *et al.*, 1999) e composti in misture complesse (Dellali *et al.*, 2001) possono inibire l'attività dell'AChE (Durante, 1956; Whittaker, 1973; 1977). In molluschi bivalvi e vermi, l'AChE come *biomarker* di esposizione agli antiparassitari è stato studiato con successo (Escartín e Porte, 1997). L'effetto inibitorio dell'attività AChE è stato riscontrato in mitili esposti a benzo[a]pirene (Akcha *et al.*, 2000). Martínez-Tabche *et al.*, (1997) hanno rilevato che sia il Pb che il petrolio greggio può causare l'inibizione della AChE in *Cladoceran macrocopa*, in particolare esso si è dimostrato essere il più potente agente anticolinesterasico. Il Cd può anche influenzare la trasmissione colinergica nel cervello di ratti maschi adulti (De Castro *et al.*, 1996). Banni *et al.*, (2009) hanno mostrato come l'esposizione ad una miscela di IPA e metalli abbia portato ad effetti sinergici su una serie di *biomarkers* studiati, tra cui l'AChE. Altri autori hanno utilizzato l'AChE come *biomarker* di esposizione a IPA e metalli negli invertebrati (Bocquené *et al.*, 1997; Najimi *et al.* 1997; Hamza-Chaffai *et al.*, 1998) nei pesci (Flammarion *et al.*, 1996). L'attività acetilcolinesterasica è risultata inibita in *Salmo trutta* (Osteichthyes, Salmoniformes, Salmonidae), proveniente da due fiumi urbani, il fiume Virginia e il fiume Rennie's Mill (Payne *et al.*, 1996) e dal Mare del Nord (Galgani *et al.*, 1992), nei mitili *Dreissena polymorpha* (Bivalvia, Ostreoida, Ostreidae) (Ricciardi *et al.*, 2006) e *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mytiloida, Mytilidae) (Moreira e Guilhermino 2005) raccolti in ambienti potenzialmente contaminati e nei pesci *Ciprinus carpio* e *Ciprinus decemmaculatus* (Osteichthyes, Cipriniformes, Ciprinidae) (De la Torre *et al.*, 2002). In altri pesci, in seguito a inibizione dell'enzima ad opera di composti tossici, sono stati riscontrate anomalie nella respirazione (Klaverkamp *et al.*, 1997), nel nuoto (Matton e Lattam, 1969) e nel movimento (McKim *et al.*, 1987).

1.9 - Glutazione S-transferasi (GST)

Molti fattori abiotici agiscono da agenti proossidanti, in grado cioè di indurre un'aumento della concentrazione intracellulare delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Queste ultime sono in grado di contrastare l'aumento di stress ossidativo mediante induzione di livelli di enzimi antiossidanti che possono, in tal modo, essere utilizzati come *biomarkers* di stress ossidativo (Winston e Di Giulio, 1991; Livingstone, 2001).

Un esempio di indice biochimico, utilizzato nella valutazione dello stress ossidativo, sono le glutatione S-transferasi (GST) (figura 11), una classe di isoenzimi appartenenti alla fase II di detossificazione che catalizzano la coniugazione di varie molecole tossiche con il glutatione, rendendole meno reattive e più facilmente eliminabili dall'organismo (Jakoby 1978; Vidal *et al.*, 2002; Mannervick e Danielson 1988).

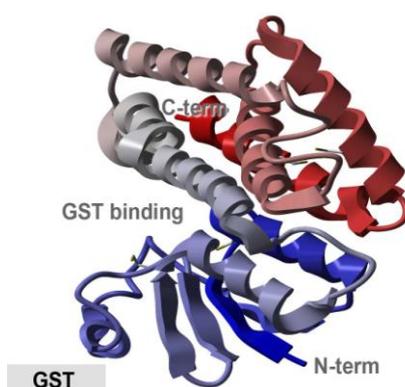


Fig. 11 - Glutatione S-transferase

L'azione detossificante della GST consiste nel catalizzare la coniugazione di differenti composti elettrofilici, mutageni, carcinogeni ed altri composti chimici con il centro nucleofilo del glutatione ridotto (GSH) al fine di rendere gli xenobiotici facilmente eliminabili attraverso l'escrezione (figura 12) (Chatterje e Bhattacharya, 1984).

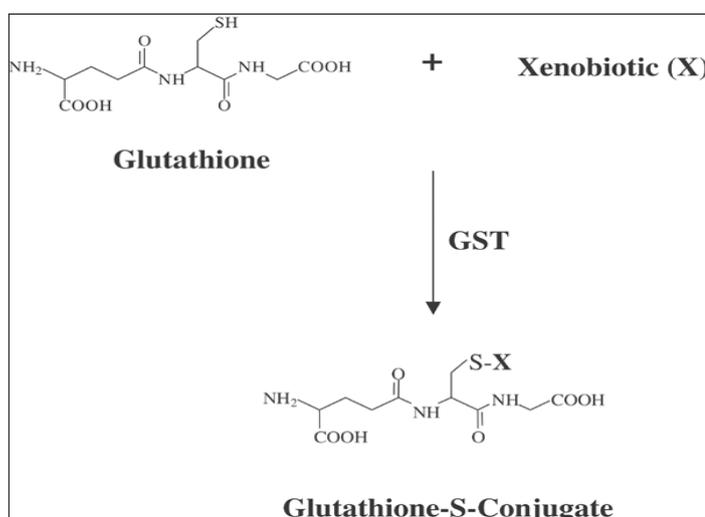


Fig. 12 – Attività enzimatica di GST

In studi di biomonitoraggio, che prevedono l'utilizzo di specie ittiche, è stato evidenziata una più elevata attività enzimatica negli esemplari di pesci esposti ad agenti proossidanti

(PCBs e PAHs) (Elia *et al.*, 2005), visto che l'enzima interviene nella detossificazione di inquinanti elettrofili.

Poiché molti induttori della sintesi delle GST sono specie inquinanti, l'espressione delle GST citosoliche nei mitili, ad esempio, può essere impiegata come indice di inquinamento dell'ambiente in cui tali organismi crescono e vivono (Fitzpatrick e Sheenan 1993; Sheenan *et al.*, 1994; Gowland *et al.*, 2002; Regoli e Principato, 1995; Regoli, 2002; Canesi *et al.*, 1999; Ventura *et al.*, 2002; Vidal *et al.*, 2002; Petrushok *et al.*, 2002; Argese *et al.*, 2004).

In studi ecotossicologici, riguardanti un programma di biomonitoraggio del Mar Adriatico, il GST è stato utilizzato come *biomarker* in *Mytilus galloprovincialis* (Gorbit *et al.*, 2007). Moreira *et al.*, (2005) ha studiato il GST come *biomarker* di contaminazione ambientale nella valutazione di rischio in un programma di biomonitoraggio ambientale lungo le coste nord-orientali portoghesi. Come riportato in molti studi, l'attività delle GST sembra essere correlata alle concentrazioni di PHAs, PCBs e metalli pesanti presenti nell'ambiente (Akcha *et al.*, 2000; Bacciocchi *et al.*, 2002; Canesi *et al.*, 1999; Stien *et al.*, 1998). L'esposizione del mollusco *A. colbecki* a concentrazioni subletali di Cu e Hg hanno mostrato una significativa riduzione dei livelli di glutathione S-transferase (Regoli *et al.*, 1997). Lopez *et al.*, 2002 e Santos *et al.*, 2003 hanno mostrato come il GST epatico in *Anguilla anguilla* potrebbe essere usato come *biomarker* specifico negli studi di contaminazione ambientale. Nel mollusco *Anodonta cygnea* l'attività GST, oltre ad essere relativa a fattori abiotici, decresce con l'aumentare del livello di pesticidi totali (Robillard *et al.*, 2003). Un'induzione dell'attività glutathione S-transferase (GST) nel teleosteo *P. microps* è stata trovata in pesci esposti a benzo[a]pyrene ed un'inibizione è stata osservata in seguito ad esposizione ad antracene (Vieira *et al.*, 2008). Gowland, *et al.*, (2002) hanno osservato l'induzione di un'elevata attività GST nel crostaceo *Carcinus maenas* da parte del cypermetrin, un chemioterapico utilizzato in acquacoltura. Altri autori hanno utilizzato il GST come *biomarker* di esposizione a PHAs (Shailaja *et al.*, 2003; Gowland *et al.*, 2002). Inoltre è stato recentemente identificato il GSTs legante il vanadio, designato AsGSTs nell'ascidia *Sydneiensis samea*. Questi studi hanno evidenziato l'abilità di GSTs di legare i metalli e come essa venga conservata in tutti gli organismi, suggerendo un ruolo dell'enzima nell'omeostasi dei metalli o nella loro detossificazione (Yoshinaga *et al.*, 2007). Lee *et al.*, 2006 hanno mostrato come alcuni EDCs possano agire sull'espressione genica del GST.

1.10 - Variazioni nella dieta: studio di isotopi stabili $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$

Negli ultimi venti anni circa, uno strumento molto utilizzato per studiare e ricostruire le reti trofiche di diversi ecosistemi sia terrestri che acquatici è stato quello degli isotopi stabili di carbonio ed azoto (Post *et al.*, 2002). È stato dimostrato in più occasioni, infatti, come l'analisi degli isotopi stabili risulti essere un potente strumento per lo studio dei rapporti trofici nei diversi ecosistemi (Michener e Schell, 1994).

I tessuti animali hanno una composizione isotopica in carbonio ed azoto che riflette quella della dieta assunta con leggere variazioni che dipendono dal frazionamento isotopico (DeNiro e Epstein, 1978; Vander Zanden e Rasmussen, 2001). Il frazionamento degli isotopi lungo la rete trofica può dare come risultato un leggero arricchimento isotopico nei tessuti animali in relazione alla composizione delle risorse utilizzate e quindi indicare la posizione trofica.

In generale l'arricchimento di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$, dalla preda al consumatore è di 3-4‰ e di circa 1‰ rispettivamente (De Niro e Epstein, 1978, 1981; Minawaga e Wada, 1984). In particolare il $\delta^{15}\text{N}$ è utile nell'identificazione del livello trofico.

Recenti studi indicano come il frazionamento degli isotopi dell'azoto dipenda da molteplici fattori, come l'azoto contenuto dei prodotti alimentari, le condizioni ambientali e anche la tassonomia (Vander Zanden e Rasmussen, 2001; Vanderkluft e Ponsard, 2003; Mc Cutchan *et al.*, 2003).

Il $\delta^{13}\text{C}$, durante gli scambi trofici lungo le reti, ha una bassa variabilità e può essere utilizzato per identificare l'ultima risorsa da cui un organismo ha assunto carbonio tra le varie presenti.

I valori trovati di $\delta^{13}\text{C}$ nei produttori primari marini (come il fitoplancton e microfitobentos) sono anche responsabili delle differenze nei valori isotopici dei loro consumatori (Riera *et al.*, 1999), consentendo delle distinzioni tra i percorsi pelagici e bentonici (Hobson *et al.*, 2002; Le Loc'h e Hily, 2005) o litorali e pelagici (Vander Zanden e Vadeboncoeur, 2002).

Le forme fitoplanctoniche sono tra le principali componenti del cibo dei filtratori marini. In generale, la dieta degli organismi filtratori è una miscela di materiale organico proveniente da varie fonti che sono state sospese nella colonna d'acqua o risospeso da correnti di marea (Prins *et al.*, 1998). Le differenze isotopiche tra gli invertebrati filtratori sta nell'utilizzazione preferenziale di diverse classi dimensionali della materia organica particellata (POM), come riportato da Lesser *et al.*, (1992) per *Mytilus edulis*, *C. fornicata*

e *Ciona intestinalis*. Tra gli organismi filtratori può sussistere una notevole variabilità intra- e interspecifica: essi possono essere potenzialmente in grado di utilizzare le stesse risorse alimentari senza avere simili valori isotopici consumando il cibo in diversi siti e in diverse proporzioni e mostrando così una certa plasticità trofica su piccola scala (Dubois *et al.*, 2007).

La plasticità trofica è un meccanismo comune nei consumatori, che consente loro di adattarsi alle disponibilità di prodotti alimentari ambientali (Pinnegar e Polunin 2000). Ciò è stato dimostrato di recente nel bacino mediterraneo per specie ittiche associate con praterie a *Posidonia* (Vizzini e Mazzola, 2006). Nel complesso, su piccola scala spaziale la variabilità è altamente correlata a processi di idrodinamica. Nelle zone costiere del bacino Mediterraneo, Vizzini e Mazzola (2006) hanno osservato piccole differenze nei valori isotopici dei consumatori correlati alle variazioni ambientali (regime idrodinamico, copertura della vegetazione).

2. OBIETTIVI

L'obiettivo principale di questo studio é stato quello di valutare le diverse risposte prodotte dall'inquinamento chimico, utilizzando la specie di polichete *S. spallanzanii* come possibile bioindicatore.

A tal fine, lo studio è stato condotto affrontando diversi punti d'indagine, quali la valutazione del bioaccumulo di idrocarburi policiclici aromatici e di metalli pesanti, e gli effetti di queste sostanze su alcune variabili biologiche, al fine individuarne le risposte ed indagare sul possibile utilizzo di queste come *biomarkers* nella specie oggetto di studio.

Gli obiettivi sono stati raggiunti attraverso la realizzazione di esperimenti di *transplanting* tra aree marine portuali a diverso impatto antropico, situate sul versante occidentale del litorale siciliano: l'area portuale di Cala e di Acquasanta in provincia di Palermo, e quella di Licata in provincia di Agrigento.

Gli strumenti utilizzati in questa ricerca hanno riguardato sia la caratterizzazione ambientale delle aree portuali (Cala, Licata ed Acquasanta) interessate all'attività di *transplanting*, sia gli esemplari di *S. spallanzanii*.

Sulla base delle conoscenze circa i danni causati dai suddetti xenobiotici, si è ritenuto opportuno indagare sui seguenti aspetti della biologia di questa specie di polichete:

- dieta e processo di acclimatazione degli organismi, mediante l'analisi degli isotopi stabili del C e dell'N;
- capacità di bioaccumulo e smaltimento di IPA e metalli pesanti nei policheti, mediante l'analisi degli stessi contaminanti negli organismi (tubi e corpi) controllo e trapiantati e nelle matrici abiotiche dei siti di origine e di destinazione, valutando l'esistenza di una possibile correlazione tra i risultati nella matrice biotica e quelli della matrice abiotica;
- effetti neurotossici e meccanismi di detossificazione in *S. spallanzanii*, mediante analisi enzimatiche dell'acetilcolinesterasi (AChE) e della glutatione S-transferasi.

3. MATERIALI E METODI

3.1 – AREE DI STUDIO

Per raggiungere gli obiettivi del lavoro, sono state scelte tre aree portuali in cui è stata individuata la presenza della specie di polichete *S. spallanzanii*. Le aree oggetto di studio, situate sul versante occidentale del litorale siciliano, sono: l'area portuale di Cala e quella di Acquasanta in provincia di Palermo, e l'area portuale di Licata in provincia di Agrigento (figura 13).

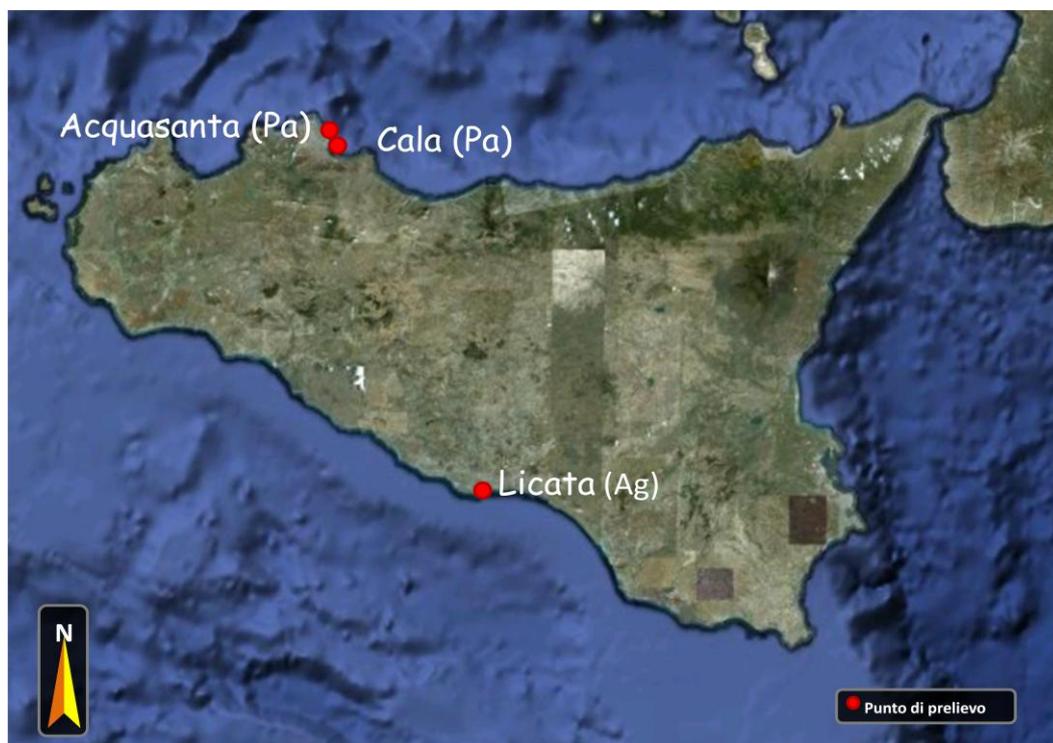


Fig. 13 – Mappa relativa alle aree marine portuali indagate: Cala, Acquasanta e Licata.

Il porto della Cala è una conca all'interno del porto commerciale di Palermo, protetto a sua volta da una diga foranea e da un molo di sottoflutto, alle coordinate Lat. 38°07',22 N – Long. 13°22',66 E. Il fondo marino è fangoso e sabbioso, con profondità vicino alla bancina di 3-5 m (figura 14).



Fig. 14 – Foto aerea del porto di Cala (Palermo).

Il porto dell'Acquasanta si trova alle falde di Monte Pellegrino nel quartiere Acquasanta di Palermo, ed è costruito su una piccola insenatura tra alte pareti rocciose, proprio a fianco del Porto di Palermo a poche decine di metri dal Porto dell'Arenella, alle coordinate Lat. $38^{\circ}08',62$ N – Long. $13^{\circ}22',37$ E. Il fondo marino è sabbioso e roccioso, con profondità vicino alla banchina di 0,5-3 m (figura 15).



Fig. 15 –Foto aerea del porto di Acquasanta (Palermo).

Il porto di Licata, in provincia di Agrigento, si trova su una costa sabbiosa prospiciente, alla foce del fiume Salso, alle coordinate Lat. 37°05' 17 N - Long. 13°56' 53 E, ed è artificiale. Il fondo marino è sabbioso, con profondità vicino all'impianto di 3-7 m (figura 16). Gli scali portuali più prossimi sono: ad ovest il Porto Empedocle e ad est il Porto di Gela. All'interno del porto si trova l'impianto di acquacoltura dell'azienda ittica San Giorgio.



Fig. 16 – Foto aerea dell'impianto di acquacoltura dell'azienda ittica San Giorgio, all'interno del porto di Licata.

3.2 – CAMPIONAMENTO E METODICHE ANALITICHE PER LE ACQUE

3.2.1 - Campionamento

Il campionamento e la conservazione dei campioni d'acqua sono stati eseguiti conformemente alle norme generali riportate nella Sezione 1030 "Metodi campionamento" APAT. I campioni sono stati raccolti ad una sola altezza vicino alla superficie sopra il fondo del mare in tre repliche.

L'acqua è stata suddivisa in diverse aliquote a seconda del tipo di analisi da condurre, e sono elencate in tabella 2:

Tabella 2 – Variabili analizzate nelle acque

ANALISI ACQUE			
contaminanti organici (IPA)	clorofilla-a feopigmenti	nutrienti	isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$

Per i campioni d'acqua destinati all'analisi dei contaminanti organici (IPA), il campionamento è stato effettuato in bottiglie di vetro scuro della capacità di 1-2 L, previamente decontaminati con esano ed acetone. I campioni sono stati conservati al buio a -20°C , fino alle operazioni di estrazione.

Per i campioni d'acqua destinati all'analisi di clorofilla-a, feopigmenti, nutrienti e degli isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ il campionamento è stato effettuato in bidoni della capacità 10 L. I campioni sono stati filtrati in giornata, per raccogliere la fase particellata della matrice acquosa (POM). I filtri per il calcolo di clorofilla-a e feopigmenti sono stati conservati a -20°C , mentre quelli per l'analisi isotopica sono stati seccati in stufa a 60°C e poi conservati al fresco per le successive analisi. Il disciolto, separato durante la fase di filtrazione, è stato suddiviso in aliquote di 200 ml, congelato a -20°C per essere utilizzato per le analisi dei nutrienti.

3.2.2 – Variabili chimico-fisiche

Il monitoraggio delle variabili chimico-fisiche delle acque è stato effettuato, in maniera continuativa e in tempo reale, mediante l'utilizzo di una sonda multiparametrica YSI 556 MPS, integrata ad un sistema di acquisizione dati. Il controllo delle variabili è stato fatto al tempo t_0 e t_1 , rispettivamente all'inizio e alla fine dell'esperimento di *transplanting* la cui durata è stata di un mese. Lo strumento multifunzione ha consentito l'acquisizione contemporanea dei seguenti parametri riportati in tabella 3:

Tabella 3 – Variabili chimico-fisiche monitorate nelle acque.

profondità	pressione	temperatura	conducibilità
ossigeno disciolto	pH	salinità	potenziale redox

3.2.3 - Nutrienti

3.2.3 a - Azoto e fosforo totale

La procedura analitica, secondo il metodo di Valderrama (1981) nella versione di Koroleff (1983a, 1983b), prevede che l'azoto e il fosforo vengano dosati dopo ossidazione e idrolisi

dei composti inizialmente presenti nel campione, in una stessa miscela di reazione, con la produzione, rispettivamente, di nitrato e ortofosfato, che, al loro volta, verranno analizzati secondo le metodiche sottoriportate, specifiche per i nitriti e per gli ortofosfati. L'agente ossidante utilizzato è il potassio persolfato. I dati sono stati espressi in $\mu\text{g/l}$.

3.2.3 b - Nitriti

Il metodo analitico si è basato sulla formazione di un composto diazioco colorato che viene dosato per via colorimetrica. Tale metodo, proposto originariamente da Griess-Ilosvay (Ilosvay, 1889) e successivamente modificato da Shinn (1941), è stato applicato alle acque di mare da Bendschneider & Robinson (1952). La lettura spettrofotometrica è avvenuta a 543 nm. I risultati sono stati espressi in $\mu\text{g/l}$.

3.2.3 c - Nitrati

Il metodo proposto per l'analisi dei nitrati si è basato sulla loro riduzione a nitriti (tramite il cadmio) e sul successivo dosaggio della concentrazione dei nitriti totali, utilizzando la metodica colorimetrica sopradescritta. Tale metodo è stato proposto da Morris & Riley (1963) e, successivamente, modificato da Nydhal (1976) e Grasshoff (1983). I risultati sono stati espressi in $\mu\text{g/l}$.

3.2.3 d - Ortofosfati

Il metodo di Murphy & Riley (1962), secondo la versione rivisitata da Strickland & Parsons (1968), si è basato sulla formazione di un complesso fosfomolibdico (blu) la cui concentrazione è stata misurata per via colorimetrica (Deniges, 1920). La lettura spettrofotometrica è stata condotta a 882 nm. I risultati sono stati espressi in $\mu\text{g/l}$.

3.2.4 – Clorofilla-a

Il metodo consiste nell'estrazione a freddo dei pigmenti clorofilliani dalle cellule, tramite una miscela di acetone ad acqua, successivamente alla raccolta del particolato sospeso, mediante filtrazione su filtro in fibra di vetro. Un volume d'acqua di 2000 ml è stato filtrato entro e non oltre 4 ore dal prelievo, su filtri in fibra di vetro Whatman GF/F di porosità nominale di 0.45 μm e di 47 mm di diametro, montati su setti di filtrazione Millipore; il filtro quindi è stato conservato in freezer (-20°C) sino al momento dell'analisi. L'estrazione dei pigmenti fotosintetici dal particolato raccolto nel filtro è avvenuta tramite una soluzione di acetone al 90 % freddo. Il metodo utilizza letture spettrofotometriche a

più lunghezze d'onda - 630, 647, 664, 665 e 750 nm - (Jeffrey & Humphrey, 1975; Lorenzen & Jeffrey, 1980) e la successiva aggiunta di acido cloridrico 0,66 N (Lorenzen, 1967). I risultati sono stati espressi in $\mu\text{g/l}$.

3.2.5 - Isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$

I campioni di acqua sono stati filtrati su filtri in fibra di vetro Whatman GF/F di porosità nominale di $0.45 \mu\text{m}$ e di 47 mm di diametro (precedentemente calcinati in stufa). I filtri sono stati essiccati a 60°C e polverizzati con l'ausilio di un mortaio e un pestello di agata e pesati con una bilancia microelettronica. L'analisi è stata condotta mediante spettrometro di massa (Thermo-Electron Delta Plus XP) accoppiato ad un analizzatore elementare (ThermoElectron EA 1112).

La composizione isotopica è stata espressa come $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.

$$\delta^{13}\text{C} \text{ o } \delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = [(\text{R}_{\text{campione}} / \text{R}_{\text{standard}}) - 1] * 10^3$$

R è il rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ o $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$. I rapporti isotopici dei campioni sono stati comparati in riferimento a gas standard secondari (rispettivamente NBS 20 – Solenhofen Limestone, NBS 21 – Spectrographic Graphite, e NBS 22 – Hydrocarbon Oil per il carbonio e standard IAEA N-1, N-2, N-3, tutti solfati di ammonio, per l'azoto), i cui rapporti isotopici sono stati a loro volta calibrati con standard internazionali (rispettivamente con calcare marino [V-PBD] per il carbonio e con l'azoto atmosferico per l'azoto).

3.2.6 – Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

La determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici è stata condotta mediante 3 passaggi: estrazione, concentrazione dell'estratto e successiva analisi strumentale attraverso l'ausilio di un GC/MS.

3.2.6 a - Estrazione

L'estrazione degli IPA è avvenuta su fase solida (SPE) utilizzando Empore disk C1 (o cartuccia C18), montati sui setti di filtrazione Millipore. I dischi sono stati inizialmente lavati con 10 mL di diclorometano e successivamente condizionati con 10 mL di metanolo utilizzando un sistema di filtrazione sotto vuoto. Ai campioni sono stati aggiunti 250 μl di una soluzione in cicloesano di standard surrogati deuterati: antracene d_{10} , benzo(a)antracene d_{12} (500 $\mu\text{g/L}$). Due litri di campione contenente gli standard e 10 mL di

metanolo sono stati filtrati facendo un vuoto di 10 cm di Hg. Alla fine della filtrazione, è stata fatta passare un po' di aria attraverso la membrana per alcuni minuti per rimuovere l'eccesso di acqua. Gli analiti sono stati eluiti facendo passare 20-40 mL di diclorometano e regolando il vuoto a circa 0,5 cm di Hg. Gli eluati sono stati raccolti all'interno dei provettoni BUCHI e concentrati mediante evaporatore BUCHI secondo il seguente programma:

- temperatura di riscaldamento: 38°C;
- temperatura di refrigerazione: -2°C;
- tempo di evaporazione: 59 min;
- velocità: 180 rpm;
- pressione secondo il seguente programma riportato in tabella 4:

Tabella 4 – Programma di pressione del *vacuum*

	P_i (torr)	P_f (torr)	tempo (min)
FASE 1	420	353	8
FASE 2	353	285	1
FASE 3	285	285	10
FASE 4	285	240	1
FASE 5	240	240	32
FASE 6	240	240	1
FASE 7	240	188	6

L'estratto, ridotto ad 1 ml, è stato trasferito in *vials* e portato a secco sotto flusso di azoto a temperatura ambiente. Il residuo secco è stato disciolto in 250 µl di soluzione di cicloesano contenente seguenti standard interni deuterati: acenaftene D₁₀, fenantrene D₁₀, crisene d₁₂ e perilene d₁₂ (500 µg/L).

3.2.6 b - Analisi GC/MS

L'analisi qualitativa e quantitativa degli IPA è stata effettuata mediante un Gas Cromatografo accoppiato ad uno Spettrometro di Massa (GC/MS-QP 2010 Plus Shimadzu) attrezzato con un sistema di acquisizione dati (Shimadzu, CLASSE 2010). È stata utilizzata la modalità splitless (0,50 min), una temperatura d'iniezione di 250°C e un flusso totale di 20,6 ml/min. Il programma di temperatura è stato: da 40 °C (2 min) a 240 °C a 22°C/min, a 330 °C a 10°C/min (5 min). Il gas carrier è stato l'elio (flusso 1,7 ml/min) e la temperatura dell'interfaccia è stata impostata a 330 °C. L'analisi è stata condotta secondo la modalità Selected Ion Monitoring (SIM). Gli IPA analizzati sono riportati in tabella 5:

Tabella 5 – Analiti e rispettivi frammenti molecolari

ANALITI e FRAMMENTI MOLECOLARI			
naftalene	128/64	benzo (a) antracene	228/114
acenaftalene	152/76	crisene d12	240
acenaftalene d10	164	crisene	228/114
acenaftene	154/152	benzo (b) fluorantene	252/126
fluorene	166/164	benzo (k) fluorantene	252/126
fenantrene d10	188	benzo (e) pirene	252/126
fenantrene	178/89	benzo (a) pirene	252/126
antracene d10	188	perilene d12	264
antracene	178/89	perilene	252/126
fluorantene	202/101	indeno (1,2,3-cd) pirene	276/138
pirene	202/101	dibenzo (a,h) antracene	278/139
benzo (a) antracene d12	240	benzo (g,h,i) perilene	276/138

3.3 - CAMPIONAMENTO E METODICHE ANALITICHE PER I SEDIMENTI

3.3.1 – Campionamento

I campioni di sedimento sono stati raccolti con l'ausilio di una benna Van Veen (figure 17, 18) in tre siti della stessa area portuale. Il campionamento è stato fatto anche in questo caso al tempo t_0 e t_1 , e per ogni sito sono state prelevate tre repliche.



Figg. 17, 18 – Campionamento dei sedimenti mediante l'uso della benna Van Veen.

I campioni di sedimento sono stati posti all'interno di contenitori di vetro scuro e conservati a -20°C per le successive analisi di laboratorio che hanno riguardato il calcolo delle variabili riportate in tabella 6.

Da ciascun campione di sedimento sono stati eliminati i corpi grossolani presenti (pietre, conchiglie, alghe, vegetali, ecc.). In seguito i sedimenti sono stati omogeneizzati con l'ausilio di spatole di porcellana, posti nuovamente nei contenitori di vetro scuro e conservati a -20°C in attesa delle analisi di laboratorio.

Tabella 6 - Variabili analizzate nei sedimenti.

ANALISI SEDIMENTO					
contam. organici (IPA)	contam. inorganici (metalli pesanti)	clorofilla-a feopigmenti	fosforo e azoto tot.	tot umidità mat. organica	isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$

3.3.2 - Determinazione del contenuto di acqua

I campioni sono stati centrifugati (IEC CL31 *Multispeed Centrifuge*, Thermo Electron Corporation (USA), n° giri 10000 per 15 minuti) allo scopo di allontanare la maggior parte dell'acqua in eccesso. Quindi è stato valutato il contenuto di umidità come perdita in peso, dopo avere essiccato il campione a 105°C per una notte. Per valutare il contenuto di acqua di cristallizzazione i campioni sono stati tenuti in stufa a 180°C per un'altra notte e ne è stata valutata la perdita in peso.

3.3.3 - Determinazione del contenuto di sostanza organica

La materia organica totale è stata quantificata per calcinazione, ponendo i campioni già secchi e pesati, in muffola a 450 °C per almeno 4 h fino a peso costante e poi sono stati ripesati. Dalla differenza dei pesi ($p_{\text{finale}} - p_{\text{iniziale}}$) sono stati calcolati i valori materia totale inorganica presente (IM). La componente organica (OM) è calcolata dalla differenza tra il peso secco totale e la IM.

3.3.4 - Fosforo totale

Il fosforo totale, presente sotto forme minerali od organiche, è stato trasformato ad ortofosfato mediante digestione con acidi minerali a caldo. L'ortofosfato è stato fatto reagire con molibdato ammonico e tartrato di antimonio e potassio. In ambiente acido si forma un eteropoliacido che viene ridotto a blu di molibdeno con acido ascorbico. La determinazione fotometrica, secondo la metodica IRSA (1985), è stata effettuata a 650 nm. I risultati sono stati espressi in $\mu\text{g/g}$ di peso secco.

3.3.5 - Azoto totale

Dopo disidratazione, il campione è stato macinato e ridotto in polvere tramite un pestello in agata e posto in provette per passare alla fase successiva di pesatura. Sono stati pesati circa 3-4 mg di campione macinato con una bilancia analitica; l'operazione è avvenuta direttamente in capsule di stagno della larghezza di 5x9 mm, precedentemente lavate con

acetone ed esano utilizzando reagenti di grado analitico ed asciugate per una notte. Le capsule riempite di campione sono state ridotte tramite pinzette in piccole sfere e sottoposte all'analisi mediante analizzatore elementare di carbonio e azoto CHN (Thermo-Electron Flash EA 1112). La calibrazione iniziale dello strumento è stata effettuata con l'immissione di due capsule vuote e di quattro standard di acetanilide ed il risultato è stato calcolato in termini di K-factor. Ogni quattro campioni sono stati analizzati due standard di acetanilide per ricalcolare il fattore di calibrazione ed inoltre sono stati analizzati due bianchi (capsula vuota precedentemente lavata in acetone) il cui valore medio è stato sottratto al valore determinato su ogni singolo campione.

Il gas utilizzato per il trasporto è l'elio e per l'ossidazione l'ossigeno. La colonna di ossidazione è costituita da cromo ossido e argento cobalto ossido mentre la colonna di riduzione è costituita da rame filamentoso ridotto (Pella e Colombo, 1973). A questo punto è stata effettuata la combustione ad una temperatura di 950 °C. La separazione cromatografica dell'azoto e dell'anidride carbonica è stata ottenuta con una colonna Porapak QS di 2 m a 50 °C con rilevatore a conducibilità termica.

3.3.6 – Clorofilla-a e feopigmenti

La stima dei fitopigmenti nel sedimento è stata condotta secondo il metodo di Plante-Cuny (1974). L'estrazione dei pigmenti fotosintetici è avvenuta in una soluzione di acetone al 90 % freddo. Su ogni estratto la concentrazione della clorofilla-a è stata determinata per via spettrofotometrica alle λ di 665 e 750 nm. La quota dei feopigmenti è stata determinata trattando successivamente l'estratto con acido cloridrico 0,66 N. I risultati sono stati espressi in $\mu\text{g/g}$ di peso secco.

3.3.7 – Metalli

La determinazione dei metalli nei sedimenti è stata condotta seguendo il protocollo del metodo US EPA 3052/96 (*hotplate digestion technique*) e del metodo US EPA 6010B/96, rispettivamente per la digestione e per l'analisi di: mercurio (Hg), cadmio (Cd), rame (Cu), zinco (Zn), piombo (Pb), arsenico (As), cromo (Cr), nichel (Ni) ed alluminio (Al).

Il metodo EPA 3052/96 prevede la digestione totale del sedimento mediante mineralizzazione con miscela di acidi forti, a caldo, in un sistema chiuso a microonde al fine di portare in soluzione i metalli associati alla matrice. Il contenuto dei metalli è stato poi determinato per spettrometria di emissione atomica mediante plasma induttivamente

accoppiato (*Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer*, ICP-OES; Varian Vista MPX). Tutte le analisi sono state condotte in triplice replica.

3.3.7 a – Mineralizzazione

Circa 0,2 g dei campioni di sedimento secco sono stati mineralizzati con acidi soprapuri. Ad ogni aliquota di campione sono stati aggiunti: 9 ml di HNO₃ Suprapur al 67-70%, 3 ml di HF Suprapur al 40%, 0,5 ml di H₂O₂ Suprapur al 30% e 2,5 ml di acqua bidistillata MilliQ. In seguito, la miscela è stata introdotta all'interno di contenitori in *teflon* in forno a microonde dotato di carosello rotante (CEM, Modello MARS[®]) e sottoposta ad attacco in “bomba”, come descritto dalla tabella 7:

Tabella 7 - Step mineralizzazione

Step	Potenza	%	Rampa	Ps	°C	Durata
1	1200W	100	05:00	800	170	02:00
2	1200W	100	03:00	800	180	09:30

3.3.7 b - Analisi atomica

La determinazione quantitativa dei metalli dei campioni mineralizzati e del materiale certificato è stata effettuata attraverso l'impiego di uno spettrometro ICP-OES, Varian Vista MPX (*Inductively Couplet Plasma-Optical Emission Spectrometer*), dotato di un autocampionatore e di un generatore di vapori VGA-77 che consente la determinazione del mercurio, dell'arsenico e degli elementi che possono formare idruri volatili.

La quantificazione dei metalli è basata sulle preparazione di curve di calibrazione a partire da *standard multi-element*. Tali curve sono state determinate diverse volte durante il periodo di analisi.

Per ogni elemento analizzato è stata scelta una specifica lunghezza d'onda (λ): Cd a 214.439 nm, Cu a 324.754 nm, Cr a 283.563 nm, Pb a 220.353 nm, Ni a 230.299 nm, Zn a 213.857 nm, Hg a 184.887 nm e As a 188.980 nm. Il materiale di riferimento certificato, sopradescritto, è analizzato per valutare la percentuale di recupero del processo di mineralizzazione, che è risultata compresa tra l'80% e il 102 %. Il controllo analitico è effettuato mediante la mineralizzazione di materiale certificato specifico per la matrice analizzata e, precisamente, Marine Sediment MESS-3 (National Research Council of Canada).

3.3.8 – Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

La determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici è stata condotta mediante 4 passaggi: preparazione del campione, estrazione con *soxhlet*, concentrazione dell'estratto e successiva analisi strumentale con GC/MS.

3.3.8 a – Preparazione del campione

Scartato qualsiasi oggetto estraneo e grossolano contenuto nel campione, come bastoni, foglie e pietre, è stato eliminato lo strato d'acqua sovrastante il sedimento, e lo stesso è stato mescolato accuratamente. Sono stati pesati 5-10 g di campione: un'aliquota è stata essiccata in stufa a 30°C fino a peso costante per qualche giorno e utilizzata per l'analisi, mentre un'altra è stata messa in muffola a diverse temperature: 105°C, 180°C, 550°C, per determinare rispettivamente l'acqua di idratazione, di cristallizzazione e la materia organica presente. Prima della pesata il campione è stato lasciato raffreddare e ridotto in polvere mediante mortaio e pestello di agata. Ai campioni essiccati sono stati aggiunti 10 g di solfato di sodio anidro per eliminare eventuali tracce di acqua. Al campione sono stati aggiunti 250 µl di una soluzione in cicloesano di standard surrogati: antracene d₁₀, benzo-antracene d₁₂ (500 ppb).

3.3.8 b – Estrazione *soxhlet*

I campioni già pesati sono stati messi in ditali di cellulosa e poi montati in un *soxhlet* BUCHI (B811) (figura 19). L'estrazione è stata fatta utilizzando 150 ml di una miscela di diclorometano/pentano 1:1 (v/v), procedendo con modalità *soxhlet warm* secondo il seguente programma:

- step 1 - (estrazione): livello di riscaldamento 9, per 2h (25 cicli);
- step 2 - (risciacquo): non usato;
- step 3 - (evaporazione): livello di riscaldamento 9, per 3 min; temperatura di refrigerazione -1°C.



Fig. 19 – Estrattore BUCHI (B811).

Gli eluati sono stati raccolti all'interno dei provettoni BUCHI e concentrati mediante evaporatore BUCHI, seguendo lo stesso programma utilizzato per le acque. L'estratto ridotto ad 1 ml è stato trasferito in *vials* e portato a secco sotto flusso di azoto a temperatura ambiente. Il residuo secco è stato disciolto in 250 μ l di soluzione in cicloesano contenente i seguenti standard interni deuterati: acenaftene d_{10} , fenantrene d_{10} , crisene d_{12} e perilene d_{12} (500 μ g/L).

3.3.8 c – Analisi GC/MS

L'analisi qualitativa e quantitativa degli IPA è stata effettuata mediante un gas cromatografo accoppiato ad uno spettrometro di massa (GC/MS-QP 2010 Plus Shimadzu) attrezzato con un sistema di acquisizione dati (Shimadzu, CLASSE 2010). È stata utilizzata la modalità splitless (0,50 min), una temperatura d'iniezione di 250°C e un flusso totale di 20,6 ml/min. Il programma di temperatura é: da 40 °C (2 min) a 240 °C a 22°C/min, a 330 °C a 10°C/min (5 min). Il gas carrier è l'elio (flusso 1,7 ml/min) e la temperatura dell'interfaccia di 330 °C. L'analisi è stata eseguita secondo la modalità Selected Ion Monitoring (SIM). Gli analiti oggetto di studio sono gli stessi riportati in tabella 2. Le concentrazioni degli analiti nei sedimenti sono state riferite a uno standard certificato BCR-535 n°203 (campione di acque fluviali portuali). I dati sono stati espressi in μ g/Kg di peso secco.

3.3.9 - Isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$

I campioni di sedimento destinati all'analisi degli isotopi del $\delta^{15}\text{N}$ sono stati setacciati con filtri con porosità di 63 μ m, successivamente essiccati a 60°C, polverizzati con l'ausilio di mortaio e pestello di agata, e pesati con bilancia microelettronica. I campioni di sedimento destinati all'analisi degli isotopi del $\delta^{15}\text{C}$ sono stati acidificati con HCl 6N e setacciati con

filtri con porosità di 63 µm, successivamente essiccati a 60°C, polverizzati, e pesati con bilancia microelettronica. L'analisi è stata condotta mediante spettrometro di massa (Thermo-Electron Delta Plus XP) accoppiato ad un analizzatore elementare (ThermoElectron EA 1112).

La composizione isotopica è stata espressa come $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.

$$\delta^{13}\text{C} \text{ o } \delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = [(R_{\text{campione}} / R_{\text{standard}}) - 1] * 10^3$$

R è il rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ o $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$. I rapporti isotopici dei campioni sono stati comparati in riferimento a gas standard secondari (rispettivamente NBS 20 – Solenhofen Limestone, NBS 21 – Spectrographic Graphite, e NBS 22 – Hydrocarbon Oil per il carbonio e standard IAEA N-1, N-2, N-3, tutti solfati di ammonio, per l'azoto), i cui rapporti isotopici sono stati a loro volta calibrati con standard internazionali (rispettivamente con calcare marino [V-PBD] per il carbonio e l'azoto atmosferico per l'azoto).

3.4 - CAMPIONAMENTO E METODICHE ANALITICHE PER GLI ORGANISMI

3.4.1 – Campionamento e *transplanting*

Il *transplanting* degli organismi è stato condotto, tra l'area portuale della Cala, l'area sede dell'impianto di acquacoltura, all'interno del porto di Licata, e l'area portuale dell'Acquasanta.

L'esperimento è avvenuto in giornata, e gli esemplari della specie *S. spallanzanii* sono stati prelevati dall'area nativa e trasferiti nel sito di trapianto in tempi brevi (entro un paio d'ore) per ridurre al minimo i danni e lo stress a carico degli animali durante il trasporto, dove sono rimasti per un periodo di 30 giorni (t_1).

Partendo dall'area portuale di Cala, è stato preso in considerazione un totale di 320 esemplari della specie oggetto d'indagine, da dividere successivamente in due lotti: il primo lotto campionato, costituito da 80 esemplari, è stato utilizzato come *controllo* t_0 ; il secondo lotto costituito da 240 esemplari, a sua volta, è stato suddiviso equamente in tre parti:

- il lotto *transplants* che è stato trasferito e trapiantato nel sito di Licata;
- il lotto *transplant in situ* che è stato trasferito e trapiantato in un sito vicino a quello d'origine, all'interno della stessa area portuale di Cala;
- l'ultimo lotto non è stato mosso dal sito di originario ed è stato considerato come *controllo assoluto o controllo t_1* , utilizzato per monitorare i possibili effetti del trasferimento.

Gli esemplari campionati sono stati rimossi dal loro substrato, delicatamente, facendo attenzione a non danneggiare il corpo dell'animale (figure 20, 22).



Figg. 20, 21 – Campionamento degli organismi.

Tra gli esemplari *controllo t_0* campionati, quelli destinati alle indagini enzimatiche sono stati conservati immediatamente in azoto liquido, invece gli altri sono stati messi in ghiaccio, durante il trasporto, e poi conservati a -20° per le successive indagini di laboratorio. Gli 80 esemplari *transplants* sono stati trasferiti nel sito di trapianto all'interno di bidoni areati e poi distribuiti all'interno di 2 gabbiette di plastica di cm 60×40 aventi una maglia di 5 mm.

Le gabbiette sono state immerse entro un paio d'ore dalla raccolta nel nuovo sito, alla stessa profondità e disponibilità di luce alla quale gli animali si trovavano nel sito originario (figure 22, 23).

Gli esemplari *transplants in situ* prima di essere immersi, hanno sostato all'interno dei bidoni areati un tempo uguale (un paio d'ore) a quello impiegato per trasferire i gruppi *transplants* nel sito di trapianto (figura 24).



Figg. 22, 23 – Campionamento degli organismi.



Fig. 24 – Esempari *transplants in situ* all'interno di bidoni areati.

Tutti gli esemplari utilizzati per condurre il singolo di *transplanting* (Cala-Licata – ecc) sono stati selezionati tra quelli integri e con simili dimensioni (è stata misurata la lunghezza dei tubi di tutti gli esemplari selezionati) (figura 25).



Fig. 25 – Stima della lunghezza media degli organismi.

Le variabili chimico-fisiche delle acque sono state monitorate ad ogni campionamento e gli organismi trapiantati sono stati monitorati settimanalmente.

Al tempo t_1 (dopo un mese) tutti gli esemplari sopravvissuti dei gruppi *controllo in situ*, *controllo assoluto* e *transplants* sono stati raccolti da tutti i siti di trapianto (figure 26, 27). Alcuni campioni sono stati conservati immediatamente in azoto liquido, invece altri sono stati conservati in ghiaccio durante il trasporto e poi conservati a -20° per le successive indagini di laboratorio. Lo stesso esperimento di *transplanting* è stato condotto tra Licata e Cala, Acquisanta e Licata, e Acquisanta e Cala.



Figg. 26, 27 - Prelievo degli organismi.

I tubi e i corpi degli organismi appartenenti ai diversi trattamenti (la tabella 8 riporta le sigle utilizzate in questo lavoro) sono stati sottoposti alle seguenti analisi di laboratorio:

- IPA e metalli totali;
- isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$;
- analisi di attività enzimatica: glutatione S-transferasi (GST) e acetilcolinesterasi (AChE). t_1

Tabella 8 – Organismi (tubi e corpi) appartenenti ai diversi trattamenti coinvolti negli esperimenti di *transplanting*.

	CALA	LICATA	ACQUASANTA
controllo t_0	C t_0	L t_0	A t_0
controllo t_1	C t_1	L t_1	A t_1
<i>transplant in situ</i>	TC	TL	TA
<i>transplant</i>	TC-L	TL-C	TA-C / TA-L

3.4.2 – Idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nei tubi e nei corpi

La determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici è stata condotta mediante 4 passaggi: manipolazione del campione, estrazione con *soxhlet*, riduzione dell'estratto e successiva analisi strumentali con GC/MS.

3.4.2 a – Manipolazione dei campioni

I corpi molli degli esemplari di *S. spallanzanii* sono stati separati dai loro tubi epibionti e tagliati in piccoli pezzi con l'ausilio di un coltello di porcellana. Sono stati creati dei *pool* di campioni per raggiungere il quantitativo necessario alle analisi e per annullare le differenze individuali. Da ciascun *pool*, un'aliquota di 5 g è stata liofilizzata e utilizzata per l'analisi, mentre un'altra è stata seccata in muffola per il calcolo dell'umidità. Sono stati pesati 5-10 g di campione: prima della pesatura, il campione è stato lasciato raffreddare e ridotto in polvere mediante mortaio e pestello di agata. Ai campioni essiccati sono stati aggiunti 10 g di solfato di sodio anidro per eliminare possibili tracce di acqua.

I tubi degli anellidi sono stati tagliati anch'essi in piccoli pezzi con l'ausilio di un coltello di porcellana. Anche in questo caso sono stati creati dei *pool*. Da ciascun *pool*, un'aliquota è stata sciacquata con acqua distillata, seccata in stufa a 30°C e utilizzata per l'analisi, mentre un'altra è stata seccata in muffola per il calcolo dell'umidità.

Sono stati pesati 5-10 g di campione: prima della pesatura il campione è stato lasciato raffreddare e ridotto in polvere mediante mortaio e pestello di agata. Ai campioni essiccati sono stati aggiunti 10 g di solfato di sodio anidro per eliminare possibili tracce di acqua.

3.4.2 b - Estrazione *soxhlet*

I campioni dei corpi e dei tubi di *S. spallanzanii*, già pesati, sono stati messi in ditali di cellulosa e poi montati in un *soxhlet* BUCHI (B811). L'estrazione è stata condotta utilizzando 50 ml di una miscela di diclorometano/pentano 1:1 (v/v) e procedendo con modalità *soxhlet warm* secondo il programma utilizzato per i sedimenti. Gli eluati sono stati raccolti all'interno dei provettoni BUCHI e concentrati mediante evaporatore BUCHI seguendo lo stesso programma utilizzato per le acque. Gli estratti dei corpi ridotti ad 1 ml hanno subito un processo di purificazione descritto nel successivo paragrafo.

Gli estratti dei tubi sono stati trasferiti in *vials* e portati a secco sotto flusso di azoto a temperatura ambiente. Il residuo secco è stato disciolto in 250 µl di soluzione di cicloesano contenente i seguenti standard deuterati: acenaftene d₁₀, fenantrene d₁₀, crisene d₁₂ e perilene d₁₂ (500 µg/L).

3.4.2 c - Purificazione degli estratti dei corpi

L'estratto dei corpi è stato purificato mediante passaggio in microcolonnine di allumina (1.4 g di Al_2O_3 , 7 cm). Gli idrocarburi sono stati eluiti con 8 ml di diclorometano/pentano (35:65). Successivamente si è passati alla separazione della frazione alifatica da quella aromatica utilizzando le colonnine silica-gel. La soluzione è stata portata a secco, diluita con 1 ml di pentano e poi trasferita in silica microcolonnine (0.8 g di SiO_2).

La frazione aromatica è stata eluita con 5 ml di una miscela di diclorometano/C5, mentre la frazione alifatica con 2 ml di pentano. L'estratto è stato essiccato con flusso di azoto e poi dissolto in 250 μl di soluzione in cicloesano contenente gli standard interni deuterati: acenaphthene d_{10} ; phenanthrene d_{10} , chrysene d_{12} e perilene d_{12} (500 $\mu\text{g/L}$). I dati sono stati espressi in $\mu\text{g/Kg}$ di peso secco.

3.4.3 d - Analisi GC/MS

L'analisi qualitativa e quantitativa è stata effettuata mediante un gas cromatografo accoppiato ad uno spettrometro di massa (GC/MS-QP 2010 Plus Shimadzu) attrezzato con un sistema di acquisizione dati (Shimadzu, CLASSE 2010). È stata utilizzata la modalità splitless (0,50 min), una temperatura d'iniezione di 250°C e un flusso totale di 20,6 ml/min. Il programma di temperatura è: da 40 °C (2 min) a 240 °C a 22°C/min, a 330 °C a 10°C/min (5 min). Il gas carrier è l'elio (flusso 1,7 ml/min) e la temperatura dell'interfaccia di 330 °C. L'analisi è stata eseguita secondo la modalità Selected Ion Monitoring (SIM). Gli analiti oggetto di studio sono stati gli stessi analizzati per i sedimenti.

3.4.3 - Metalli pesanti nei tubi e nei corpi

La determinazione dei metalli nei campioni dei corpi e tubi di *S. spallanzanii* è stata condotta seguendo il protocollo del metodo US EPA 6010B/96. I metalli investigati sono stati: cadmio (Cd), cromo totale (Cr), rame (Cu), nichel (Ni), piombo (Pb), zinco (Zn), mercurio (Hg) ed arsenico (As). Il contenuto dei metalli è poi determinato per spettrometria di emissione atomica mediante plasma induttivamente accoppiato (*Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer*, ICP-OES; Varian Vista MPX). Tutte le analisi saranno condotte in triplice replica.

3.4.3 a - Mineralizzazione

I campioni di *S. spallanzanii* (corpo e tubo) sono stati mineralizzati utilizzando 5 ml di HNO_3 Suprapur al 67-70%, 1 ml di H_2O_2 Suprapur al 30% e 4 ml di acqua bidistillata

MilliQ, tramite un forno a microonde dotato di carosello rotante (CEM, Modello MARS®), e sottoposti ad attacco in “bomba” come descritto dalla tabella 9.

Tabella 9: Step mineralizzazione

Step	Potenza	%	Rampa	Ps	°C	Durata
1	1200W	100	05:00	800	170	02:00
2	1200W	100	03:00	800	180	09:30

Dopo il raffreddamento, ciascun campione è trasferito in un matraccio e portato ad un volume finale di 30 ml per gli altri campioni. Per ogni ciclo di mineralizzazione è preparato un bianco costituito dalla miscela di mineralizzazione senza il campione. Il controllo analitico è effettuato mediante la mineralizzazione di materiale certificato specifico per la matrice analizzata e, precisamente: ERM – CE278 , mussel tissue (IRMM, *Institute for Reference Materials and Measurements*).

3.4.3 b - Analisi atomica

La determinazione quantitativa dei metalli dei campioni mineralizzati e del materiale certificato è stata effettuata attraverso l’impiego di uno spettrometro ICP-OES, Varian Vista MPX (*Inductively Couplet Plasma-Optical Emission Spectrometer*), dotato di un autocampionatore e di un generatore di vapori VGA-77, così come è stato già descritto per le analisi dei sedimenti. I dati sono stati espressi in mg/kg p.s.

3.4.4 - Isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$

Le analisi isotopiche sono state condotte sul tubo e sul corpo dell’anellide *S. spallanzanii*. I campioni sono stati essiccati a 60°C, polverizzati con l’ausilio di mortaio e pestello, e pesati in una bilancia microelettronica all’interno di capsule di stagno. L’analisi è stata condotta mediante spettrometro di massa (Thermo-Electron Delta Plus XP) accoppiato ad un analizzatore elementare (ThermoElectron EA 1112).

La composizione isotopica è stata espressa come $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.

$$\delta^{13}\text{C} \text{ o } \delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = \left[\left(\frac{R_{\text{campione}}}{R_{\text{standard}}} \right) - 1 \right] * 10^3$$

così come è stato già stato descritto per le analisi delle acque e dei sedimenti.

3.4.5 - Saggi di attività enzimatiche e determinazione quantitativa di proteine

3.4.5 a - Acetilcolinesterasi (AChE)

I tessuti degli esemplari di *S. spallanzanii* sono stati omogeneizzati con ultraturrax, in un rapporto di 0.06:1 (peso/volume) con il tampone di omogeneizzazione (0.1M Tris-HCl, pH 8), e poi centrifugati a 2100 rpm per 15 minuti. La frazione supernatante è stata prelevata e conservata in ghiaccio per essere utilizzata durante i saggi biochimici, invece il risultante precipitato, contenente i residui cellulari, è stato scartato.

Le attività colinesterasiche sono state misurate con il metodo di Ellman *et al.*, (1961). Tutte le procedure sono state condotte a 4°C. L'Acetiltiocolina iodica (ASCh) è stata utilizzata come substrato per determinare le attività enzimatica (AChE), che idrolizza il suddetto substrato. La formazione del complesso coniugato, che combinato con l'acido 5.5-ditiobis-nitrobenzenico (DTNB) forma l'anione giallo acido 5-ditio-2-nitrobenzenico, è stato misurato spettrofotometricamente a 410 nm. Per ciascuna *cuvette* sono stati dispensati in ordine: 50 µl di campione, 2830 µl di tampone Sodio-fosfato (pH 7.5), 100µl di DTNB (0.33mM). Successivamente è stato aggiunto il substrato (ASCh) per favorire l'inizio della reazione enzimatica.

Tutte le analisi sono state condotte utilizzando uno spettrofotometro VARIAN Cary 50 Scan. Le attività colinesterasiche vengono espresse come Δ assorbanza min^{-1} convertite in nmoli di substrato idrolizzato min^{-1} e normalizzate per il contenuto di proteine del tessuto. La concentrazione delle proteine è stata determinata seguendo il metodo di Bradford (1976) (lunghezza d'onda $\text{abs} = 595 \text{ nm}$) e i valori sono stati espressi come mg di proteine x ml di omogenato.

3.4.5 b - Glutatione S-transferasi (GST)

Gli omogenati di tessuto totale dell'anellide sono stati preparati con ultraturrax, per 3 min a 0°C, in tampone Tris-HCl 50 mM pH= 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 0.15 M, Glicerolo 10%, aprotinina 1 mg prot/ml e centrifugati per 30 minuti a 5000 xg. Questo metodo di omogeneizzazione é risultato ottimale secondo Argese *et al.*, (2004).

La misura dell'attività delle glutazione S-transferasi è stata misurata secondo il metodo spettrofotometrico di Habig (1974) utilizzando glutatione ridotto (GSH) 1 Mm, 1-Cloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB) e 1 mM in tampone fosfato 0.1M pH = 6.5. La formazione del

complesso coniugato a 25°C è stata misurata utilizzando uno spettrofotometro VARIAN Cary 50 Scan, a 340 nm. Un'unità di attività è definita come la quantità di enzima in grado di catalizzare la formazione 1 μ mole di prodotto al min nelle condizioni del saggio specifico. L'attività della GST è stata normalizzata per il contenuto di proteine del tessuto. La concentrazione delle proteine è stata determinata seguendo il metodo di Bradford (1976) (lunghezza d'onda abs = 595 nm) impiegando l'albumina di siero bovino come standard. L'attività specifica viene definita come unità di attività per mg di proteine.

3.5 - ANALISI STATISTICA

I dati relativi alle variabili indagate sulle acque e sui sedimenti sono state analizzate sotto il profilo statistico attraverso un approccio multivariato nMDS (*non-Metric Multidimensional Scaling*). Sono state effettuate analisi multivariate sui sedimenti, per i valori di concentrazione di idrocarburi policiclici aromatici e metalli pesanti. L'nMDS è stato eseguito anche separatamente per le acque e per i sedimenti, considerando tutte le variabili indagate, esclusi i valori isotopici, per entrambe le matrici.

I dati relativi alle variabili indagate sui tubi e sui corpi di *S. spallanzanii* sono state analizzate, sia attraverso un approccio univariato ANOVA (analisi della varianza), che attraverso un approccio multivariato nMDS e ANOSIM (analisi delle similarità). Sono state effettuate analisi multivariate nMDS sui tubi e sui corpi, per i valori di concentrazione di idrocarburi policiclici aromatici e metalli pesanti.

Inoltre, l'nMDS e l'ANOSIM sono state eseguite, separatamente, per i tubi e i corpi del polichete, considerando tutte le variabili indagate, esclusi i valori isotopici.

Per quanto riguarda le analisi nMDS, le differenze tra le aree oggetto di studio e tra i diversi gruppi di organismi (tubi e corpi) coinvolti negli esperimenti di *transplanting*, sono state rappresentate attraverso grafici bidimensionali in cui vengono rappresentati con dei punti i diversi siti di campionamento all'interno delle tre aree oggetto di studio, o i diversi gruppi di organismi. In questo modo è stato possibile approfondire le dinamiche sia spaziali che temporali delle caratteristiche chimico-fisiche delle acque, dei sedimenti e degli organismi.

Il valore dello "Stress" indica se l'ordinamento ottenuto risulta essere una buona interpretazione dei dati (stress $\leq 0,1$ corrisponde ad un utile ordinamento a 2 dimensioni,

mentre valori di stress $\geq 0,2$ corrispondono ad un ordinamento che può portare ad un interpretazione dei dati non corretta).

L'analisi della varianza (ANOVA) è stata eseguita solo sulle variabili enzimatiche (AChE, GST), per testare l'ipotesi che le variabili analizzate possano variare a causa del tempo, dello stress dalla manipolazione e dal trapianto nel sito più contaminato.

Le analisi univariate sono state realizzate mediante il software G-MAV 5 (University of Sidney, Australia), invece le analisi multivariate sono state realizzate mediante il software *Primer 6*.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 – CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DELLE ACQUE

4.1.1 - Variabili chimico-fisiche

I valori e le relative deviazioni standard delle variabili chimico-fisiche delle acque, misurate nelle tre aree oggetto di studio mediante sonda multiparametrica (YSI 556MPS), ai tempi t_0 e t_1 , corrispondenti rispettivamente ai mesi di Aprile e Maggio, sono riportati nella tabella 10:

Tabella 10 – Media e deviazioni standard delle variabili chimico-fisiche misurate nelle acque di Cala, Licata ed Acquasanta, ai tempi t_0 e t_1 .

STAZIONE	Lat. - Long.	Prof.(m)	Temp. [°C]	Cond. [mS/cm]	Sal. [ppt]	LDO [mg/L]	pH [Units]	ORP [mV]	Baro (psi)
CALA t_0	N38 07.173 E13 22.121	superf.	16,3	56,3	37,4	7,6	8,04	235	14,8
ds			0,04	0,02	0,04	0,01	0,001	0,02	0,01
CALA t_1	N38 07.173 E13 22.121	superf.	19	57	38	6,6	7,9	199,1	14,8
ds			0,04	0,01	0,01	0,02	0,001	0,01	0,01
LICATA t_0	N37 05.334 E13 56.692	superf.	17,1	57,2	38,1	8,04	8,09	248,4	14,7
ds			0,03	0,03	0,03	0,01	0,001	0,03	0,01
LICATA t_1	N37 05.334 E13 56.692	superf.	19,4	58,2	39	8,70	8,10	165,4	14,8
ds			0,01	0,03	0,02	0,03	0,001	0,04	0,01
AC. SANTA t_0	N38 08.600 E13 22.225	superf.	16	55,6	37	9,1	8,08	260,3	14,7
ds			0,01	0,04	0,04	0,02	0,001	0,05	0,01
AC. SANTA t_1	N38 08.600 E13 22.225	superf.	19,7	56,7	37,8	7,5	8,04	209	14,7
ds			0,04	0,05	0,02	0,02	0,001	0,05	0,01

Come si può osservare in tabella 10, non ci sono rilevanti variazioni delle proprietà chimico-fisiche delle acque dei tre siti. Alcune variazioni dei suddetti parametri vengono riscontrate tra il tempo t_0 e t_1 in ciascun sito considerato.

I valori della temperatura sono paragonabili in tutti e tre i siti, con variazioni in aumento di 2-4°C tra il tempo t_0 e il tempo t_1 . Essi sono compresi tra $16 \pm 0,04^\circ\text{C}$ al tempo t_0 e $19 \pm 0,04^\circ\text{C}$ al tempo t_1 a Cala; tra $17 \pm 0,03^\circ\text{C}$ al tempo t_0 e $19 \pm 0,01^\circ\text{C}$ al tempo t_1 a Licata e, infine, tra $16 \pm 0,01^\circ\text{C}$ al tempo t_0 e $20 \pm 0,04^\circ\text{C}$ al tempo t_1 ad Acquasanta.

Anche i valori della conducibilità sono paragonabili in tutti e tre i siti, con variazioni in aumento di circa 1 mS/cm tra il tempo t_0 e il tempo t_1 . Essi sono compresi tra $56 \pm 0,02$ mS/cm al tempo t_0 e $57 \pm 0,01$ mS/cm al tempo t_1 a Cala; tra $57 \pm 0,03$ mS/cm al tempo t_0 e $58 \pm 0,03$ mS/cm al tempo t_1 a Licata e, infine, tra $56 \pm 0,04$ mS/cm al tempo t_0 e $57 \pm 0,05$ mS/cm al tempo t_1 ad Acquasanta.

La salinità presenta dei valori maggiori a Licata, con variazioni di circa 1 ppt tra il tempo t_0 e il tempo t_1 in ciascuno dei tre siti. Essi sono compresi tra $37 \pm 0,04$ ppt al tempo t_0 e $38 \pm 0,01$ ppt al tempo t_1 a Cala; tra $38 \pm 0,03$ ppt al tempo t_0 e $39 \pm 0,02$ ppt al tempo t_1 a Licata e, infine, tra $37 \pm 0,04$ ppt al tempo t_0 e $38 \pm 0,02$ ppt al tempo t_1 ad Acquasanta.

L'ossigeno disciolto (LOD) presenta dei valori maggiori a Licata al tempo t_1 e ad Acquasanta al tempo t_0 . Questi valori sono compresi tra $8 \pm 0,01$ mg/L al tempo t_0 e $7 \pm 0,02$ mg/L al tempo t_1 a Cala; tra $8 \pm 0,01$ mg/L al tempo t_0 e $9 \pm 0,03$ mg/L al tempo t_1 a Licata e, infine, tra $9 \pm 0,02$ mg/L al tempo t_0 e $8 \pm 0,02$ mg/L al tempo t_1 ad Acquasanta.

I valori del pH sono paragonabili in tutti e tre i siti, senza alcuna variazione tra il tempo t_0 e t_1 . $8 \pm 0,01$ è il valore riscontrato al tempo t_0 e t_1 in tutti e tre i siti.

Per quanto riguarda il potenziale redox, questo presenta dei valori maggiori ad Acquasanta rispetto agli altri due siti, compresi tra $260 \pm 0,05$ mV al tempo t_0 e $209 \pm 0,05$ mV al tempo t_1 . A Cala i valori sono compresi tra $235 \pm 0,02$ mV al tempo t_0 e $199 \pm 0,01$ mV al tempo t_1 e a Licata sono compresi tra $248 \pm 0,03$ mV al tempo t_0 e $165 \pm 0,04$ mV al tempo t_1 .

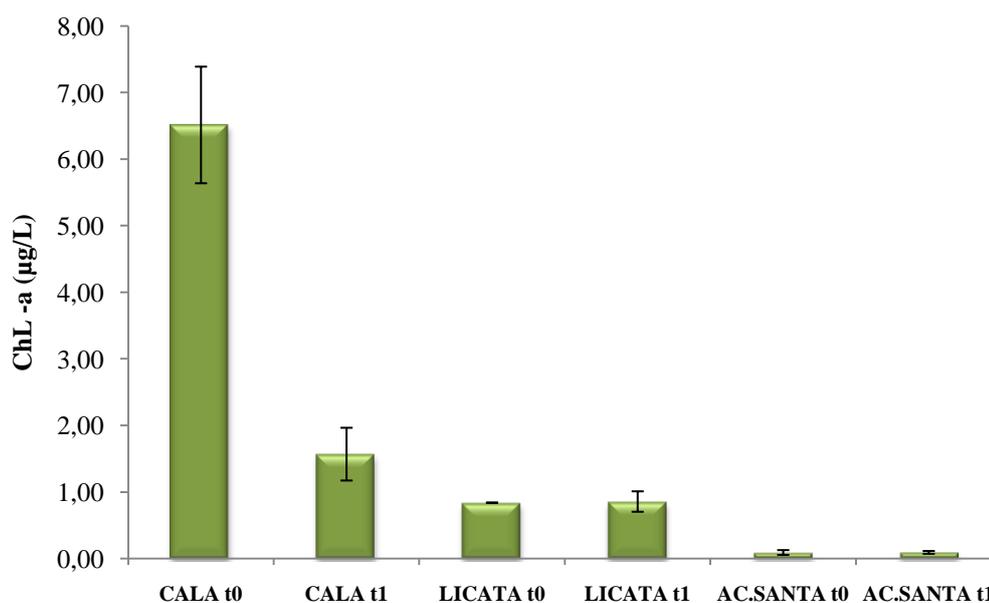
Infine, i valori della pressione sono uguali in tutti e tre i siti e sono $15 \pm 0,01$ psi sia al tempo t_0 che al tempo t_1 in tutti e tre i siti.

4.1.2 – Clorofilla-*a*, forme organiche e inorganiche del fosforo e dell'azoto.

I risultati delle concentrazioni dei pigmenti clorofilliani e dei nutrienti e le rispettive deviazioni standard sono sintetizzate in tabella 11. Come si può osservare in figura 28, le acque di Cala hanno presentato i valori più arricchiti in clorofilla-*a*, in particolare al tempo t_1 . Questi valori sono risultati pari a $6 \pm 0,9$ $\mu\text{g/L}$ al tempo t_0 e $2 \pm 0,4$ $\mu\text{g/L}$ al tempo t_1 . Le acque di Licata hanno presentato valori più arricchiti rispetto ad Acquasanta. I valori a Licata sono compresi $0,8 \pm 0,001$ $\mu\text{g/L}$ al tempo t_0 e $0,9 \pm 0,1$ $\mu\text{g/L}$ al tempo t_1 , mentre ad Acquasanta sono risultati simili al tempo t_0 e t_1 (circa $0,1$ $\mu\text{g/L}$).

Tabella 11 - Media delle concentrazioni di clorofilla-*a* e nutrienti nelle acque delle aree oggetto di studio, ai tempi t_0 e t_1 .

	Clorofilla a ($\mu\text{g/L}$)	Nitriti ($\mu\text{g/L}$)	Ortofosfati ($\mu\text{g/L}$)	Nitrati ($\mu\text{g/L}$)	Fosforo (mg/L)	Azoto (%)
CALA t_0	6,5	1,4	1,6	39,3	5,1	540
ds	0,9	0,4	0,2	16	1	87
CALA t_1	1,6	3	23,3	134,2	4,2	404
ds	0,4	0,4	4	6	0,2	54
LICATA t_0	0,8	0,2	4,4	580	6,8	270,6
ds	0,001	0,02	0,7	16	0,9	62
LICATA t_1	0,9	0,2	1,4	309,4	2,2	323
ds	0,1	0,02	0,07	8	0,001	26
AC.SANTA t_0	0,1	2,4	25,1	177	1,6	403,4
ds	0,04	0,02	2	0,9	0,1	22
AC.SANTA t_1	0,1	1,3	8	1.117	2,8	687,5
ds	0,02	0,2	0,2	16	0,4	165

**Fig. 28** - Concentrazioni di Chl-a ($\mu\text{g/L} \pm ds$) nelle acque di Cala, Licata e Acquisanta.

Per quanto riguarda le concentrazioni dei nutrienti, queste variano notevolmente nelle tre aree di studio, rispettivamente ai tempi t_0 e t_1 . Le acque di Cala presentano i valori più arricchiti in nitriti (NO_2), in particolare al tempo t_1 (figura 29). Questi valori sono compresi tra $1 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$ al tempo t_0 e tra $3 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$ al tempo t_1 . Le acque di Acquisanta hanno presentato valori più arricchiti rispetto a Licata, in particolare al tempo t_0 . I valori a

Acquasanta sono compresi tra $3\pm 0,001$ $\mu\text{g/L}$ al tempo t_0 e $1\pm 0,001$ $\mu\text{g/L}$ al tempo t_1 , invece a Licata sono tra risultati pari a $0,2\pm 0,001$ $\mu\text{g/L}$ sia al tempo t_0 che al tempo t_1 .

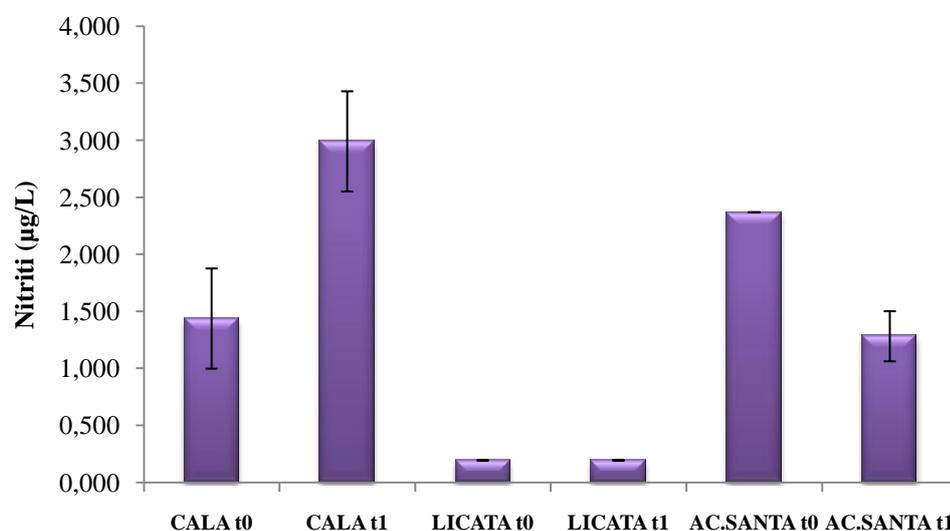


Fig. 29 - Concentrazioni di nitriti (NO_2 , $\mu\text{g/L} \pm \text{ds}$) nelle acque di Cala, Licata ed Acquasanta.

Come si può osservare in figura 30, le acque di Cala e Acquasanta presentano i valori di ortofosfati (PO_4) simili, però con notevoli variazioni tra il tempo t_0 e il tempo t_1 . Questi valori sono compresi tra $2\pm 0,001$ $\mu\text{g/L}$ al tempo t_0 e 23 ± 4 $\mu\text{g/L}$ al tempo t_1 a Cala, e tra 25 ± 2 $\mu\text{g/L}$ al tempo t_0 e $8\pm 0,2$ $\mu\text{g/L}$ al tempo t_1 ad Acquasanta. Invece, le acque di Licata presentano valori meno arricchiti, compresi tra $4\pm 0,7$ $\mu\text{g/L}$ al tempo t_0 e $1\pm 0,07$ $\mu\text{g/L}$ al tempo t_1 .

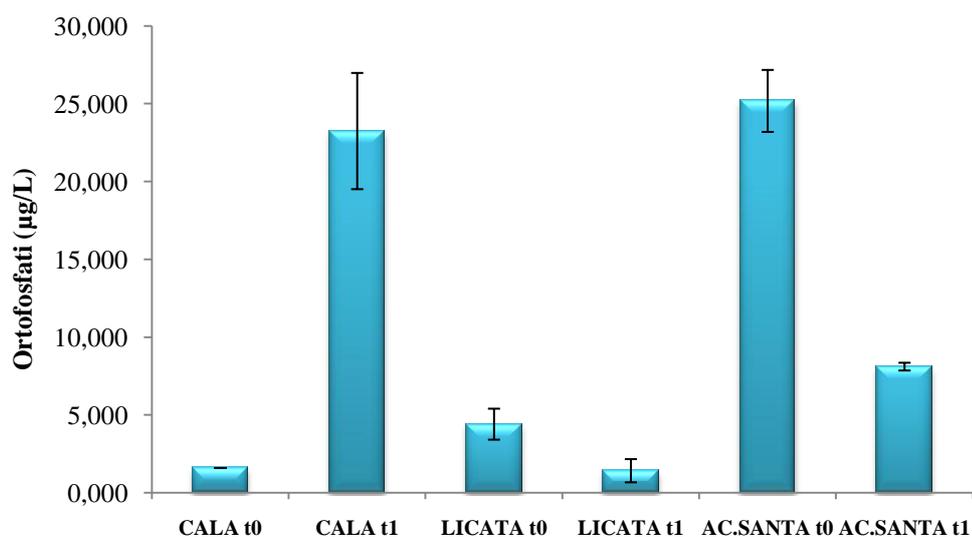


Fig. 30 - Concentrazioni di ortofosfati (PO_4 , $\mu\text{g/L} \pm \text{ds}$) nelle acque di Cala, Licata ed Acquasanta.

I nitrati (NO_3) sono presenti in maggiore concentrazione a Licata rispetto agli altri due siti, tranne ad Acquasanta al tempo t_1 (figura 31). Inoltre, le concentrazioni dei nitrati sono state riscontrate diverse ai tempi t_0 e t_1 in tutti e tre i siti. Nel sito Licata questi valori sono compresi tra $580 \pm 16 \mu\text{g/L}$ al tempo t_0 e $309 \pm 8 \mu\text{g/L}$ al tempo t_1 . Nel sito Acquasanta i valori sono compresi tra $117 \pm 0,9 \mu\text{g/L}$ al tempo t_0 e $1177 \pm 16 \mu\text{g/L}$ al tempo t_1 . Invece, le acque di Cala presentano i valori meno arricchiti, pari a $39 \pm 16 \mu\text{g/L}$ al tempo t_0 e a $134 \pm 6 \mu\text{g/L}$ al tempo t_1 .

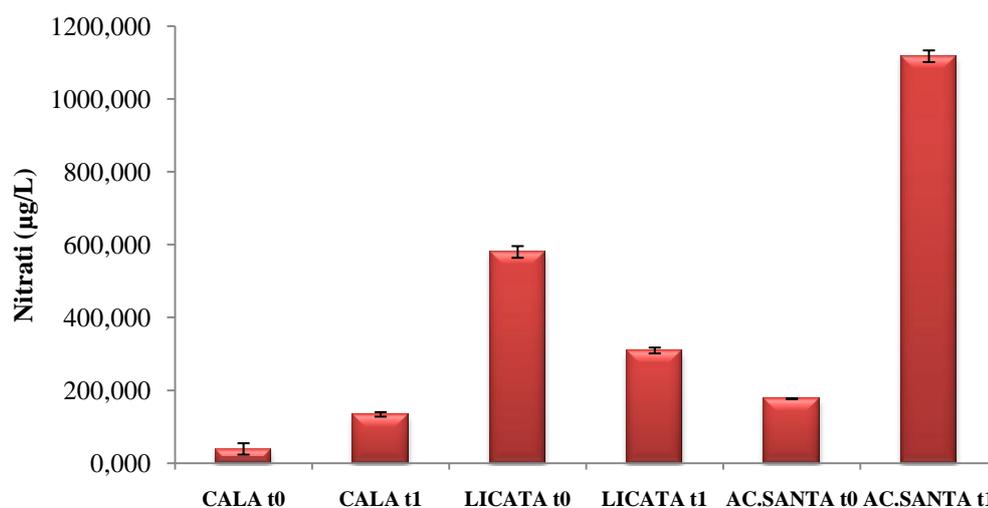


Fig. 31 - Concentrazioni di nitrati ($\text{NO}_3 \mu\text{g/L} \pm \text{ds}$) nelle acque di Cala, Licata ed Acquasanta.

Come è possibile osservare in figura 32, il fosforo totale è presente in maggiore concentrazione a Cala rispetto agli altri due siti, tranne a Licata al tempo t_0 , con concentrazioni diverse ai tempi t_0 e t_1 in tutti e tre i siti. Nel sito Cala il fosforo è risultato pari a $5 \pm 1 \text{ mg/L}$ al tempo t_0 e a $4 \pm 0,2 \text{ mg/L}$ al tempo t_1 . A Licata i valori sono risultati compresi tra $7 \pm 0,9 \text{ mg/L}$ al tempo t_0 e $2 \pm 0,001 \text{ mg/L}$ al tempo t_1 . Invece, le acque di Acquasanta hanno presentato i valori meno arricchiti, pari a $2 \pm 0,1 \text{ mg/L}$ al tempo t_0 e a $3 \pm 0,4 \text{ mg/L}$ al tempo t_1 .

L'azoto è presente in maggiore concentrazione a Cala e ad Acquasanta rispetto a Licata, tranne ad Acquasanta al tempo t_1 (figura 33). Inoltre, la concentrazione totale di questo elemento è risultata diversa nei due tempi (t_0 e t_1) in tutti e tre i siti. Nel sito Cala l'azoto è risultato compreso tra $540 \pm 87 \mu\text{g/L}$ al tempo t_0 e $404 \pm 54 \mu\text{g/L}$ al tempo t_1 . Nel sito Acquasanta i valori sono compresi tra $403 \pm 22 \mu\text{g/L}$ al tempo t_0 e $687 \pm 165 \mu\text{g/L}$ al tempo t_1 .

Invece, le acque di Licata hanno presentato valori meno arricchiti rispetto agli due siti (271 ± 70 $\mu\text{g/L}$ al tempo t_0 e 323 ± 26 $\mu\text{g/L}$ al tempo t_1).

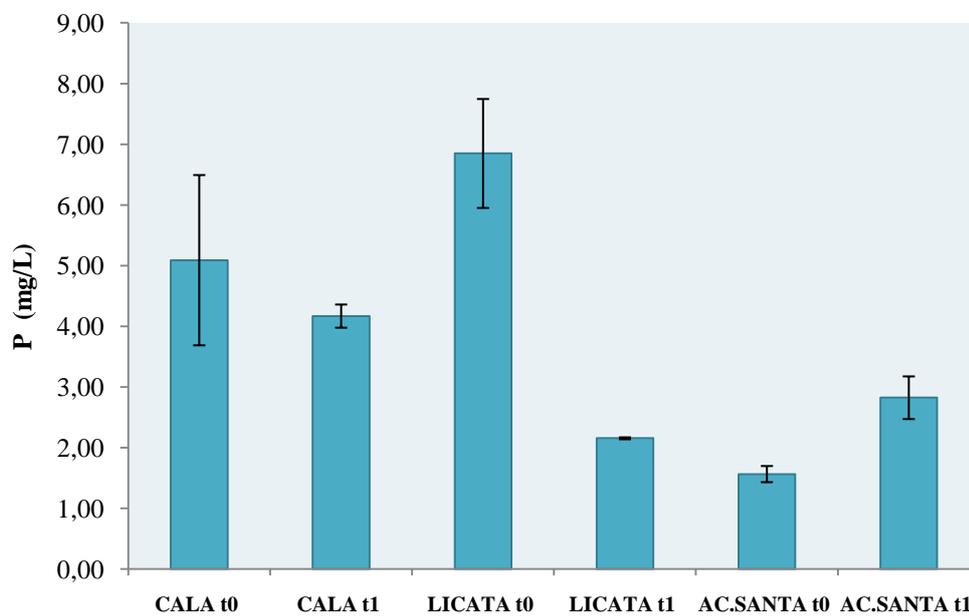


Fig. 32 - Concentrazioni di fosforo totale ($\text{mg/L} \pm ds$) nelle acque di Cala, Licata ed Acquisanta.

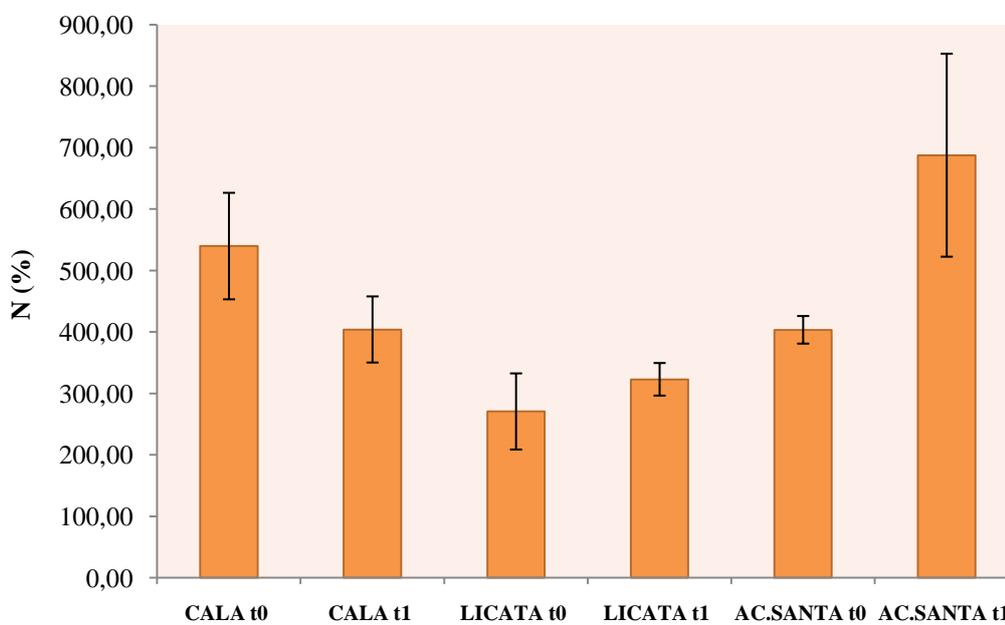


Fig. 33 - Concentrazioni di azoto (%) nelle acque di Cala, Licata ed Acquisanta.

4.1.3 – Isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$

I valori medi di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ e le relative deviazioni standard nelle acque delle rispettive aree di studio sono riportate in tabella 12. Le acque di Licata hanno presentato i valori più arricchiti, in particolare al tempo t_1 . Questi valori sono compresi tra $5,5\pm 0,1\%$ al tempo t_0 e $5,8\pm 0,6\%$ al tempo t_1 per il $\delta^{15}\text{N}$, e tra $-22,3\pm 0,2\%$ al tempo t_0 e $-20,7\pm 0,4\%$ al tempo t_1 per il $\delta^{13}\text{C}$ (figura 34).

Tabella 12 – Media dei rapporti isotopici di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ nelle acque di Cala, Licata ed Acquasanta.

	CALA t_0	CALA t_1	LICATA t_0	LICATA t_1	ACQUASANTA t_0	ACQUASANTA t_1
$\delta^{15}\text{N}$	4,7	1,5	5,5	5,8	6,2	3,4
ds	0,5	0,09	0,1	0,6	0,2	0,5
$\delta^{13}\text{C}$	-21,02	-21,8	-22,3	-20,7	-23,2	-22,3
ds	0,4	0,5	0,2	0,4	0,2	0,3

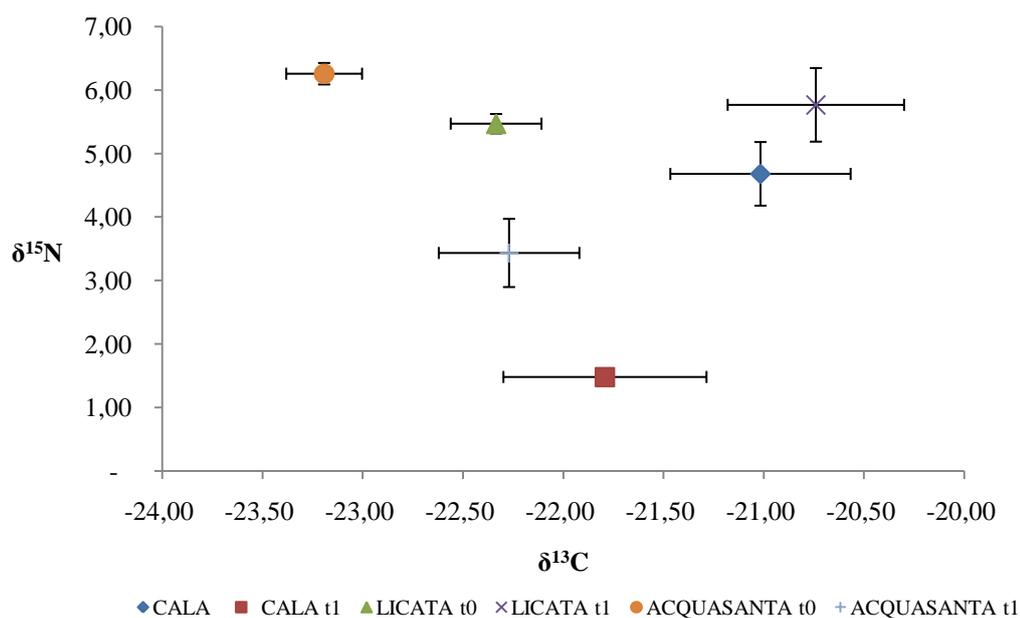


Fig. 34 - Valori dei rapporti isotopici $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ e le relative deviazioni standard nelle acque delle aree oggetto di studio.

Il metodo d'indagine che utilizza gli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto come traccianti del flusso di materia organica nell'ambito delle reti trofiche, risulta oltremodo utile nella determinazione di differenze spaziali e temporali tra le aree di campionamento. Le

caratteristiche ambientali possono variare anche in un *range* relativamente ristretto, e questo si traduce in variazioni nella composizione isotopica della componente autotrofa. Come è possibile notare in figura 34, i valori dei rapporti isotopici del carbonio e dell'azoto nelle acque delle rispettive aree oggetto di studio suggeriscono la presenza di variazioni spaziali, e all'interno della stessa area è possibile notare anche delle variazioni temporali.

4.1.4 - Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

I valori delle concentrazioni di IPA nelle acque dei siti studiati sono riportati nella tabella 13.

Tabella 13 - Concentrazioni dei singoli IPA ($\mu\text{g/L}$) (media di tre analisi) nelle acque delle aree oggetto di studio, relative ai tempi t_0 e t_1 .

	Cala t_0	Cala t_1	Licata t_0	Licata t_1	Acquasanta t_0	Acquasanta t_1
naftalene	0,06	0,008	0,09	0,04	0,0142	0,0089
acenaftilene	0,002	0,003	0,0001	0,0000	0,0004	0,0035
acenaftene	0,0005	0,0049	0,0030	0,0001	0,0015	0,0035
fluorene	0,005	0,004	0,007	0,0007	0,0000	0,0008
fenantrene	0,01	0,01	0,02	0,0009	0,0000	0,0121
antracene	0,004	0,01	0,02	0,008	0,0001	0,0037
fluorantene	0,005	0,01	0,01	0,003	0,0005	0,0031
pirene	0,003	0,009	0,009	0,002	0,0010	0,0024
benzo[a]antracene	0,0001	0,001	0,002	0,002	0,0000	0,0027
crisene	0,0001	0,0008	0,003	0,004	0,0000	0,0005
benzo[b]fluorantene	0,0001	0,001	0,0003	0,0002	0,0000	0,0001
benzo[k]fluorantene	0,0001	0,0007	0,0002	0,0001	0,0000	0,0001
benzo[e]pirene	0,0001	0,0009	0,0003	0,0002	0,0000	0,0001
benzo[a]pirene	0,0002	0,0012	0,0004	0,0002	0,0000	0,0001
perilene	0,0001	0,001	0,0001	0,0000	0,0000	0,0001
indeno[1,2,3-cd]pirene	0,0001	0,001	0,0002	0,0000	0,0000	0,0001
dibenzo[a,h]antracene	0,0002	0,002	0,0002	0,0000	0,0000	0,0001
benzo[g,h,i]perilene	0,0001	0,001	0,0002	0,0000	0,0000	0,0001
dibenzo[a,l]pirene	0,0004	0,004	0,0006	0,0001	0,0000	0,0003
dibenzo[a,e]pirene	0,0008	0,008	0,0010	0,0002	0,0000	0,0005
dibenzo[a,i]pirene	0,001	0,01	0,001	0,0003	0,0000	0,0007
dibenzo[a,h]pirene	0,001	0,01	0,002	0,0003	0,0000	0,0007
Σ IPA	0,1	0,11	0,17	0,06	0,018	0,04

Come si può osservare in figura 33, le concentrazioni totali di IPA nelle acque dei tre siti sono comprese tra 0,018 $\mu\text{g/l}$ e 0,18 $\mu\text{g/l}$, determinate rispettivamente al tempo t_0 ad Acquasanta e al tempo t_1 a Licata.

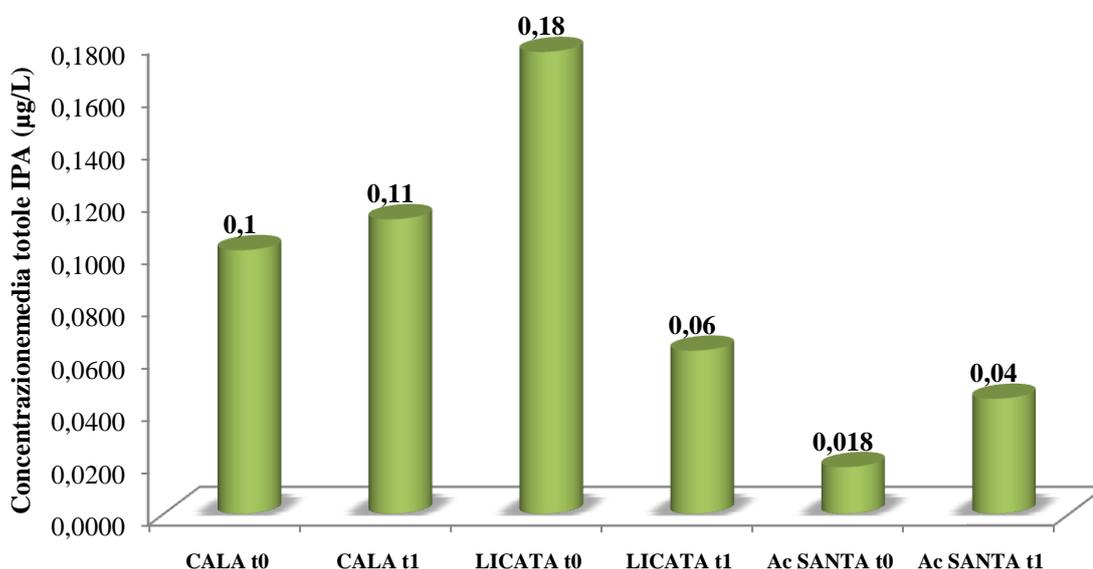


Fig. 35 – Distribuzione degli IPA totali ($\mu\text{g/L}$).

Le concentrazioni totali degli IPA e le relative deviazioni standard nelle acque dei tre siti di campionamento, relative ai tre siti ai rispettivi tempi t_0 e t_1 , sono riportate in tabella 14:

Tabella 14 – Concentrazione di IPA totali e relative deviazioni standard

Cala t_0	$0,1 \pm 0,006$
Cala t_1	$0,11 \pm 0,08$
Licata t_0	$0,18 \pm 0,02$
Licata t_1	$0,06 \pm 0,01$
Acquasanta t_0	$0,02 \pm 0,007$
Acquasanta t_1	$0,04 \pm 0,002$

La variabilità temporale del contenuto totale di IPA nei due campionamenti, probabilmente, è da imputare al ricambio idrologico che favorisce la risospensione dei sedimenti e quindi dei contaminanti in essi presenti, soprattutto se i campioni sono stati prelevati in superficie come in questo caso.

Per quanto riguarda le distribuzioni percentuali dei singoli composti, si può notare dalla figura 36 che nelle acque prevalgono gli IPA a basso peso molecolare (fenantrene, antracene, fluorene, fluorantene e pirene), e ciò è in accordo con le caratteristiche chimico-fisiche degli IPA: la solubilità in acqua diminuisce all'aumentare del peso molecolare.

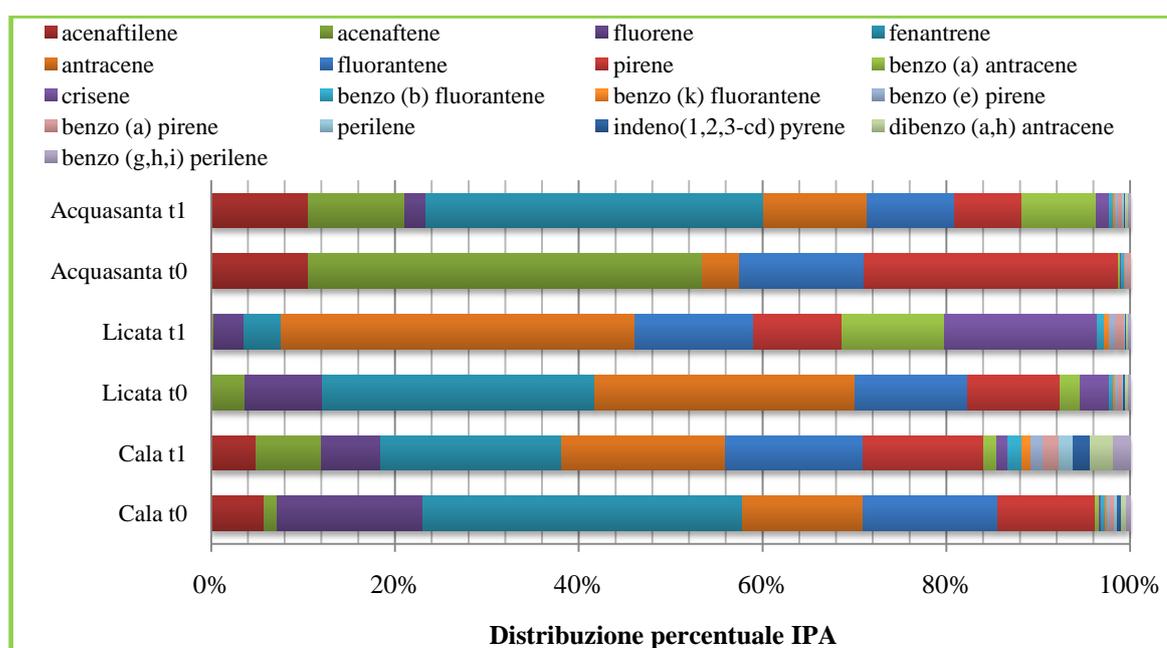


Fig. 36 – Distribuzione percentuale dei singoli IPA.

E' difficile confrontare le concentrazioni di IPA riscontrate nei tre siti siciliani con quelli presenti in letteratura, poiché la maggior parte delle analisi sono state effettuate utilizzando tecniche spettrofotometriche (UV, fluorescenza, IR, ecc.). A titolo di esempio, nella tabella 19 sono riportate le concentrazioni di IPA determinate recentemente da alcuni autori, nelle acque di siti europei, africani e asiatici e le relative tecniche di estrazione utilizzate.

Si può notare che le concentrazioni determinate sono dello stesso ordine di grandezza di molti siti riportati in tabella 15 e, in particolare, sono simili a quelle che si riferiscono alle acque del Mar Mediterraneo e minori di quelle determinate in prossimità di Livorno, noto sito industriale italiano.

Tabella 15 – Concentrazione di IPA in acque europee, africane ed asiatiche.

Località		Intervallo di concentrazione totale (ng/l)	Metodo di estrazione	Riferimento bibliografico
Deep Bay, Cina meridionale		31,7 – 111,8	Filtrazione su filtro in fibra di vetro ed estrazione con XAD-4	Qiu <i>et al.</i> , (2009)
Estuario Daliao, Mar Bohai, Cina		139,16 – 1717,87	Cartucce ISOLUTE SPE C ₁₈	Men <i>et al.</i> , (2009)
Venezia Laguna	strato superficiale	19,6 – 178,9	Filtrazione su filtro in fibra di vetro ed estrazione l-l	Manodori <i>et al.</i> , (2006)
	strato profondo	12,4 – 266,8		
Alessandria D'Egitto	strato superficiale	103 – 523	Estrazione l-l	El Nemr <i>et al.</i> , (2003)
	strato profondo	13 – 120		
Mar Baltico		5,61 ± 3,57 (media del periodo 1992-'98)	Estrazione l-l	Witt <i>et al.</i> , (2001)
Livorno, Mar Tirreno		1800 – 157000	Filtrazione su filtro in fibra di vetro ed estrazione l-l	Ciucinelli <i>et al.</i> , (2001)
Mar Mediterraneo (Spagna, Francia)		Barcellona: 16,7 – 35,7	Filtrazione su filtro in fibra di vetro ed estrazione l-l	Guitart <i>et al.</i> , (2010)
		Banyuls-sur-Mer: 2,4 – 22,3		
Porto di Halifax, Bedford, Canada		sito H: 44,5 ± 23,8 sito M: 16,4 ± 5,7 sito L: 28,4 ± 21,2	Filtrazione su filtro in fibra di vetro ed estrazione con XAD-2	Hellou <i>et al.</i> , (2005)
Golfo di Saronikos, Grecia		sito 1: 425 ± 38 sito 2: 459 ± 48 sito 3: 113 ± 11	Cartucce IST ISOLUTE C ₁₈	Valavanidis <i>et al.</i> , (2008)

4.2 – CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DEI SEDIMENTI

4.2.1 – Clorofilla a, feopigmenti, fosforo e azoto totali

I risultati delle concentrazioni dei pigmenti foto sintetici e di azoto e fosforo totali e le rispettive deviazioni standard sono riportate in tabella 16.

Tabella 16 – Media dei valori di fosforo e azoto totali nei sedimenti delle tre aree di studio

	Clorofilla a ($\mu\text{g/g}$)	Feopigmenti ($\mu\text{g/g}$)	Fosforo totale (mg/Kg)	Azoto totale (%)
CALA t_0	4,8	75,3	1.500	0,65
Ds	0,9	13	93	0,07
CALA t_1	5,2	74,3	1.444	0,64
Ds	1,2	18	337	0,04
LICATA t_0	0,9	5,5	928	0,08
Ds	0,1	1	214	0,01
LICATA t_1	1,2	5,7	876	0,07
Ds	0,2	1	189	0,01
ACQUASANTA t_0	0,71	8,7	597	0,2
Ds	0,2	2	58	0,07
ACQUASANTA t_1	1	10,4	626	0,2
Ds	0,3	3	42	0,06

Come si può osservare in figura 37, i sedimenti di Cala hanno presentato i valori più arricchiti in clorofilla-a rispetto agli altri due siti, in particolare al tempo t_1 . Questi valori sono compresi tra $4,82 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$ al tempo t_0 e $5,19 \pm 1 \mu\text{g/g}$ al tempo t_1 . Invece, valori riscontrati a Licata e a Acquasanta sono paragonabili: questi valori sono compresi tra $0,95 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ al tempo t_0 e $1,24 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ al tempo t_1 per Licata, e tra $0,71 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ al tempo t_0 e $1,2 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$ al tempo t_1 per Acquasanta.

Inoltre, per quanto concerne i feopigmenti, anche in questo caso i sedimenti di Cala presentano i valori più arricchiti rispetto agli altri siti (figura 38). Questi valori sono compresi tra $74 \pm 13 \mu\text{g/g}$ al tempo t_0 e $74 \pm 18 \mu\text{g/g}$ al tempo t_1 . I valori di Licata ed Acquasanta sono invece paragonabili. Questi valori sono compresi tra $5,5 \pm 1 \mu\text{g/g}$ al tempo t_0 e $5,73 \pm 1 \mu\text{g/g}$ al tempo t_1 per Licata, e tra $8,72 \pm 2 \mu\text{g/g}$ al tempo t_0 e $10,49 \pm 3 \mu\text{g/g}$ al tempo t_1 per Acquasanta.

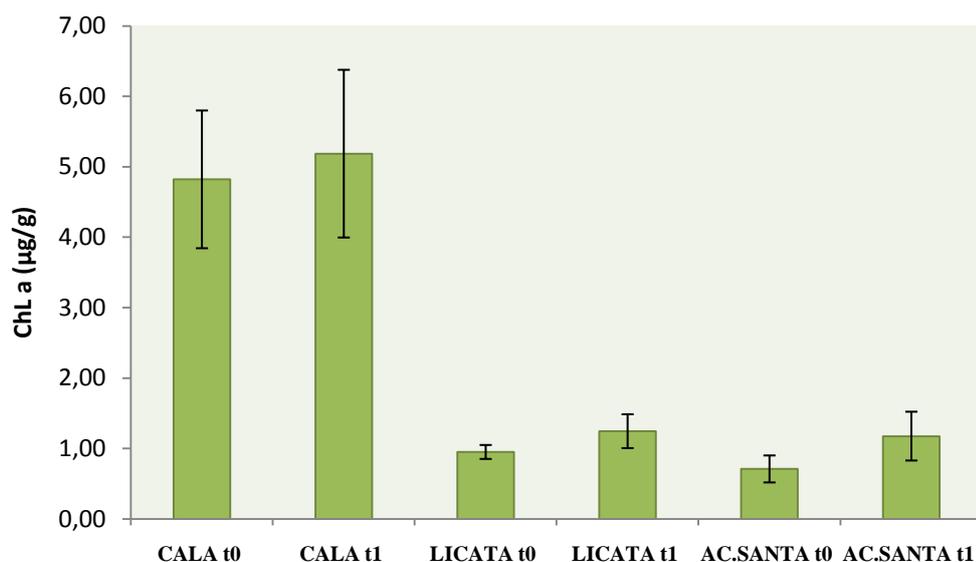


Fig. 37 - Concentrazioni di clorofilla-a ($\mu\text{g/g} \pm \text{ds}$) nel sedimento di Cala, Licata ed Acquisanta.

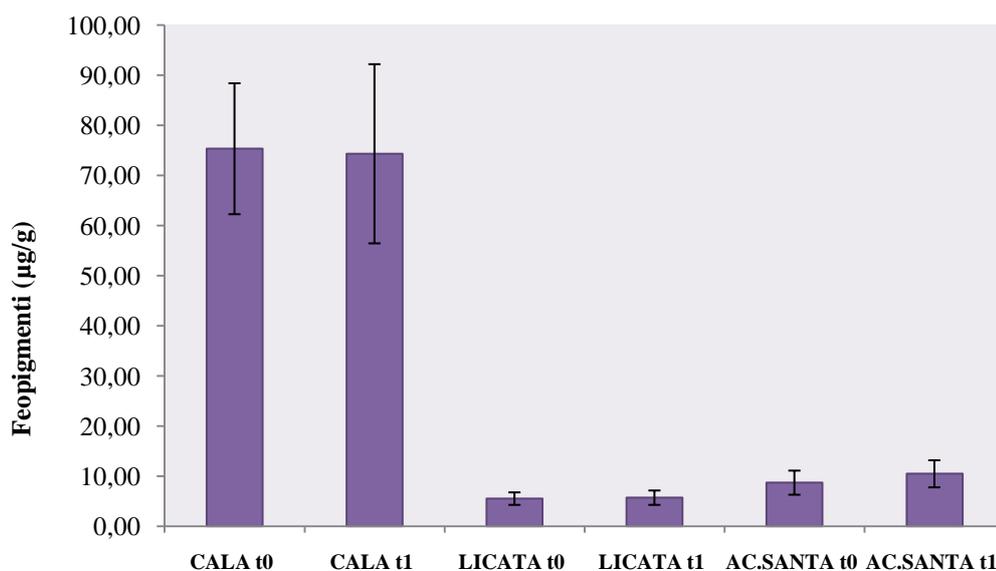


Fig. 38 - Concentrazioni di feopigmenti ($\mu\text{g/g} \pm \text{ds}$) nel sedimento di Cala, Licata ed Acquisanta.

Come è possibile osservare in figura 39, il fosforo totale è presente in maggiore concentrazione nei sedimenti di Cala, senza differenze tra il tempo t_0 e il tempo t_1 . Nel sito Cala questi valori sono compresi tra 1500 ± 93 mg/Kg p.s. al tempo t_0 e 1444 ± 337 mg/Kg p.s. al tempo t_1 . I sedimenti di Licata presentano valori più arricchiti di fosforo, rispetto ad Acquisanta. Nel sito Licata i valori sono compresi tra 928 ± 214 mg/Kg p.s. al tempo t_0 e

876±189 mg/Kg p.s. al tempo t_1 . Ad Acquasanta i livelli di fosforo sono risultati pari a 597±58 mg/Kg p.s. al tempo t_0 e a 626±42 mg/Kg p.s. al tempo t_1 .

Anche l'azoto è presente in maggiore concentrazione a Cala (figura 40) (0,6±0,07 mg/Kg p.s. al tempo t_0 e 0,6±0,04 mg/Kg p.s. al tempo t_1). Nel sito Acquasanta i valori di azoto sono 0,2±0,07 mg/Kg p.s. sia al tempo t_0 che al tempo t_1 , mentre a Licata i livelli di azoto sono risultati più bassi, pari a 0,08±0,01 mg/Kg p.s. al tempo t_0 e a 0,07±0,01 mg/Kg p.s. al tempo t_1 .

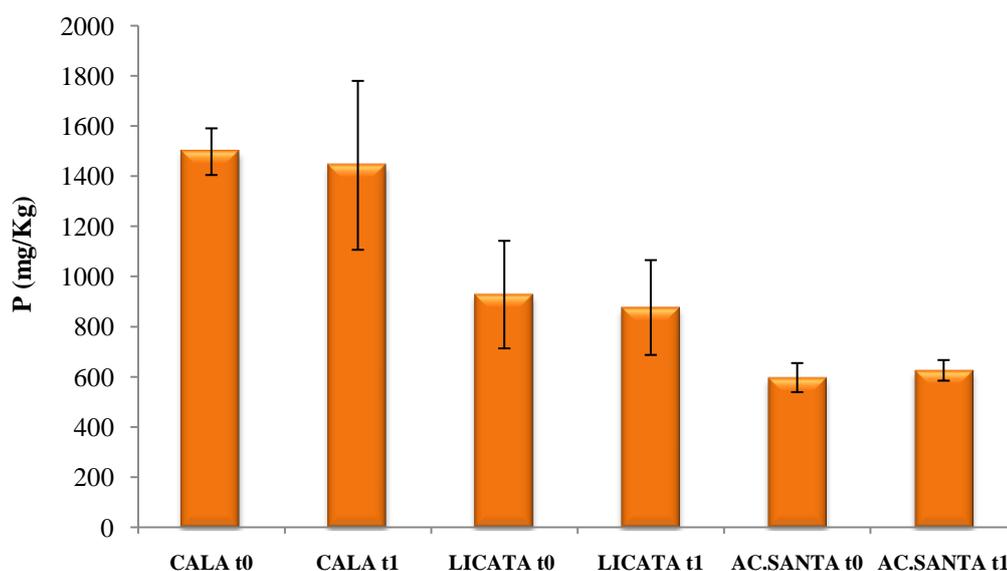


Fig. 39 - Concentrazioni di fosforo totale (mg/kg p.s. ± ds) nei sedimenti di Cala, Licata ed Acquasanta

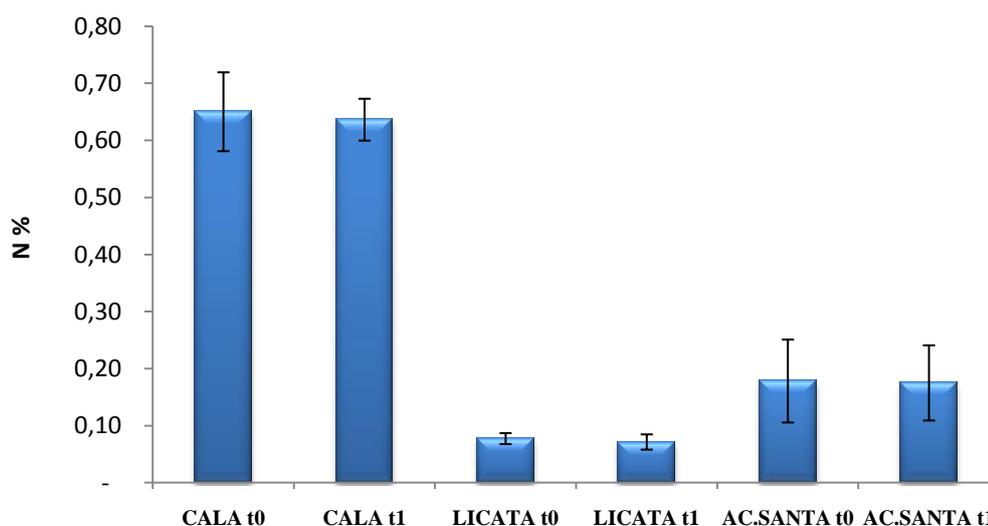


Fig. 40- Concentrazioni di azoto totale (mg/kg p.s. ± ds) nei sedimenti di Cala, Licata ed Acquasanta

4.2.2 – Isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$

I valori medi di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ e le relative deviazioni standard nei sedimenti delle tre aree di studio (Cala, Licata e Acquasanta) sono riportate in tabella 17. Le acque di Acquasanta hanno presentato i valori più arricchiti. Questi valori sono pari a $5,4\pm 0,1\text{‰}$ al tempo t_0 e a $5,3\pm 0,1\text{‰}$ al tempo t_1 per il $\delta^{15}\text{N}$, invece a $-18,8\pm 0,5\text{‰}$ al tempo t_0 e a $-19,3\pm 0,1\text{‰}$ al tempo t_1 per il $\delta^{13}\text{C}$.

Tabella 17 – Media dei rapporti isotopici di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ nei sedimenti di Cala, Licata ed Acquasanta.

	CALA t_0	CALA t_1	LICATA t_0	LICATA t_1	ACQUASANTA t_0	ACQUASANTA t_1
$\delta^{15}\text{N}$	2,9	3,2	4,7	4,9	5,4	5,3
ds	0,2	0,2	0,5	0,2	0,2	0,1
$\delta^{13}\text{C}$	-24,9	-25,09	-22,5	-22,1	-18,8	-19,3
ds	0,2	0,2	0,5	0,2	0,5	0,1

Come è possibile notare in figura 41, i valori dei rapporti isotopici del carbonio e dell'azoto nei sedimenti delle rispettive aree oggetto di studio suggeriscono la presenza di variazioni spaziali. All'interno della stessa area non sussistono notevoli variazioni temporali.

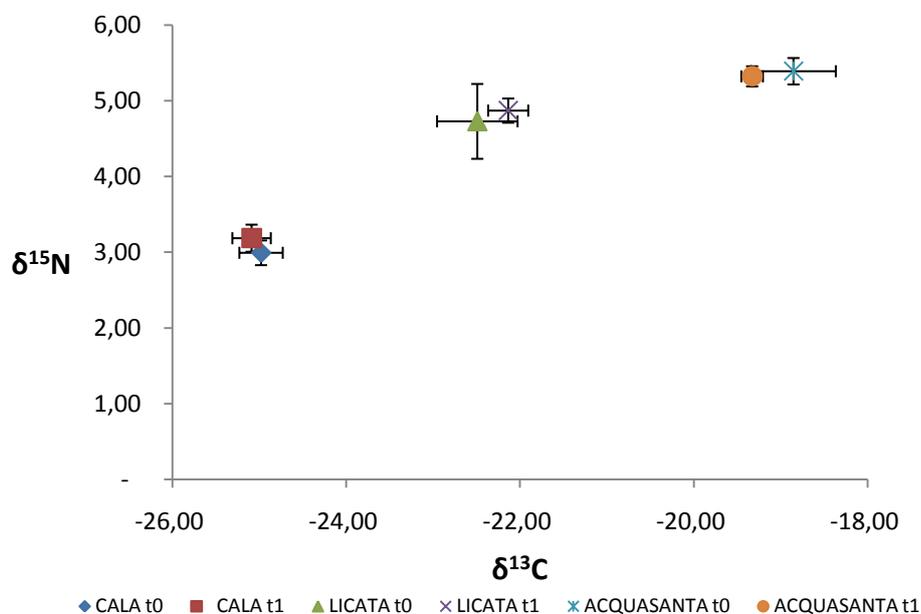


Fig. 41 - Valori dei rapporti isotopici $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ e le relative deviazioni standard nei sedimenti di Cala, Licata ed Acquasanta.

4.2.3 - Contenuto di acqua e sostanza organica

I risultati che consentono di classificare i sedimenti in base alla presenza di sostanza organica e di acqua, relativi ai campioni di Cala, Licata ed Acquisanta nelle diverse stazioni, sono riassunti nella tabella e si riferiscono alla media di tre determinazioni effettuate sullo stesso campione. La deviazione standard relativa al metodo analitico per la determinazione dell'umidità calcolata dai risultati di tre analisi dello stesso campione è risultata inferiore al 5%.

Il contenuto di acqua nei sedimenti prelevati durante le diverse campagne, nel sito Cala varia dal 53% al 65%, in quelli prelevati a Licata dal 32% al 36% ed, infine in quelli del sito Acquisanta dal 29 al 58% (figura 42). Le variazioni del contenuto d'acqua che si osservano per lo stesso sito sono da attribuire alla variabilità del campione, che in ogni caso, è risultata molto bassa per i siti Cala e Licata, mentre risulta significativamente più alta (25%) per il sito di Acquisanta. Probabilmente ciò è da attribuire alla non omogeneità dei fondali di quest'ultimo sito.

In funzione del loro contenuto di acqua i sedimenti possono essere classificati in ghiaiosi, sabbiosi e fangosi. Le particelle più fini possono trattenere più acqua e più sostanza organica rispetto a quelle di dimensioni maggiori (Budzinski H. *et al.*, 1997).

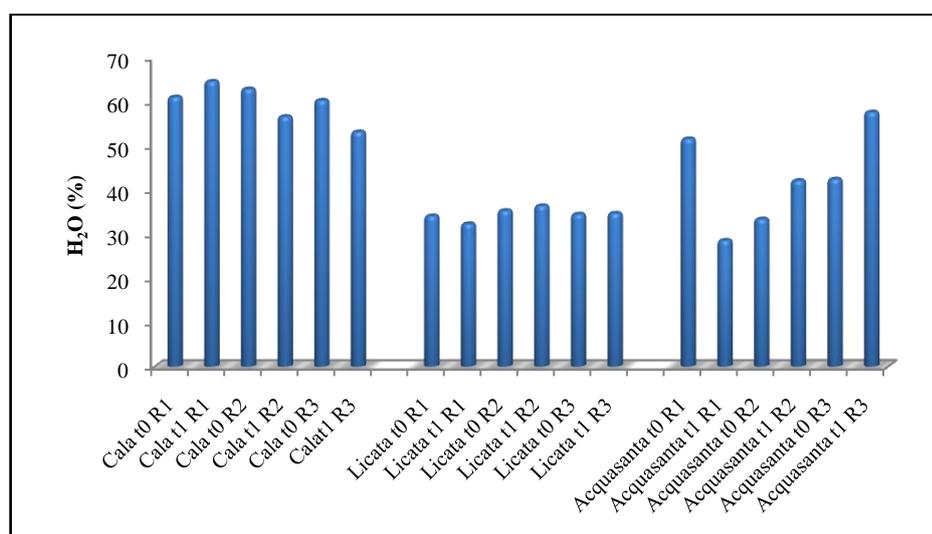


Fig. 42 - Percentuale di acqua nei sedimenti dei tre siti siciliani

Pertanto, secondo i criteri riportati in letteratura (Budzinski H. *et al.*, 1999) i sedimenti di Licata ed Acquisanta possono essere classificati sabbiosi, invece quelli prelevati a Cala

sono risultati pelitici. Il contenuto di sostanza organica, determinato come perdita in peso alla calcinazione sul campione essiccato a 180°C, ed espresso come media di tre determinazioni sullo stesso campione, varia dal 5,5% al 6,7% nel sito Cala, dal 3,4% al 3,8% a Licata e dal 2,8% al 3,8% nel sito Acquisanta (figura 43). Le deviazioni standard sono inferiori del 10%.

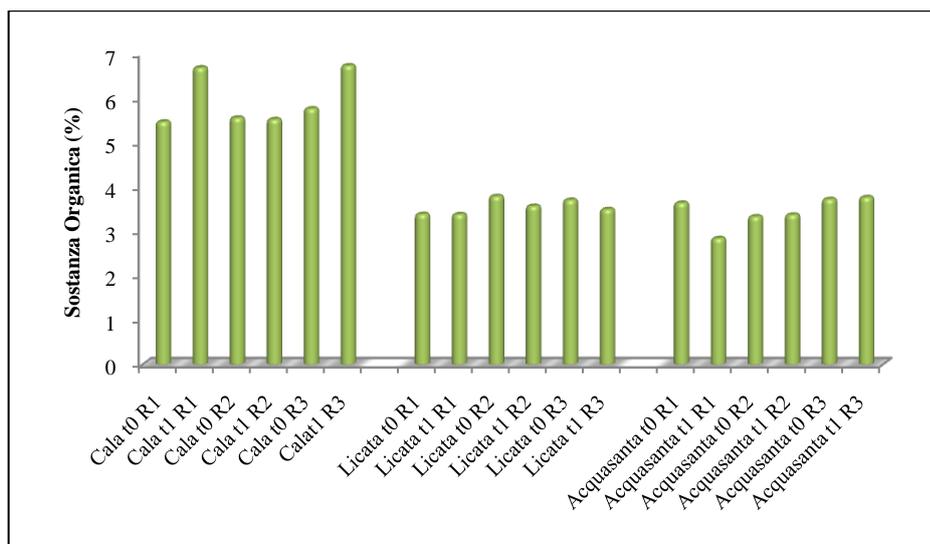


Fig. 43 - Percentuale di sostanza organica nei sedimenti dei tre siti siciliani

La correlazione tra contenuto di acqua e di sostanza organica nei sedimenti è mostrata nella figura 44. Si ottiene una retta con $R = 0,82$ che spiega come i due parametri nei sedimenti studiati siano direttamente proporzionali.

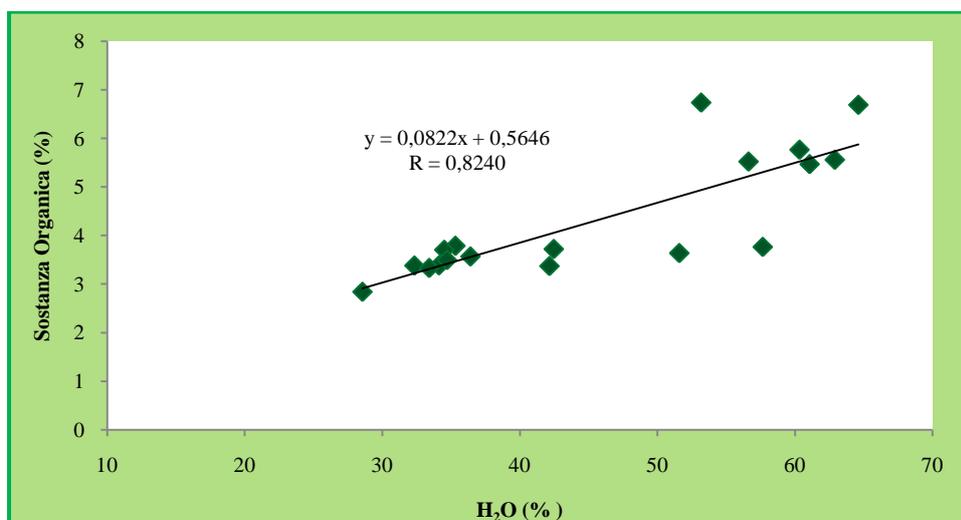


Fig. 44 – Correlazione tra le percentuali di acqua e sostanza organica nei sedimenti dei tre siti siciliani.

Tabella 18 – Risultati delle analisi per la caratterizzazione dei sedimenti nelle tre aree oggetto di studio.

Campione	H ₂ O (%)	sostanza organica (%)	∑ IPA (µg/Kg)
Cala t0 St 1	61	5	11518
Cala t0 St 2	63	6	8583
Cala t0 St 3	60	6	8760
Cala t1 St 1	65	6	11467
Cala t1 St 2	57	5	10394
Cala t1 St 3	53	7	9120
Licata to St 1	34	3	120
Licata to St 2	35	4	140
Licata to St 3	34	4	118
Licata t1 St 1	32	3	76
Licata t1 St 2	36	4	61
Licata t1 St 3	35	3	118
Acquasanta to St 1	51	4	7387
Acquasanta to St 2	33	3	3150
Acquasanta to St 3	42	4	5498
Acquasanta t1 St 1	28	3	3576
Acquasanta t1 St 2	42	3	8225
Acquasanta t1 St 3	58	4	10979

4.2.4 – Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

Le tabelle 19 e 20 riportano le concentrazioni dei singoli IPA nei sedimenti (esprese in µg/Kg p.s.) e le concentrazioni totali degli stessi determinate nei sedimenti delle diverse stazioni dei tre siti portuali. Le deviazioni standard relative ai diversi campioni dello stesso sito variano dal 26% al 34%.

Le concentrazioni totali di IPA riscontrate nel sedimento delle tre aree sono comprese tra 8583 e 11519 µg/Kg p.s. di peso secco di sedimento a Cala, tra 61 e 140 µg/Kg a Licata e tra 3151 e 1098 µg/Kg p.s. ad Acquasanta.

Quindi è possibile osservare in figura 45 le concentrazioni di IPA totali che risultano maggiori nell'area portuale di Cala, rispetto all'area di Licata e di Acquasanta.

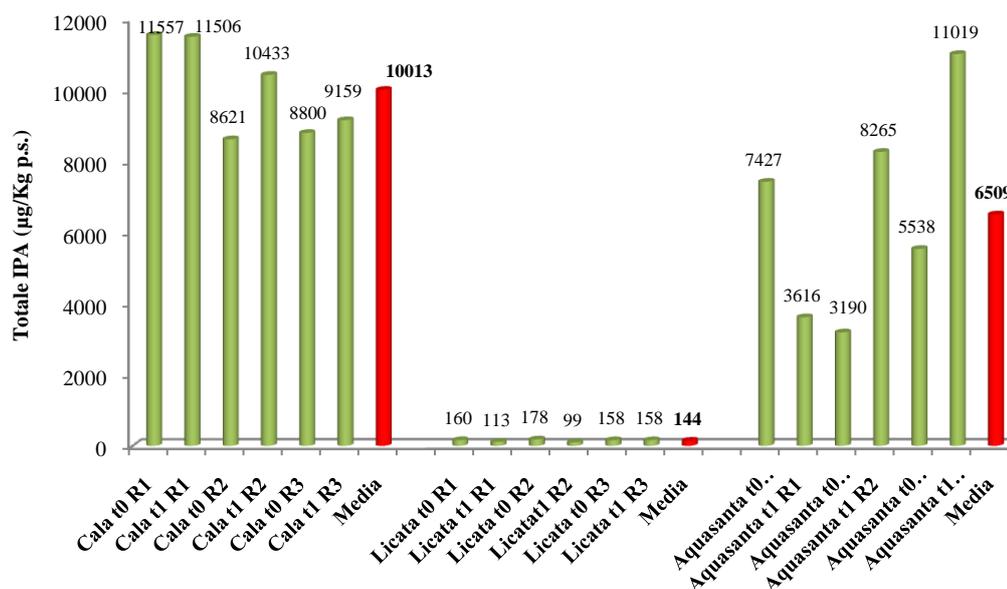


Fig. 45 – Concentrazione totale di IPA ($\mu\text{g}/\text{Kg p.s.}$) nei campioni di sedimento di Cala, Licata e Acquasanta.

Le deviazioni standard calcolate sulle concentrazioni di IPA totali nei sedimenti relative ai due siti, ai rispettivi tempi t_0 e t_1 , sono riportate in tabella 21:

Tabella 21 – Concentrazioni di IPA totali ($\mu\text{g}/\text{kg p.s.} \pm \text{ds}$) nei sedimenti di Cala, Licata e Acquasanta.

CALA t0 St1	8900±40	LICATA t0 St1	112±33	ACQUASANTA t0 St1	6591±300
CALA t0 St2	8091±33	LICATA t0 St2	155±56	ACQUASANTA t0 St2	2478±504
CALA t0 St3	7427±23	LICATA t0 St3	135±49	ACQUASANTA t0 St3	4506±145
CALA t1 St1	7517±20	LICATA t1 St1	114±15	ACQUASANTA t1 St1	3108±34
CALA t1 St2	5192±14	LICATA t1 St2	98±12	ACQUASANTA t1 St2	6295±468
CALA t1 St3	6804±9	LICATA t1 St3	154±75	ACQUASANTA t1 St3	8697±179

Come si può osservare dalla figura 46, in generale, le distribuzioni percentuali dei singoli IPA in tutti i siti risultano paragonabili, in particolare fluorantene, benzo[b]fluorantene e pirene sono gli idrocarburi predominanti nella maggior parte dei sedimenti. Solo nel sito Licata, si riscontra un'elevata concentrazione di perilene (18,2%) che è, presumibilmente, indice dell'origine biogenica di una parte degli IPA del campione.

Inoltre, in buon accordo con i criteri riportati da Budzinski *et al.*, (1999), nei sedimenti ad elevato contenuto di acqua del sito Cala sono state riscontrate concentrazioni maggiori di IPA (tabella 18) rispetto agli altri due siti, anche se, come si vede dalla figura 47, una buona correlazione (% acqua e totale IPA) è stata evidenziata solo per il sito Acquasanta.

Tabella 19 - Concentrazioni dei singoli IPA ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ p.s.media) nei sedimenti dei tre siti portuali relativi al tempo to.

	CALA t0 St 1	CALA t0 St 2	CALA t0 St 3	LICATA t0 St 1	LICATA t0 St 2	LICATA t0 St 3	AC.SANTA t0 St 1	AC.SANTA t0 St 2	AC.SANTA t0 St 3
acenaftilene	40	57	80	2	2	2	17	11	19
acenaftene	28	41	48	2	2	2	36	13	27
fluorene	28	57	68	2	2	1	20	8	15
fenantrene	242	200	214	8	9	7	429	109	260
antracene	87	75	95	1	2	1	111	29	62
fluorantene	837	891	792	14	22	14	1188	323	785
pirene	1134	1193	1117	16	23	23	1194	354	811
benzo (a) antracene	464	443	495	3	7	3	401	159	278
crisene	568	560	490	6	10	7	529	207	366
benzo (b) fluorantene	2250	1450	1422	5	12	7	1132	593	886
benzo (k) fluorantene	852	718	688	1	4	2	476	258	370
benzo (e) pirene	861	612	578	6	6	5	342	173	268
benzo (a) pirene	1612	957	915	2	7	5	798	417	619
perilene	350	231	232	22	26	27	158	71	127
indeno(1,2,3-cd) pyrene	951	482	688	8	2	3	279	201	295
dibenzo (a,h) antracene	321	118	179	10	1	4	85	66	90
benzo (g,h,i) perilene	892	498	659	11	2	6	191	160	222
Σ IPA	11518	8583	8760	120	140	118	7387	3150	5498

Tabella 20 - Concentrazioni dei singoli IPA ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ p.s.media) nei sedimenti dei tre siti portuali relativi al tempo t_1 .

	CALA t_1 St 1	CALA t_1 St 2	CALA t_1 St 3	LICATA t_1 St 1	LICATA t_1 St 2	LICATA t_1 St 3	AC.SANTA t_1 St 1	AC.SANTA t_1 St 2	AC.SANTA t_1 St 3
acenaftilene	29	29	28	2	2	2	4	11	21
acenaftene	24	35	18	1	2	2	14	36	22
fluorene	24	23	19	1	1	1	6	22	14
fenantrene	262	286	259	4	6	9	213	581	467
antracene	98	98	78	1	0,3	1	50	186	111
fluorantene	1125	1116	889	9	6	17	509	1328	1591
pirene	1579	1419	1170	10	7	19	491	1253	1572
benzo (a) antracene	640	518	484	2	1	4	175	467	549
crisene	707	640	567	5	4	8	223	569	748
benzo (b) fluorantene	2008	1606	1592	1	1	8	490	1068	1737
benzo (k) fluorantene	783	624	621	2	2	2	195	431	680
benzo (e) pirene	754	593	590	3	2	5	154	327	512
benzo (a) pirene	1238	1035	1085	1	4	5	366	794	1206
perilene	338	238	243	23	22	29	71	149	250
indeno(1,2,3-cd) pyrene	836	883	656	2	0,4	2	278	476	718
dibenzo (a,h) antracene	241	299	186	1	1	1	118	206	297
benzo (g,h,i) perilene	781	952	635	10	1	3	219	320	484
Σ IPA	11467	10394	9120	76	61	118	3576	8225	10979

Risultati e discussione

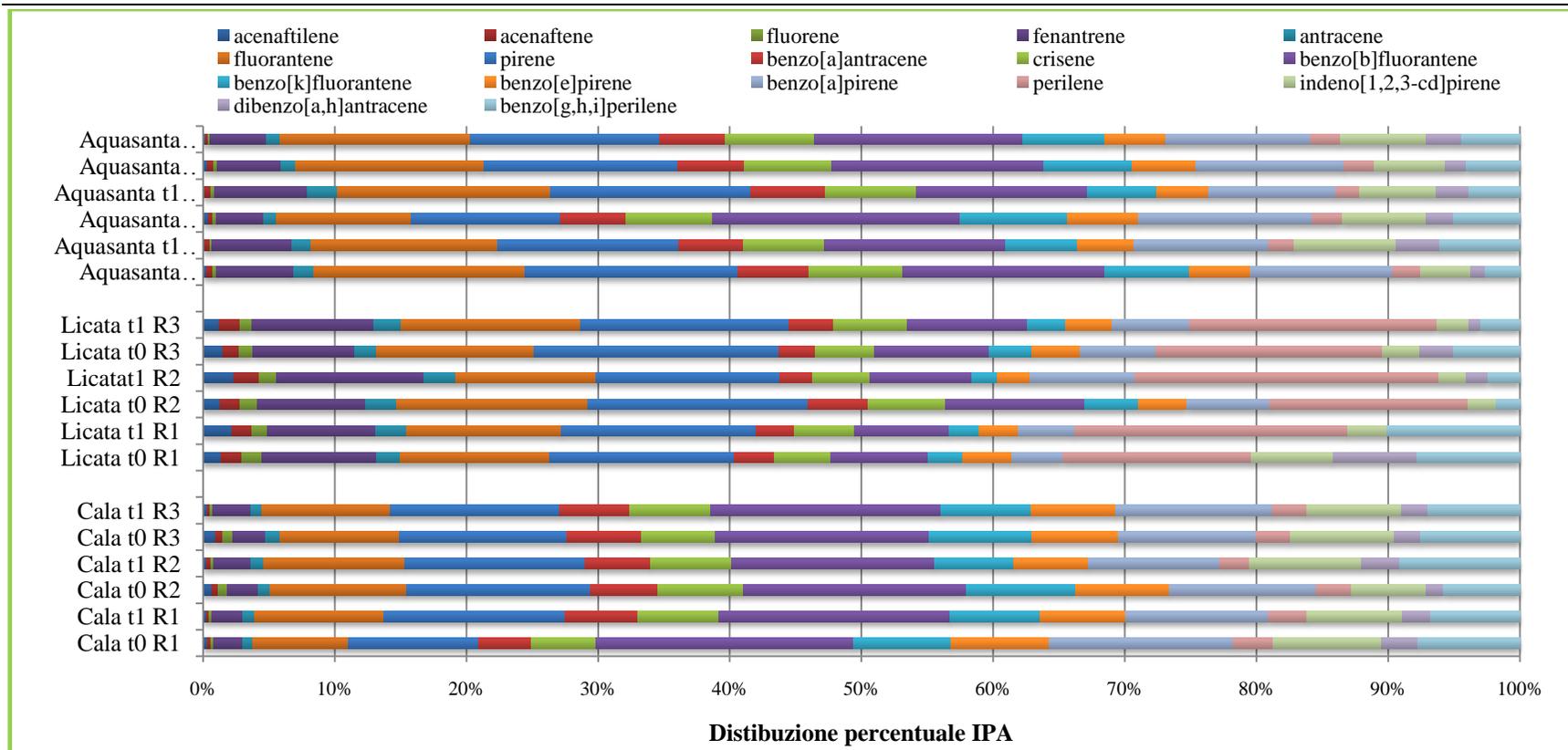


Fig. 46 – Distribuzione percentuale degli IPA nei campioni di sedimento di Cala, Licata ed Acquisanta.

Budzinski *et al.*, (1999) hanno riportato come la sostanza organica rivesta una notevole importanza nel favorire l'adsorbimento delle sostanze di natura idrofobica alla superficie dei sedimenti.

In figura 48, per i siti Licata e Cala la concentrazione di IPA e il contenuto di sostanza organica non risultano correlati, mentre ad Acquasanta il coefficiente di correlazione ottenuto risulta basso ($R = 0,64$).

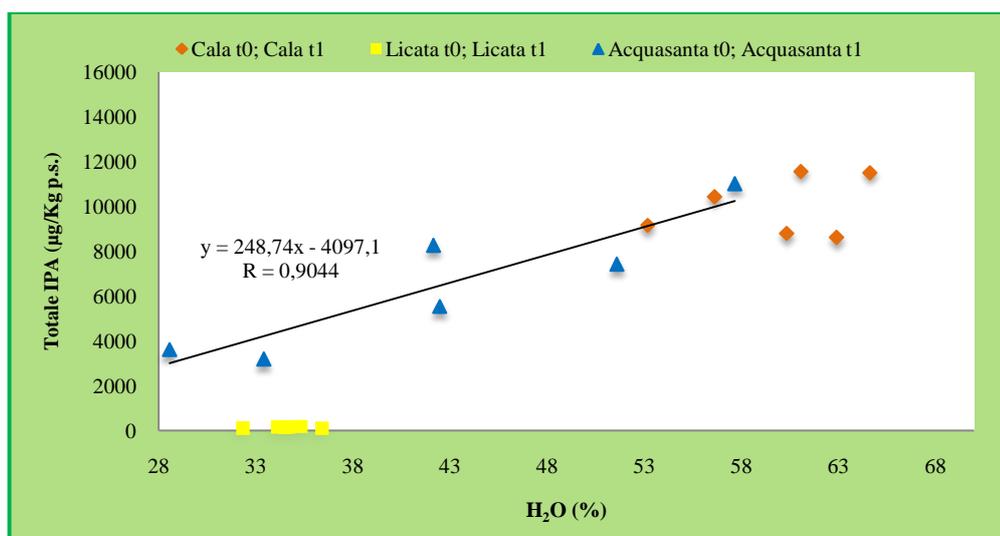


Fig. 47 – Correlazione tra contenuto percentuale di acqua e concentrazione totale di IPA nei campioni di sedimento di Cala, Licata ed Acquasanta.

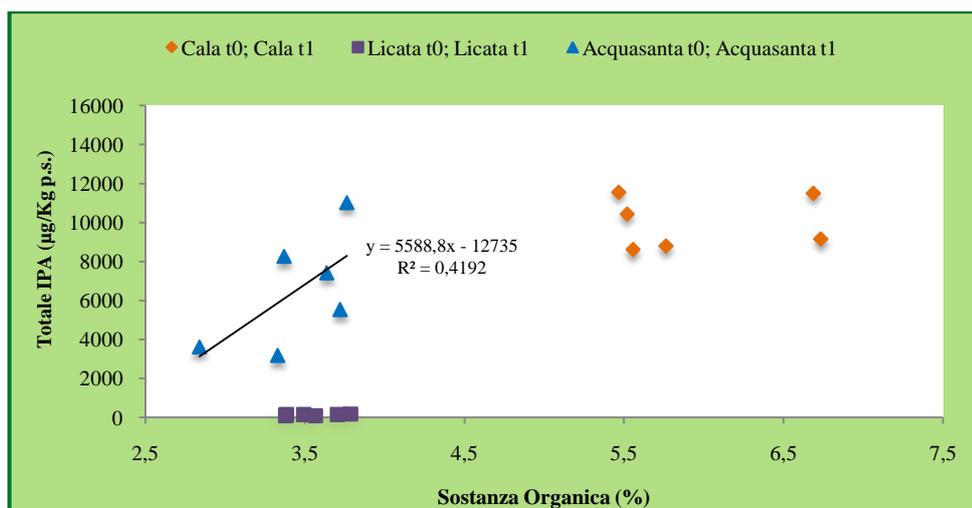


Fig. 48 – Correlazione tra contenuto percentuale di sostanza organica e concentrazione totale di IPA nei campioni di sedimento di Cala, Licata ed Acquasanta.

Tali risultati suggeriscono che, benché gli IPA siano associati alla materia organica dei sedimenti, viste le loro caratteristiche idrofobe, la frazione a cui essi sono adsorbiti può corrispondere solo ad una piccola percentuale del totale di sostanza organica contenuta nel sedimento (Rogers, 2002).

I valori delle concentrazioni dei singoli IPA, nella maggior parte dei casi, risultano ben correlati con il contenuto totale degli stessi (tabella 22).

In generale, questa correlazione indica che è la stessa sorgente a produrre i contaminanti presenti nei sedimenti.

Tabella 22 – Coefficiente di correlazione lineare (r) per ogni singolo IPA e la concentrazione totale degli stessi nei campioni di sedimento di Cala, Licata ed Acquasanta.

Analiti	Coefficienti di correlazione (r)						
	Cala	Licata	Acquasanta		Cala	Licata	Acquasanta
Acen	0,59	0,35	0,69	B(b)F	0,92	0,93	0,97
Ace	0,51	0,82	0,56	B(k)F	0,63	0,93	0,96
Flu	0,65	0,76	0,64	B(e)P	0,84	0,99	0,97
Fen	0,59	0,85	0,86	B(a)P	0,82	0,61	0,98
Ant	0,55	0,77	0,74	Per	0,89	0,63	0,97
Fluor	0,50	0,95	0,98	I(cd)P	0,88	0,46	0,90
Pir	0,56	0,93	0,99	D(ah)A	0,85	0,26	0,84
B(a)A	0,56	0,88	0,99	B(ghi)P	0,79	0,78	0,87
Cri	0,69	0,91	0,99				

Poiché gli IPA dal punto di vista tossicologico hanno un comportamento diverso, risulta di notevole importanza calcolare la *potenza cancerogena totale (TEQ)* prendendo in considerazione la potenza cancerogena relativa (*toxic equivalent factor, TEF*) dei singoli IPA proposta da Tsai *et al.*, (2004). La potenza cancerogena totale è espressa in termini di *concentrazione equivalente di Benzo[a]pirene (B[a]P_{eq})* poiché questo è il composto più cancerogeno:

$$TEF = \sum (IPA_i \cdot TEF_i)$$

Come si può notare in figura 49, le concentrazioni maggiori di IPA cancerogeni sono state determinate nei sedimenti prelevati a Cala, area marina portuale, che molti anni ha ricevuto gli scarichi civili e delle attività produttive della città e probabilmente sono ancora in atto degli scarichi abusivi non censiti.

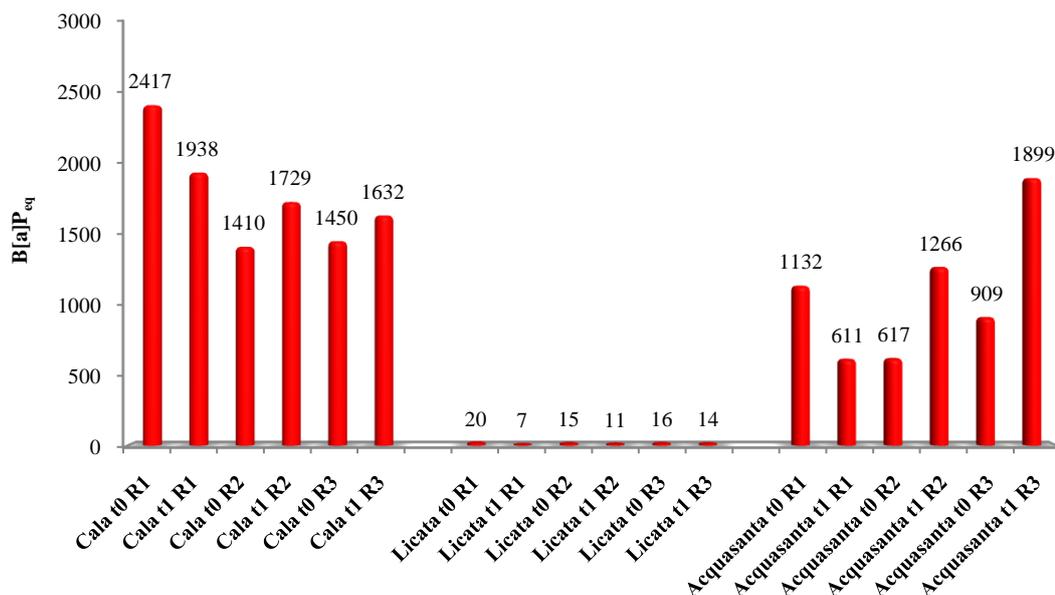


Fig. 49 – Concentrazione equivalente di Benzo[*a*]pirene, **B[*a*]P_{eq}** nei campioni di sedimento di Cala, Licata ed Acquisanta.

Tabella 23 – Concentrazione di IPA in sedimenti asiatici, africani ed europei.

Località	Intervallo di concentrazione totale (µg/Kg p.s.)	Riferimento bibliografico
Estuario Daliao, Mar Bohai, Cina	276,3 – 1606,9	Men <i>et al.</i> , (2009)
Porto ovest di Alessandria D’Egitto	1,7 – 12436	Mostafa <i>et al.</i> , (2003)
Porto di Porto Torres, Sardegna	70 – 1210	De Luca <i>et al.</i> , (2004)
Mar Adriatico (Veneto e Marche, Italia)	Chioggia: 24 – 507	Magi <i>et al.</i> , (2002)
	Ancona: 34 – 307	
Mar Mediterraneo (Sicilia, Italia)	Palermo: 2300 – 29300	Di Leonardo <i>et al.</i> , (2007)
	Augusta: 100 – 1600	
Mar Mediterraneo (Spagna, Francia)	Barcellona: 772,1 – 1176	Guitart <i>et al.</i> , (2010)
	Banyuls-sur-Mer: 17,8	
Mar Mediterraneo (Sicilia, Italia)	Cala (Pa): 8621 – 11557	Presente studio
	Acquisanta (Pa): 3190 – 11019	
	Licata (Ag): 99 – 178	

Dal confronto dei dati riportati in tabella 23, i sedimenti analizzati in questa ricerca sono confrontabili con quelli riscontrati in letteratura.

Rispetto ai risultati riportati da Di Leonardo *et al.*, (2007) per l’area costiera palermitana si potrebbe avanzare l’ipotesi di un iniziale miglioramento della qualità dei sedimenti da quando, soprattutto per la Cala, sono iniziati i lavori di dragaggio portuale.

Nonostante ciò, entrambi i siti palermitani mostrano un contenuto in IPA maggiore rispetto ad altre aree mediterranee e, inoltre, le concentrazioni totali sono maggiori del valore limite riportato nella guida nazionale per i sedimenti delle aree marino costiere (G.U.R.I., D.M. 367/03, 2004: 200 µg/Kg p.s.)

4.2.4 a – Origine degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

Le cause d'inquinamento possono essere varie, alcune delle quali anche temporanee ed occasionali, e gli IPA immessi nell'ambiente possono dunque avere origini diverse.

Gli IPA possono subire processi di trasformazione prima e dopo essere adsorbiti nei sedimenti. Le varie sorgenti di questa classe di sostanze producono miscele di composti che differiscono per la loro natura quali-quantitativa. Durante i processi a bassa temperatura, come la maturazione della sostanza organica che porta alla formazione del petrolio, la formazione dei diversi IPA è determinata dalle proprietà termodinamiche e predominano i composti a basso peso molecolare e quelli sostituiti (isomeri più stabili) (Sportsol, 1983). Invece, per i processi ad alta temperatura come la combustione della materia organica o pirolisi, la distribuzione dipende dalle proprietà cinetiche, e quindi le miscele ottenute dalle matrici ambientali possono contenere elevate concentrazioni degli isomeri termodinamicamente meno stabili ad elevato peso molecolare e non sostituiti (Baumard *et al.*, 1998; Soclo *et al.*, 2000; Mazeas *et al.*, 2002).

Gli isomeri di massa molecolare 178 u.m.a. (antracene e fenantrene) e 202 u.m.a. (fluorantene e pirene) sono generalmente utilizzati per discriminare, rispettivamente, le sorgenti pirolitiche da quelle petrolifere.

Ad esempio un elevato rapporto *fenantrene/antracene* è indicativo di un inquinamento da composti petroliferi (Yang, 2001) o da catrame (Baumard *et al.*, 1998). Questo può essere spiegato col fatto che il fenantrene è termodinamicamente più stabile dell'antracene e quindi all'aumentare della temperatura si osserva una diminuzione del rapporto fen/antr perché aumenta la concentrazione dell'antracene (Budzinski *et al.*, 1997).

Alcuni autori sostengono che i rapporti fen/antr <15 sono imputabili a composti prodotti da processi pirolitici, mentre rapporti maggiori (>15) sono riconducibili ad IPA di origine petrolifera (Supplemento Ordinario alla Gazzetta Ufficiale, serie generale N° 223 del 23 settembre 2000).

Risulta allo stesso modo indicativo il rapporto *fluorantene/pirene*, in questo caso il fluorantene è meno stabile del pirene e così una predominanza del fluorantene è caratteristica di un inquinamento pirolitico, mentre si parla di inquinamento da prodotti petroliferi se è il pirene ad essere più abbondante. In figura 39 sono riportati i valori relativi ai due rapporti isomerici, di cui sopra. Per quanto riguarda il rapporto fluor/(fluor+pir), un valore pari a 0,4 è considerato come confine tra l'origine pirolitica e quella petrolifera. In particolare, valori inferiori a 0,4 sono tipici dell'origine petrolifera, se i rapporti sono compresi tra 0,4 e 0,5 si tratta di combustione di prodotti petroliferi, mentre la combustione di legna, erba, carta, carbone, comporta valori del rapporto fluor/(fluor+ pir) maggiori di 0,5 (Yunker *et al.*, 2002).

Come si osserva in figura 50 le tre le aree portuali (Cala, Licata ed Acquisanta) sono caratterizzate da un valore di fenantrene/antracene inferiore a 15, invece per quanto riguarda il rapporto fluorantene/pirene, la maggior parte dei campioni presenta valori compresi tra 0,6 e 1,4. Questi risultati possono confermare l'origine pirolitica dei nostri campioni.

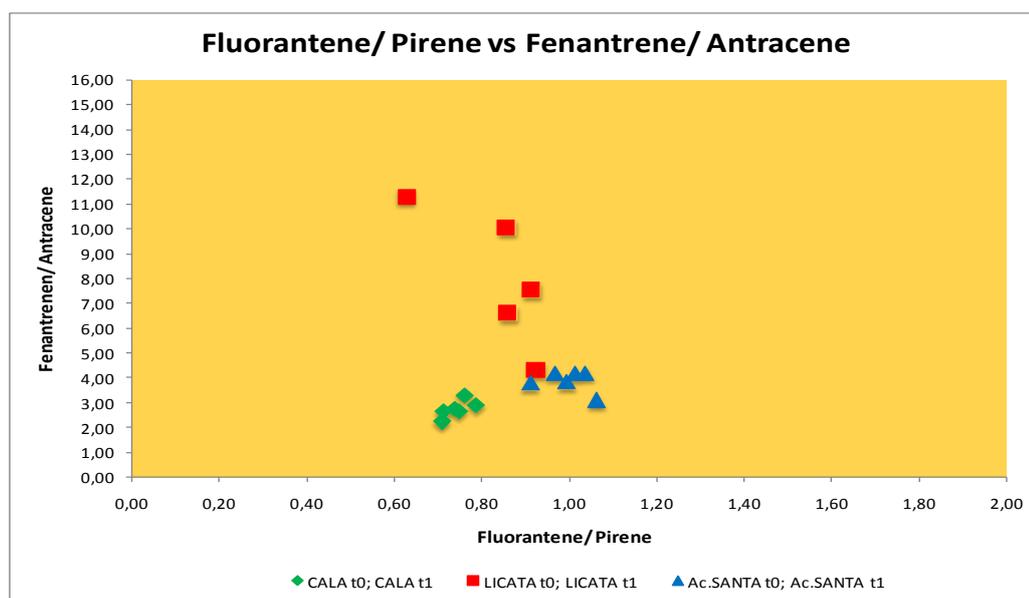


Fig. 50 – Grafico dei valori di fen/ant contro flu/pir.

Il rapporto $B(a)A/(B(a)A+Cri)$ prende in considerazione gli isomeri con massa molecolare di 228 u.m.a. Un valore di questo rapporto $<0,2$ implica un'origine petrolifera, se è maggiore di 0,35 predomina la combustione, ma se è compreso tra 0,2 e 0,35 l'origine viene definita mista, in quanto può essere sia pirolitica che petrolifera e quindi non si può discriminare tra

le due (Yunker *et al.*, 2002). Anche questo rapporto, calcolato nei campioni provenienti dai siti siciliani, conferma l'origine pirolitica degli *analiti indagati*.

Meno utilizzato è il rapporto tra gli analiti con massa 276 u.m.a., l'indeno[1,2,3-*cd*]pirene e il benzo[*g,h,i*]perilene. Emissioni da processi a basse temperature (petrolifera) sono caratterizzate da rapporti $I(cd)P/(I(cd)P+B(ghi)P) < 0,2$, valori compresi tra 0,2 e 0,5 sono attribuibili alla combustione dei combustibili fossili, mentre rapporti maggiori di 0,5 implicano combustione di erba, legna e carbone (Yunker *et al.*, 2002). I rapporti dei suddetti isomeri, calcolati per i campioni di sedimento dei tre siti, confermano l'origine già ipotizzata.

Un altro metodo per distinguere tra l'origine ad alta temperatura (pirolitica) e quella a bassa temperatura (petrolifera) di questo tipo di contaminanti è quello di considerare il rapporto tra le concentrazioni degli IPA a basso e ad alto peso molecolare presenti nelle matrici studiate. Per tutti i campioni, è stato calcolato il rapporto LMW/HMW, dove con LMW si intende la somma delle concentrazioni degli analiti a basso peso molecolare (Acen+Ace+Flu+Fen+Ant+Fluor+Pir) e con HMW la somma delle concentrazioni di quelli con peso molecolare maggiore o uguale a 228 u.m.a. ($B(a)A + Cri + B(b)F + B(k)F + B(e)P + B(a)P + Per + I(cd)P + D(ah)A + B(ghi)P$). Più alto è il rapporto considerato, maggiore è la percentuale degli IPA di origine petrolifera su quella pirolitica; vale a dire che rapporti minori di 1 sono attribuiti alla combustione, mentre rapporti maggiori di 1 indicano petrogenesi (Soclo *et al.*, 2000; De Luca *et al.*, 2004; Magi *et al.*, 2002). Come mostrato nella tabella 22, per tutti i sedimenti indagati in questa ricerca, il valore del rapporto LMW/HMW è minore di 1, quindi si ha una predominanza dell'origine pirolitica.

Il *total index* tiene conto contemporaneamente degli indici proposti in letteratura ed è dato dalla somma dei singoli indici normalizzati rispetto ai valori limite di transizione (sorgente petrolifera/sorgente pirolitica) riportati in letteratura (Yunker *et al.*, 2002; Mannino, 2005):

$$\text{Total index} = (Fluor/Fluor + Pir)/(0,4) + (Ant/Ant + Fen)/(0,2) + (B(a)A/B(a)A + Cri)/(0,1) + (I(cd)P/I(cd)P + B(ghi)P)/(0,5)$$

Pertanto considero l'origine degli IPA da processi ad elevate temperature quando il valore del *total index* è maggiore di 4, mentre se risulta inferiore l'origine è da attribuire a processi a bassa temperatura.

Come si può vedere dalla tabella 24 i valori ottenuti del *total index* nei sedimenti di Cala, Licata e Acquisanta confermano l'origine pirolitica degli analiti.

Il *Perylene index*, definito come il rapporto tra la concentrazione del perilene e quella del totale degli IPA a 5 anelli, permette di distinguere tra l'origine biogenica e quella pirogenica del perilene stesso (Venkatesan, 1988; Thiele *et al.*, 2002; Yang, 2000). In particolare, valori maggiori di 0,1 indicano l'origine biogenica del suddetto contaminante, mentre valori inferiori sono indicativi di processi ad elevate temperature. Nei campioni di sedimenti analizzati, i valori di *Perylene index* variano da 0,054 a 0,063 nel sito Cala, da 0,37 a 0,55 nel sito Licata e da 0,045 a 0,054 nel sito Acquisanta. Tenendo conto di quanto detto prima, e osservando la figura 51, i valori calcolati per il sito di Licata confermano l'origine biogenica del perilene. Ciò potrebbe essere giustificato dal fatto che il sito Licata è soggetto agli scarichi (forse non depurati) del fiume Sarso o agli escrementi e resti di mangime dei pesci nel sedimento proveniente dall'impianto di acquacoltura lì presente, determinando così un ambiente idoneo alla proliferazione di organismi anaerobici che portano alla produzione di perilene.

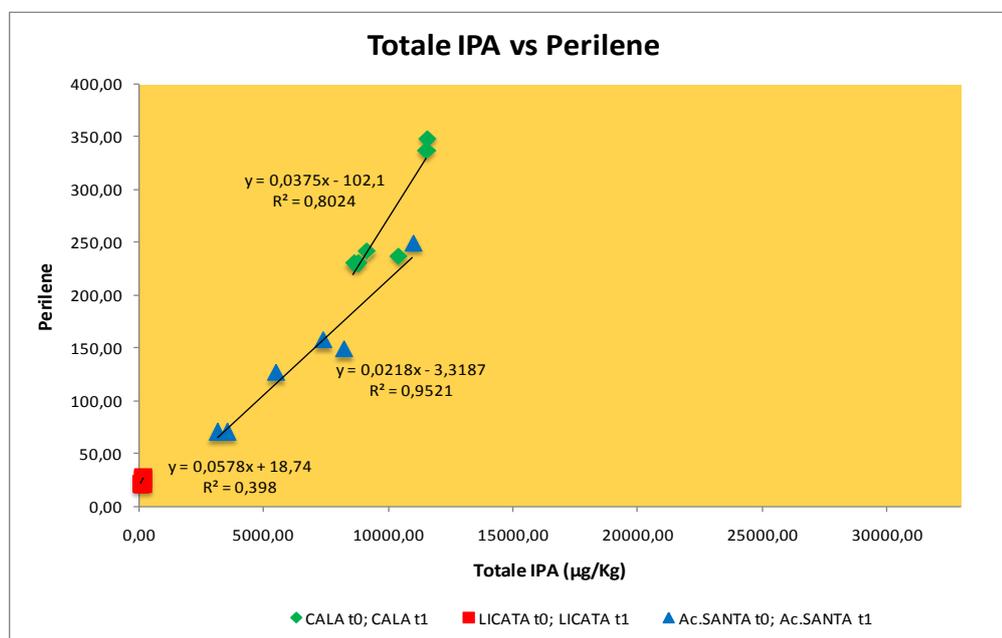


Fig. 51 – Correlazioni tra concentrazione di perilene e IPA totali nei sedimenti di Cala, Licata ed Acquisanta

Tabella 24 – Indici per la determinazione dell'origine degli IPA.

Sito	Ant/(Ant+Fen)	Fluor/(Fluor+Pir)	B[a]A/(B[a]A+Cri)	I[cd]P/(I[cd]P+B[ghi]P)	T.i.	LMW/HMW	P. i
Ct0 R1	0,26	0,42	0,45	0,52	7,9	0,26	0,06
Ct1 R1	0,27	0,42	0,48	0,52	8,2	0,38	0,06
Ct0 R2	0,27	0,43	0,44	0,49	7,8	0,42	0,06
Ct1 R2	0,26	0,44	0,45	0,48	7,8	0,41	0,05
Ct0 R3	0,31	0,41	0,50	0,51	8,6	0,38	0,06
Ct1 R3	0,23	0,43	0,46	0,51	7,9	0,37	0,06
Lt0 R1	0,17	0,45	0,42	0,44	7,0	0,68	0,37
Lt1 R1	0,22	0,44	0,39	0,23	6,6	0,73	0,55
Lt0 R2	0,22	0,47	0,43	0,54	7,7	0,85	0,38
Lt1 R2	0,18	0,43	0,36	0,46	6,5	0,78	0,51
Lt0 R3	0,18	0,39	0,38	0,36	6,4	0,78	0,42
Lt1 R3	0,18	0,46	0,38	0,45	6,7	0,80	0,46
At0 R1	0,21	0,50	0,43	0,59	7,8	0,68	0,05
At1 R1	0,19	0,51	0,44	0,56	7,8	0,57	0,05
At0 R2	0,21	0,48	0,44	0,56	7,7	0,37	0,04
At1 R2	0,24	0,51	0,45	0,60	8,2	0,71	0,05
At0 R3	0,19	0,49	0,43	0,57	7,7	0,56	0,05
At1 R3	0,19	0,50	0,42	0,60	7,7	0,53	0,05
Origine	P	P	P	P	P	P	P

4.2.4 b - Analisi multivariata nMDS

L'analisi multivariata con l'ordinamento nMDS (figure 52 e 53) ha permesso di ricavare dei grafici bidimensionali in cui sono rappresentati con dei punti i diversi siti di campionamento all'interno delle tre aree oggetto di studio. Considerando che a piccole distanze tra i vari punti corrispondono alte similarità, è stato possibile approfondire le dinamiche spaziali relative alla concentrazione di IPA nelle acque e nei sedimenti. In particolare l'nMDS dei sedimenti ha messo in luce maggiormente le evidenti differenze spaziali tra il sito Cala e gli altri due siti Licata ed Acquasanta.

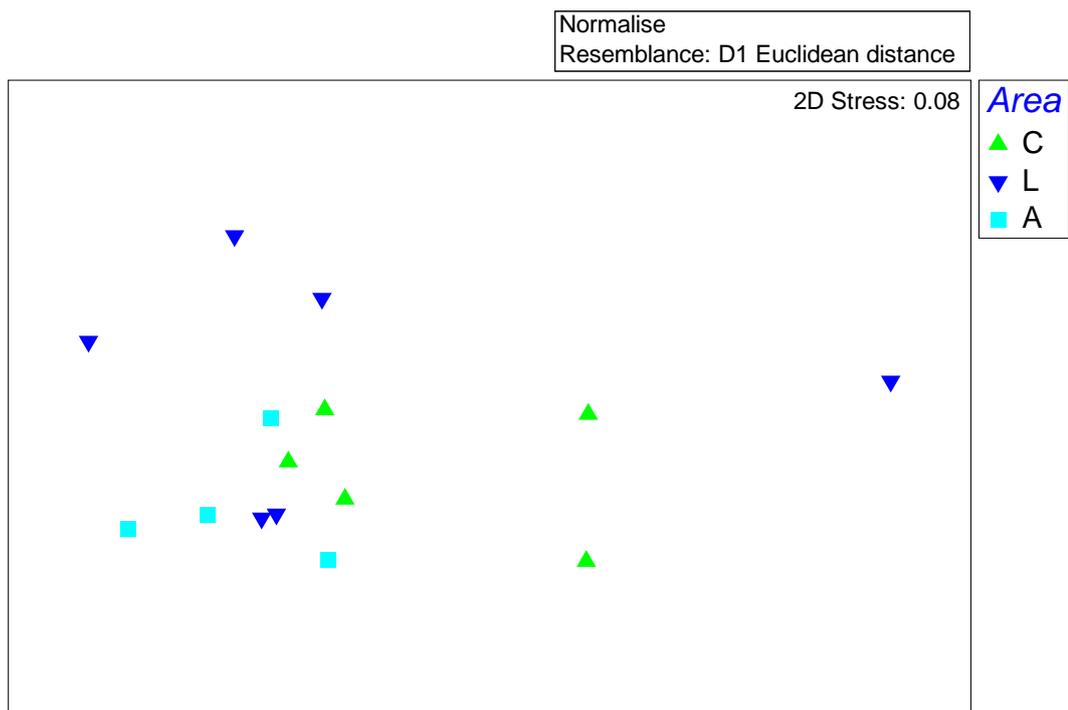


Fig. 52 – nMDS basato sulle distanze eucldee normalizzate dei valori delle concentrazioni degli IPA nelle acque di Cala, Licata ed Acquisanta.

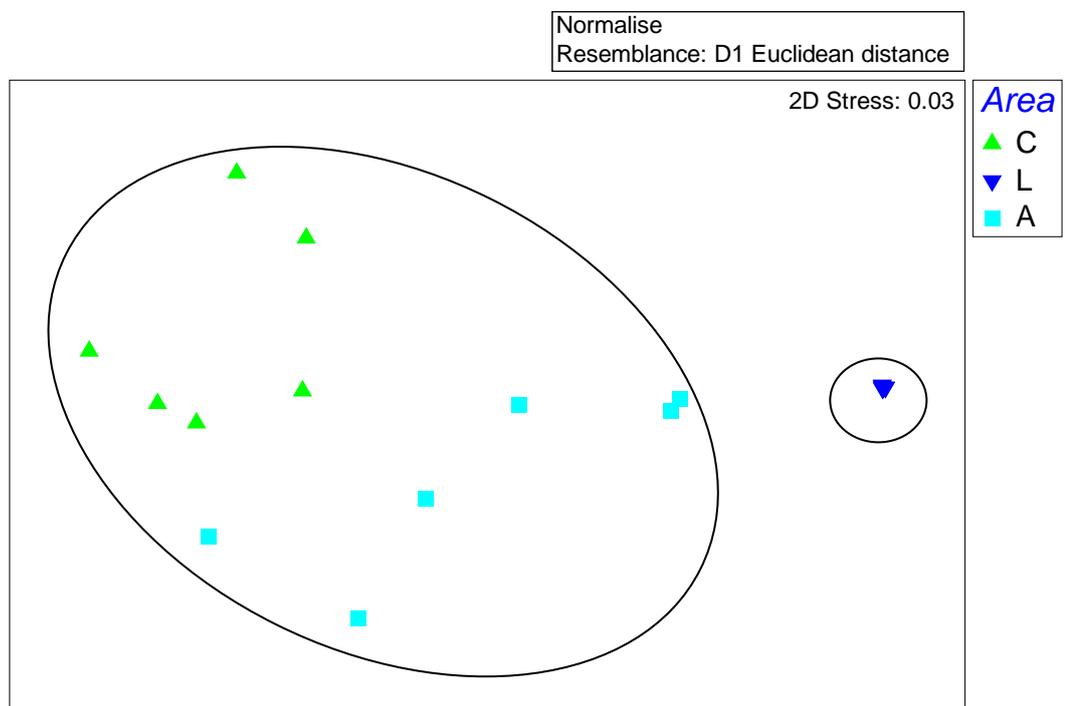


Fig. 53 – nMDS basato sulle distanze eucldee normalizzate dei valori delle concentrazioni degli IPA nei sedimenti di Cala (C), Licata (L) e Acquisanta (A).

4.2.5 - Metalli pesanti

Le medie delle concentrazioni di metalli pesanti (mg/Kg p.s.±ds) nei sedimenti delle tre aree portuali (Cala, Licata e Acquisanta) sono riportate nella tabella 25.

Tabella 25 - Medie delle concentrazioni di metalli pesanti (mg/Kg p.s.±ds) nei sedimenti delle tre aree portuali.

	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg	As	V
Cala t₀	0,3	47	182	32	93	359	0,8	11	21
ds	0,03	17	26	11	19	51	0,4	7	2
Cala t₁	0,3	45	178	28	94	474	1	10	20
ds	0,07	15	25	8	19	178	0,2	5	3
Licata t₀	0,1	19	9	30	5	28	0,03	14	26
ds	0,01	4	1	1	2	4	0,01	4	5
Licata t₁	0,1	21	9	27	6	27	0,04	12	25
ds	0,04	5	2	5	2	5	0,03	3	9
Acquisanta t₀	0,1	9	33	17	15	61	0,3	6	12
ds	0,02	2	8	3	7	17	0,1	4	5
Acquisanta t₁	0,1	7	29	16	12	51	0,4	6	11
ds	0,03	3	9	4	7	20	0,2	3	7

In generale, come si può osservare dalle figure 54, 55 e 56 i sedimenti dell'area portuale Cala risultano avere concentrazioni significativamente più elevate di Cr, Cu, Pb, Zn, Cd e Hg rispetto a quelle dei siti Licata e Acquisanta, probabilmente perché il sito Cala si trova vicino al centro urbano di Palermo, e per anni è stato utilizzato per lo sversamento delle acque reflue (non trattate) di parte della città.

Le concentrazioni di Ni, As e V dei siti Cala e Licata non si discostano molto tra loro, ma risultano leggermente più elevate rispetto al sito Acquisanta. La concentrazione del Cr è maggiore a Licata rispetto ad Acquisanta. Invece, le concentrazioni di Cu, Pb, Zn, Cd e Hg sono confrontabili nei siti di Licata e Acquisanta. Quindi le differenze nelle concentrazioni di metalli pesanti risultano più marcate tra il sito Cala e gli altri due siti portuali. Inoltre, non viene riscontrata nessuna variabilità temporale per ciascun sito: questo probabilmente è imputabile alla stabilità dei metalli all'interno dei sedimenti che, nonostante il ricambio idrologico che favorisce la risospensione dei sedimenti e quindi dei contaminanti in essi presenti, permangono alle stesse concentrazioni in equilibrio dinamico tra acque e sedimento.

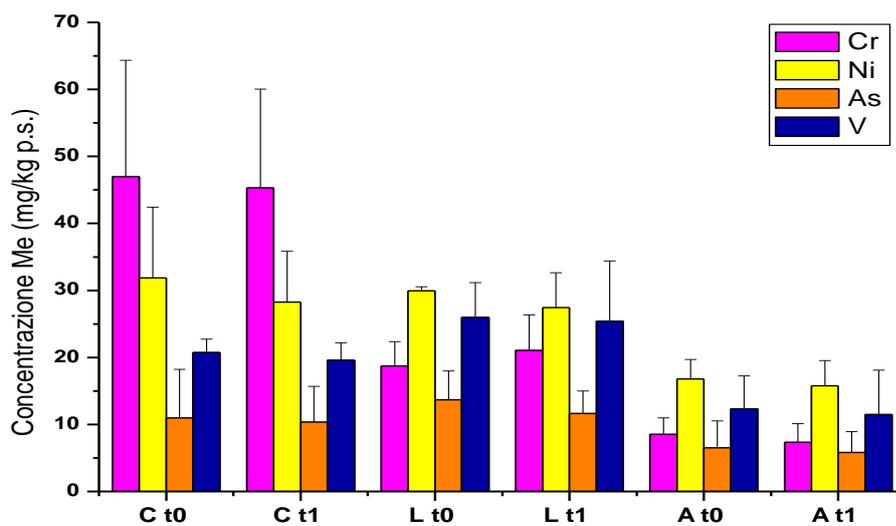


Fig. 54 - Concentrazioni di Cr, Ni, As e V (mg/Kg p.s.±ds) nei sedimenti di Cala (Ct₀ e Ct₁), Licata (Lt₀ e Lt₁) e Acquisanta (At₀ e At₁) ai tempi t₀ e t₁.

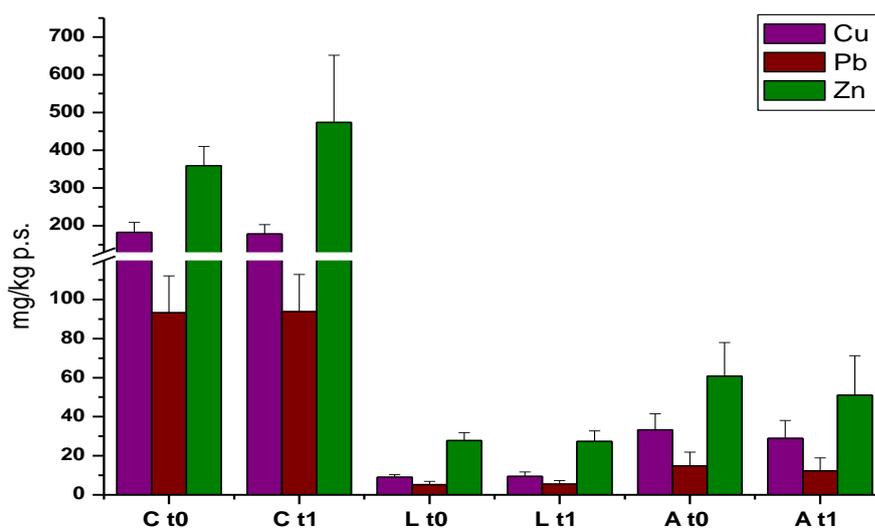


Fig. 55 - Concentrazioni di Cu, Pb e Zn (mg/Kg p.s.±ds) nei sedimenti di Cala (Ct₀ e Ct₁), Licata (Lt₀ e Lt₁) e Acquisanta (At₀ e At₁) ai tempi t₀ e t₁.

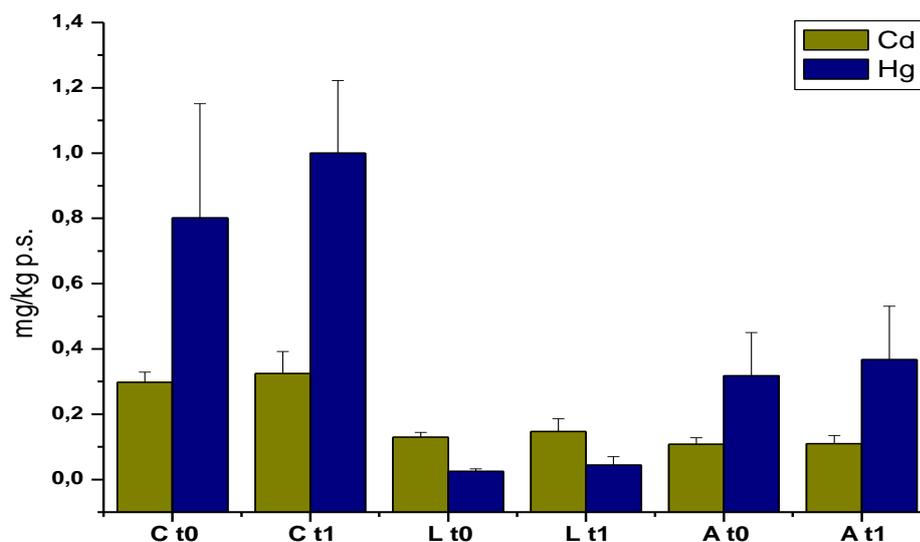


Fig. 56 - Concentrazioni di Cd e Hg (mg/Kg p.s.±ds) nei sedimenti di Cala (Ct₀ e Ct₁), Licata (Lt₀ e Lt₁) e Acquasanta (At₀ e At₁) ai tempi t₀ e t₁.

Nella tabella 26 sono riportati i dati di letteratura che riguardano la concentrazione media dei metalli pesanti (mg/kg p.s.) nei sedimenti in diverse aree portuali del mondo.

Paragonando i dati di letteratura con quelli dei sedimenti dei tre siti siciliani, risulta che l'area portuale di Cala, che nel presente studio è quella che presenta la maggiore concentrazione di metalli pesanti tra i siti studiati, non presenta caratteristiche di contaminazione da metalli pesanti di grande rilevanza rispetto alle altre aree portuali del mondo.

Come riportato in letteratura, per valutare con maggior chiarezza la qualità delle aree studiate ed in particolare per distinguere l'apporto antropico di metalli da quello litogenico naturale, ci si è avvalsi dell'ausilio di due indici:

1. il fattore di arricchimento (**EF**),
2. l'indice di inquinamento dei sedimenti (**SPI**).

Tabella 26 - Confronto delle concentrazioni medie di metalli pesanti (mg/kg p.s.) nei sedimenti di diverse parti del mondo.

Elem.	Porto di Napoli ^f	Porto turistico di Cala, Palermo ^g	Porto turistico di Cala, Palermo ^h	Porto turistico di Viareggio ⁱ	Porto di Ceuta, Spagna ^l	Porto di Barcellona, Spagna ^m	Porto di Bergen, Norvegia ⁿ	Porto di Montevideo, Uruguay ^o	Porto di Kaohsiung, Taiwan ^p	Porto di Elizabeth sud-Africa ^q
Cd	0,01-3	0,3	-	0,1-4,4	-	0,4-1,4	-	1-1,6	0,1-6,8	-
Cr	7-1798	47	33,2-70	86-320	13-381	45-95	-	79-253	0,2-900	-
Cu	12-5743	182	72,2-698	7-293	5-865	70-195	24-1090	58-135	5-946	9-82
Ni	4-362	32	-	-	-	18-27	-	-	-	-
Pb	19-3083	93	41,4-220	22-382	10-516	85-130	24-1920	44-128	9,5-470	9-62
Zn	17-7634	359	187-752	31-1093	29-695	180-300	46-2900	174-491	52-1369	19-126
Hg	0,01-139	0,8	0,52-2	-	-	-	-	0,6-1,3	0,1-8,5	-
As	1-112	11	-	-	-	-	-	-	-	-
V	37-2114	21	-	-	-	-	-	-	-	-

^f (Sprovieri *et al.*, 2007)

^g (presente studio)

^h (Tranchina *et al.*, 2008)

ⁱ (Pellegrini *et al.*, 1999)

^l (Guerra-García e García-Gomez, 2005)

^m (Guevara-Riba *et al.*, 2004)

ⁿ (Paetzel *et al.*, 2003)

^o (Muniz *et al.*, 2004)

^p (Chen *et al.*, 2007)

^q (Fatoki e Mathabatha, 2001)

4.2.5 a - Fattore di arricchimento

Il fattore di arricchimento (**EF**) mette in relazione la quantità di metallo presente nel sedimento con quella del relativo *background* naturale, al fine di distinguere il contributo antropico dagli apporti naturali (litogenici) (Schloesser, 1988).

Come valori di concentrazioni di *background* naturale (valori sottolineati in verde nella tabella 27), sono stati utilizzati quelli che si riferiscono ad aree geografiche più vicine possibili alle aree portuali oggetto di studio di questa ricerca, prendendo in considerazione i dati analitici della stazione “meno contaminata” (Tranchina *et al.*, 2007), e quelli riportati da Turekian e Wedepohl (1961) riguardanti il livello di metalli nella crosta terrestre che mostrano le concentrazioni standard di base, generalmente usate come riferimento per sedimenti non contaminati.

A titolo di paragone, nella tabella 27 riporto i valori di *background* naturale risultanti dai valori di Turekian e Wedepohl (1961), Donazzolo *et al.*, 1981, Karageorgis *et al.*, 1998, F. Ruiz Muñoz *et al.*, 1997, Tranchina *et al.*, 2008, Sprovieri *et al.*, 2007 (espressi in mg/kg p.s.).

Tabella 27 - Confronto delle concentrazione medie di *background* di metalli pesanti (mg/kg) in diversi siti.

Elem.	Background ^a	Golfo di Venezia ^b	Baia di Milos (Grecia) ^c	Costa Atlantica spagnola ^d	Nord-est Golfo di Palermo ^e	Golfo di Termini (Pa) ^f
Cd	<u>0,3</u>	-	-	1	-	-
Cr	90	18	119	17	<u>21,5</u>	38,8
Cu	45	17	51	21	<u>21,15</u>	24,8
Ni	<u>68</u>	28	61	5	-	-
Pb	20	38	151	24	<u>23,23</u>	22,4
Zn	95	60	325	206	<u>64,46</u>	108,2
Hg	-	-	-	-	<u>0,12</u>	0,08
As	<u>1,8</u>	-	-	30	-	-
V	<u>110</u>				-	-

^a (Turekian e Wedepohl, 1961), ^b (Donazzolo *et al.*, 1981), ^c (Karageorgis *et al.*, 1998), ^d (Ruiz Muñoz *et al.*, 1997), ^{e, f} (Tranchina *et al.*, 2007).

La formula per il calcolo del fattore di arricchimento è la seguente:

$$EF = \frac{[M]_{SP}}{[M]_B}$$

dove $[M]_{SP}$ indica la concentrazione del metallo determinato sperimentalmente nella matrice considerata e $[M]_B$ la concentrazione dello stesso metallo nella crosta terrestre (*shale background*).

I sedimenti del sito Cala sono quelli maggiormente influenzati dal contributo antropico (valori di $EF > 1$), mentre i siti Licata e Acquasanta non risentono delle attività umane, tranne per quanto riguarda l'arsenico a Licata e ad Acquasanta (tabella 28) (figura 57).

Tabella 28 - Indice EF per i sedimenti di Cala, Licata e Acquasanta

	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg	As	V
CALA	1,038	2,147	8,517	0,442	4,024	6,461	7,506	5,929	0,183
LICATA	0,698	0,426	0,930	0,339	0,148	0,675	0,143	5,536	0,233
ACQUASANTA	0,362	0,369	1,470	0,240	0,584	0,867	2,853	3,422	0,108

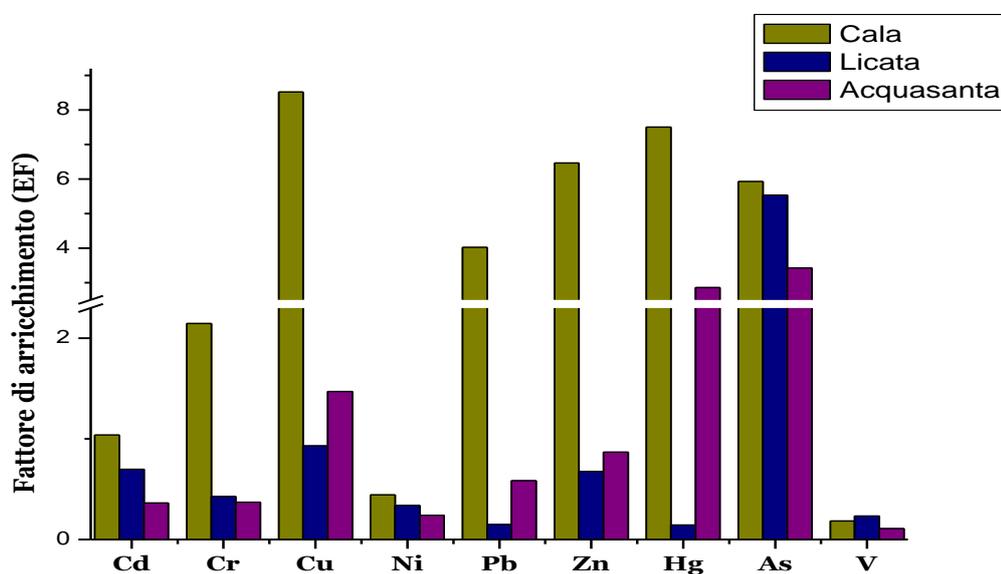


Fig. 57 - Indice EF per i sedimenti di Cala, Licata e Acquasanta

Inoltre, per evidenziare facilmente l'apporto antropico di ciascuno degli elementi (Greenwood e Earnshaw, 1985), è stata considerata la correlazione tra i valori logaritmici

delle concentrazioni dei metalli pesanti nei sedimenti di ciascuno dei siti oggetto di studio e le concentrazioni naturali presenti nella crosta terrestre.

Come si può osservare in figura 58 nel sito Cala gli elementi al di sopra delle concentrazioni naturali sono Cr, Cu, Pb, Zn, As e Hg, mentre quelli al di sotto sono Ni e V. La concentrazione del Cd coincide quasi con quella naturale.

In generale, gli elementi al di sopra o al di sotto della linea di base non si discostano molto dalla concentrazione naturale.

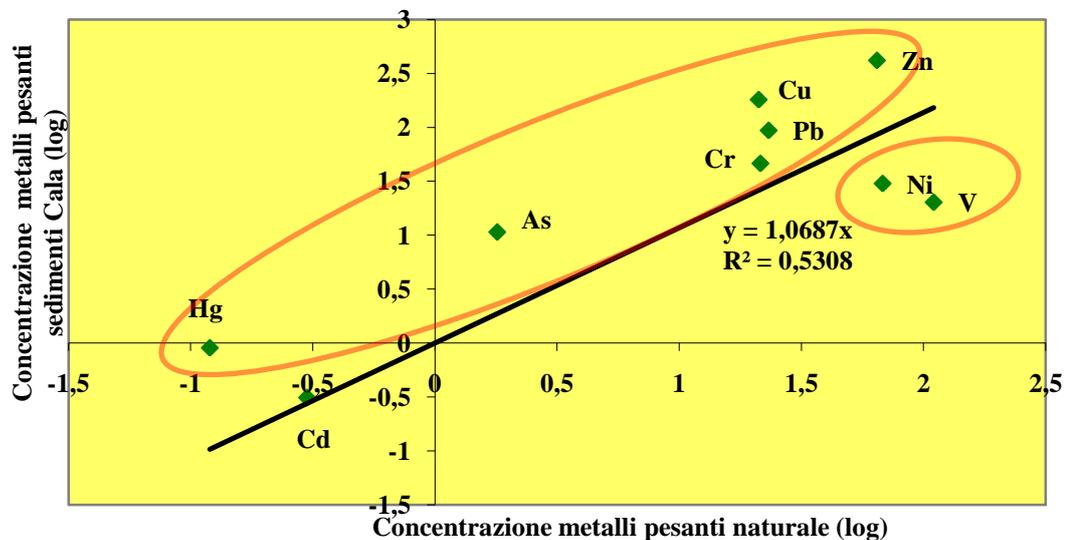


Fig. 58 - Correlazione tra le concentrazioni dei metalli pesanti nei sedimenti di Cala e la concentrazione naturale presente nella crosta terrestre.

Nel sito Licata gli elementi al di sopra delle concentrazioni naturali sono Cu, Zn e As, invece quelli al di sotto sono Pb, V, Cd e Hg. Le concentrazioni di Cr e Ni coincidono con quella naturale (figura 59).

Infine, nel sito Acquisanta gli elementi al di sopra delle concentrazioni naturali sono Cu, Zn, As e Hg, mentre quelle al di sotto sono Cr, Ni, V e Cd. La concentrazione del Pb si avvicina molto a quella naturale (figura 60).

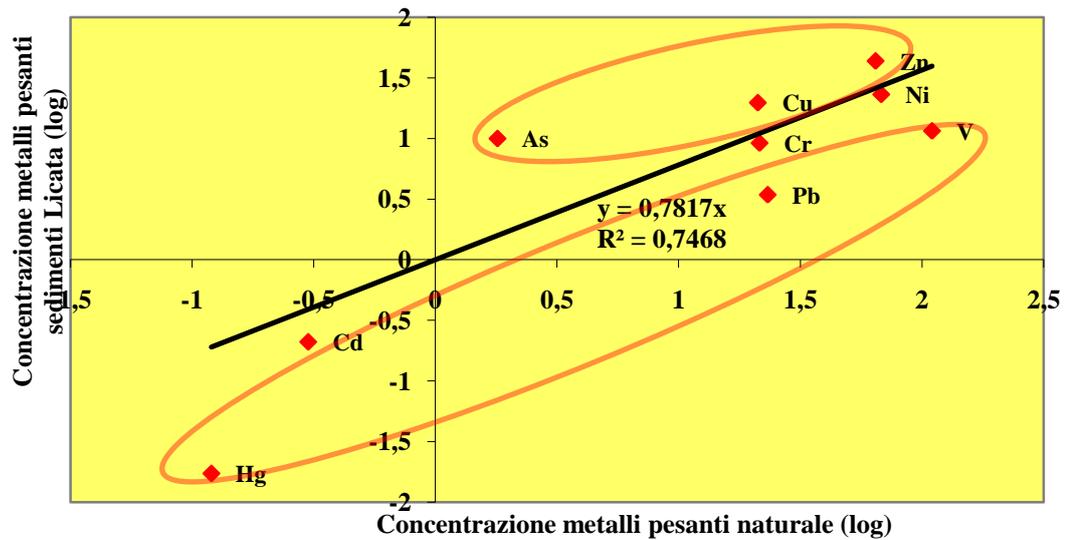


Fig. 59 - Correlazione tra le concentrazioni dei metalli pesanti nei sedimenti di Licata e la concentrazione naturale presente nella crosta terrestre.

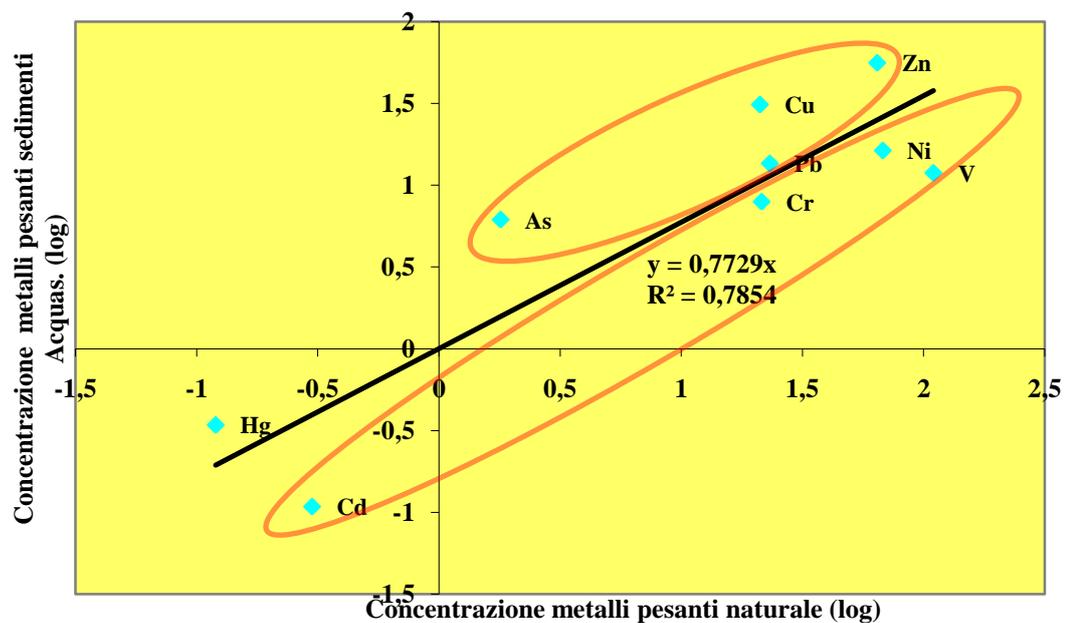


Fig. 60 - Correlazione tra le concentrazioni dei metalli pesanti nei sedimenti di Acquasanta e la concentrazione naturale presente nella crosta terrestre.

Per valutare gli eventuali effetti tossicologici sugli organismi che vivono nelle aree studiate sono stati presi in considerazione i valori del NOAA ER-L (*effects range low*) e ER-M (*effects range median*) (Long et al., 1995; Ligerio et al., 2002): la maggior parte dei metalli pesanti riscontrati nei sedimenti del golfo di Cala risultano inferiori al livello ER-M.

4.2.5 b - Sediment Pollution Index (SPI)

Il *Sediment Pollution Index (SPI)*, è un indice che permette un approccio multi elementare, poichè considera le concentrazioni della maggior parte dei metalli d'interesse tossicologico.

L'indice è definito come la somma dei fattori di arricchimento tenuto conto dei fattori di tossicità. Questi ultimi sono basati sulle tossicità relative dei differenti metalli e sono inversamente proporzionali alle concentrazioni litogeniche. Fattori pari ad 1 sono assegnati a Cr e Zn, 2 per Ni e Cu, 5 per Pb, 300 per Cd e 400 per il V.

Il valore SPI può essere espresso come segue:

$$SPI = \frac{\sum (EF_m \cdot W_m)}{\sum W_m}$$

dove EF_m indica il rapporto fra la concentrazione media di un dato metallo nella matrice considerata e la concentrazione dello *shale* dello stesso (fattore di arricchimento); W indica il fattore di tossicità del metallo m (valore di letteratura).

Il *Sediment pollution index* consente di classificare i sedimenti in cinque classi (SPI0-SPI4) riportate nella tabella 29.

Tabella 29 - Classificazione e descrizione dei sedimenti attraverso l'indice SPI

<i>classificazione</i>	<i>intervallo di SPI</i>	<i>descrizione sedimento</i>
SPI0	0-2	sedimento naturale
SPI1	2-5	sedimento debolmente inquinato
SPI2	5-10	sedimento moderatamente inquinato
SPI3	10-20	sedimento altamente inquinato
SPI4	>20	sedimento pericolosamente inquinato

Il valore medio dell'indice di inquinamento dei sedimenti SPI studiati è 0,4, con un valore a Cala di 0.607, a Licata di 0.432 e ad Acquasanta di 0.224 (figura 61). Tale valore, secondo il criterio di classificazione, di cui sopra, è caratteristico dei sedimenti naturali. Il sito Cala, anche se presenta una concentrazione maggiore in metalli pesanti rispetto agli altri due siti, sulla base di questo approccio risulta naturale.

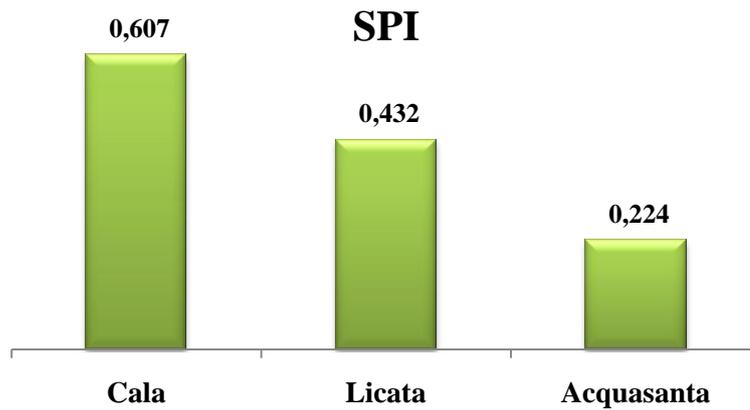


Fig. 61 - Indice SPI per i sedimenti di Cala, Licata e Acquisanta.

4.2.5 c - Analisi multivariata nMDS

Con l'analisi multivariata con l'ordinamento nMDS (figura 62) è stato possibile approfondire le dinamiche spaziali relative alla concentrazione di metalli pesanti nei sedimenti di Cala, Licata ed Acquisanta. In particolare l'nMDS dei sedimenti ha messo in luce, anche in questo caso, le evidenti differenze spaziali tra il sito Cala e gli altri due siti Licata ed Acquisanta.

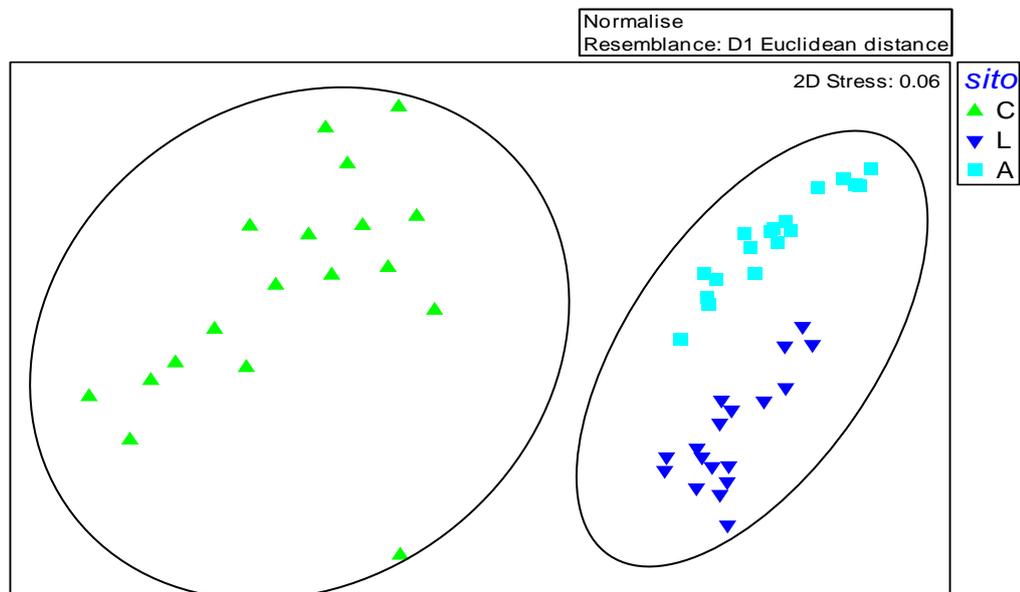


Fig. 62 – nMDS basato sulle distanze eucleree normalizzate dei valori delle concentrazioni dei metalli pesanti nei tre siti Cala (C), Licata (L) e Acquisanta (A).

4.3 - Analisi multivariata su tutte le variabili della colonna d'acqua e dei sedimenti

L'analisi multivariata nMDS (figure 63 e 64) basata sulle distanze euclidee normalizzate dei valori di tutte le variabili ambientali studiate nei tre siti Cala, Licata ed Acquasanta, ha permesso di ottenere dei grafici bidimensionali, dove i diversi punti rappresentano i siti di campionamento all'interno delle tre aree studiate, favorendo così lo studio delle dinamiche spaziali e temporali delle proprietà chimico-fisiche delle acque e dei sedimenti.

In particolare l'nMDS dei sedimenti ha messo in luce, le evidenti differenze spaziali tra il sito Cala e gli altri due siti Licata ed Acquasanta. Differenze temporali poco significative sono state riscontrate all'interno di ciascun sito.

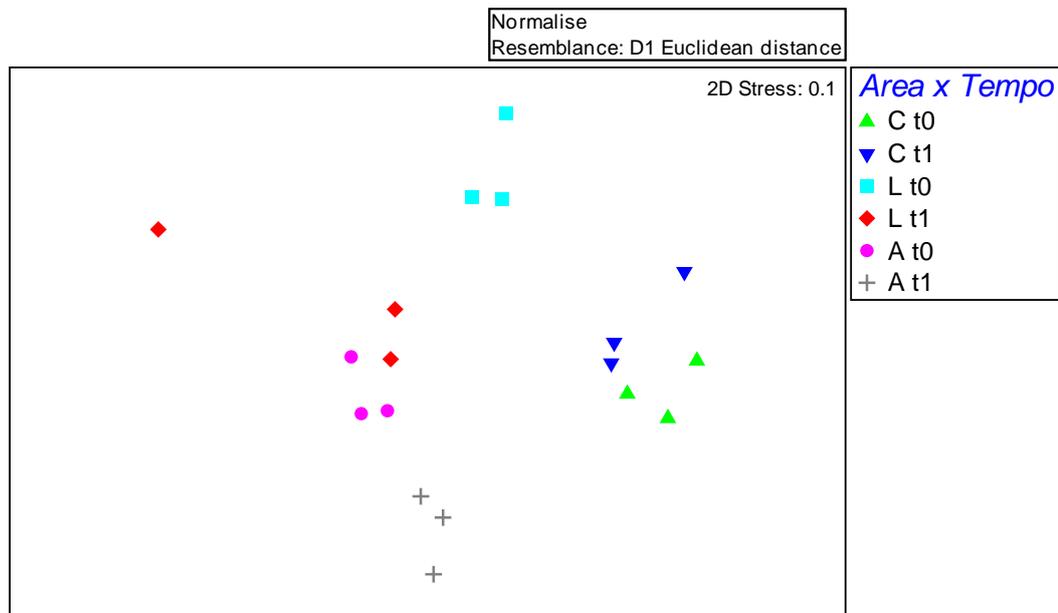


Fig. 63 – nMDS basato sulle distanze euclidee normalizzate dei valori di tutte le variabili studiate nei tre siti Cala (C_{t_0} e C_{t_1}), Licata (L_{t_0} e L_{t_1}) ed Acquasanta (A_{t_0} e A_{t_1}) relativamente al comparto della colonna d'acqua, ai tempi t_0 e t_1 .

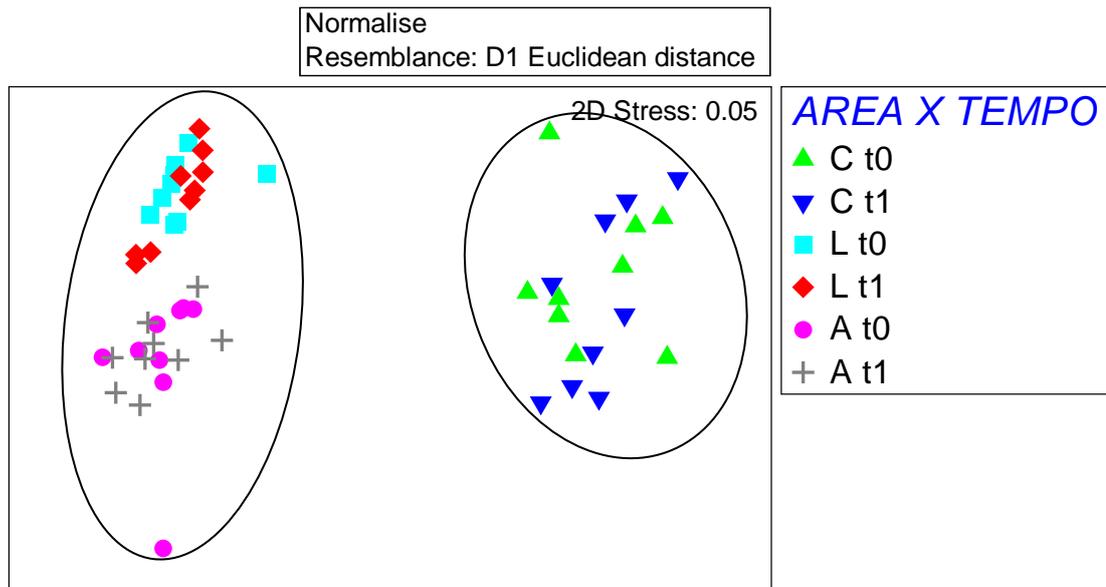


Fig. 64 – nMDS basato sulle distanze euclidee normalizzate dei valori di tutte le variabili studiate nei tre siti Cala (Ct₀ e Ct₁), Licata (Lt₀ e Lt₁) ed Acquisanta (At₀ e At₁) relativamente al comparto dei sedimenti colonna d'acqua, ai tempi t₀ e t₁.

4.4 - Idrocarburi policiclici aromatici in *Sabella spallanzanii*

4.4.1 – Tubi

Le concentrazioni dei singoli IPA e quelle totali nei tubi dei gruppi controllo e trapiantati di *S. spallanzanii*, sono riportate in tabella 30 e si riferiscono alla media di tre determinazioni. Considerando i singoli analiti, le deviazioni standard calcolate sui dati di uno stesso sito variano dal 4% al 18% per i tubi di Cala, dal 10% al 28% per i tubi di Licata e dall'8% al 18% per quelli di Acquisanta.

Nei campioni di tubo le concentrazioni totali di IPA variano da 501 $\mu\text{g/Kg}$ p.s. a 20304 $\mu\text{g/Kg}$ p.s. (figura 65). Le concentrazioni, in accordo con quanto riscontrato nella caratterizzazione ambientale, sono risultate maggiori nei tubi degli organismi di Cala, mentre quelle più basse in quelli di Licata ed Acquisanta.

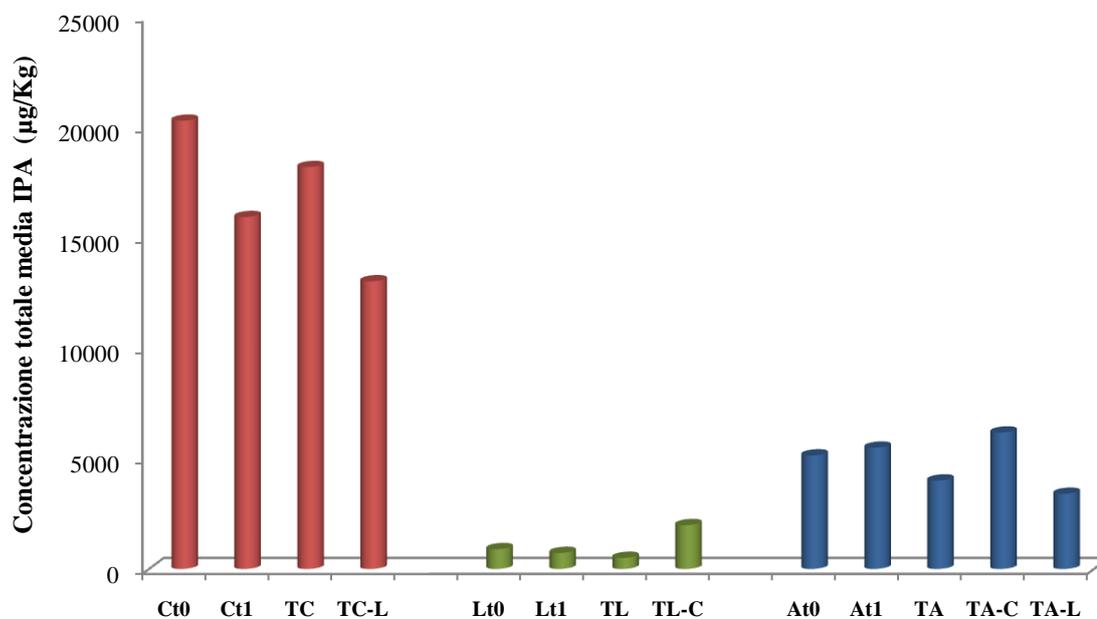


Fig. 65 – Concentrazioni totale di IPA ($\mu\text{g/Kg}$ p.s.) nei campioni di tubo di *S. spallanzanii*.

Tabella 30 – Concentrazioni dei singoli IPA e totale ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ p.s.) nei campioni di tubo di *S. spallanzanii*.

	Acen	Ace	Flu	Fen	Ant	Fluor	Pir	B(a)A	Cri	B(b)F	B(k)F	B(e)P	B(a)P	Per	I(cd)P	D(ah)A	B(ghi)P	Σ IPA
Ct0	105	48	44	819	273	2610	3325	919	1293	2804	1086	1015	1726	609	1676	580	1371	20304
Ct1	95	40	33	521	205	1717	2191	641	969	2327	828	917	1496	393	1551	474	1541	15940
TC	134	62	52	625	219	1991	2412	778	1104	2809	1078	1082	1813	467	1584	423	1571	18205
TC-L	84	38	32	433	159	1556	1876	594	871	2030	776	764	1309	257	948	364	939	13030
Lt0	5	4	5	95	15	96	113	23	34	62	20	26	49	23	164	< LOQ	164	898
Lt1	5	4	5	82	12	86	96	21	33	53	19	21	41	24	125	< LOQ	99	726
TL	3	3	3	84	10	92	99	20	33	41	13	16	28	20	< LOQ	< LOQ	36	501
TL-C	15	10	10	106	26	154	182	44	69	182	61	92	165	46	425	< LOQ	396	1984
At0	12	8	4	212	47	738	779	212	315	645	253	213	417	102	965	< LOQ	220	5140
At1	14	8	5	246	53	846	885	238	310	659	265	273	420	106	908	< LOQ	258	5493
TA	7	5	3	167	35	496	523	146	213	503	190	175	350	84	853	< LOQ	254	4004
TA-C	16	11	7	239	48	834	844	222	325	670	265	308	444	111	1521	< LOQ	312	6178
TA-L	10	7	5	169	36	574	587	194	276	567	228	191	355	65	0	< LOQ	142	3405

Per quanto riguarda l'esperimento di *transplant*ing Cala-Licata, come è possibile osservare in figura 63, la concentrazione totale di IPA nei tubi dei gruppi controllo Ct₁ e TC varia rispettivamente del 10% e 21% rispetto al controllo Ct₀. Nei tubi del gruppo TC-L (*transplant*) si verifica una diminuzione della concentrazione totale di IPA del 28% rispetto al controllo TC.

Durante l'esperimento di *transplant*ing Licata-Cala, la concentrazione totale di IPA nei tubi dei gruppi controllo Lt₁ e TL varia rispettivamente del 19% e 44% rispetto al controllo Lt₀. Nei tubi del gruppo TL-C si verifica un aumento della concentrazione totale di IPA del 74% rispetto al controllo TL.

Infine, per quanto concerne l'esperimento di *transplant*ing Acquasanta-Cala/Acquasanta-Licata, la concentrazione totale di IPA nei tubi dei gruppi controllo At₁ e TA varia rispettivamente del 7% e 22% rispetto al controllo At₀. Nei tubi dei gruppi TA-C e TA-L si verificano rispettivamente un aumento del 54% e una diminuzione del 15% rispetto al controllo TA.

Nella figura 66 sono riportate le distribuzioni percentuali dei singoli IPA presenti nelle acque, nei tubi dei policheti e nei sedimenti. Nella maggior parte dei campioni di tubo prevalgono gli stessi composti presenti nei sedimenti (fluorantene, benzo[b]fluorantene e pirene).

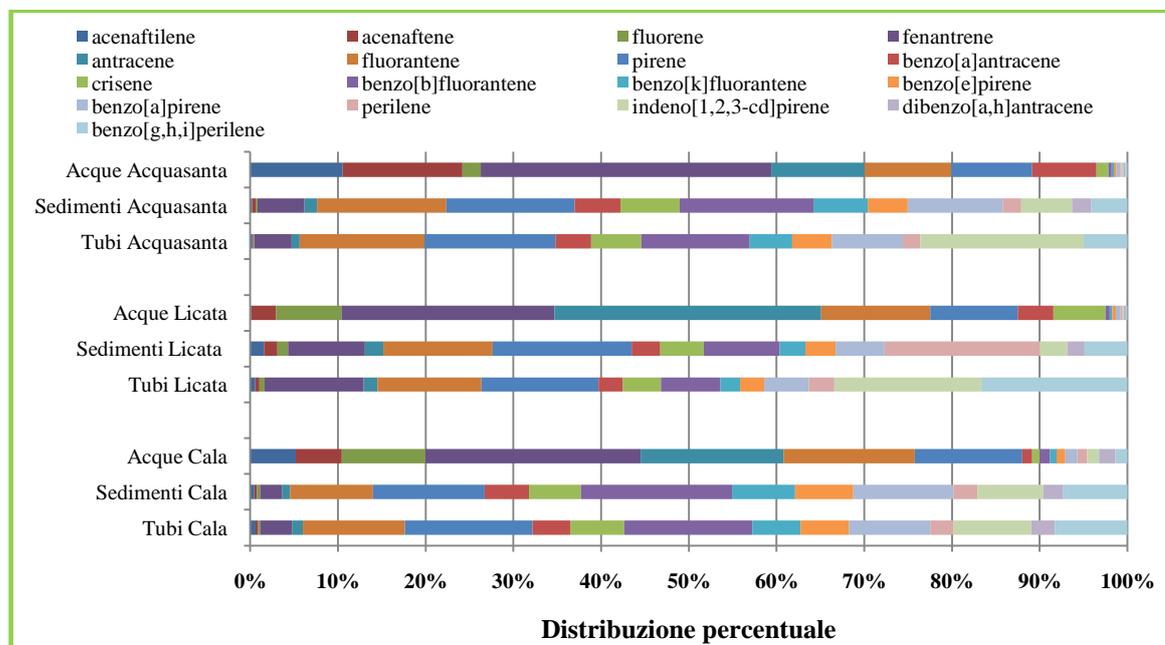


Fig. 64 - Distribuzione percentuale degli IPA nei campioni di acqua, sedimento e tubo di *S. spallanzanii*.

In generale, l'andamento è migliore per gli analiti con un minor numero di anelli (3-4 anelli). Nella figura 67 sono riportate le distribuzioni percentuali dei singoli IPA nei tubi dei policheti relative agli esperimenti di *transplanting*: nei tubi degli organismi trapiantati a Cala (TL-C e TA-C) aumentano le concentrazioni di tutti gli analiti, invece nei tubi degli organismi trapiantati a Licata (TC-L e TA-L) diminuiscono le loro concentrazioni.

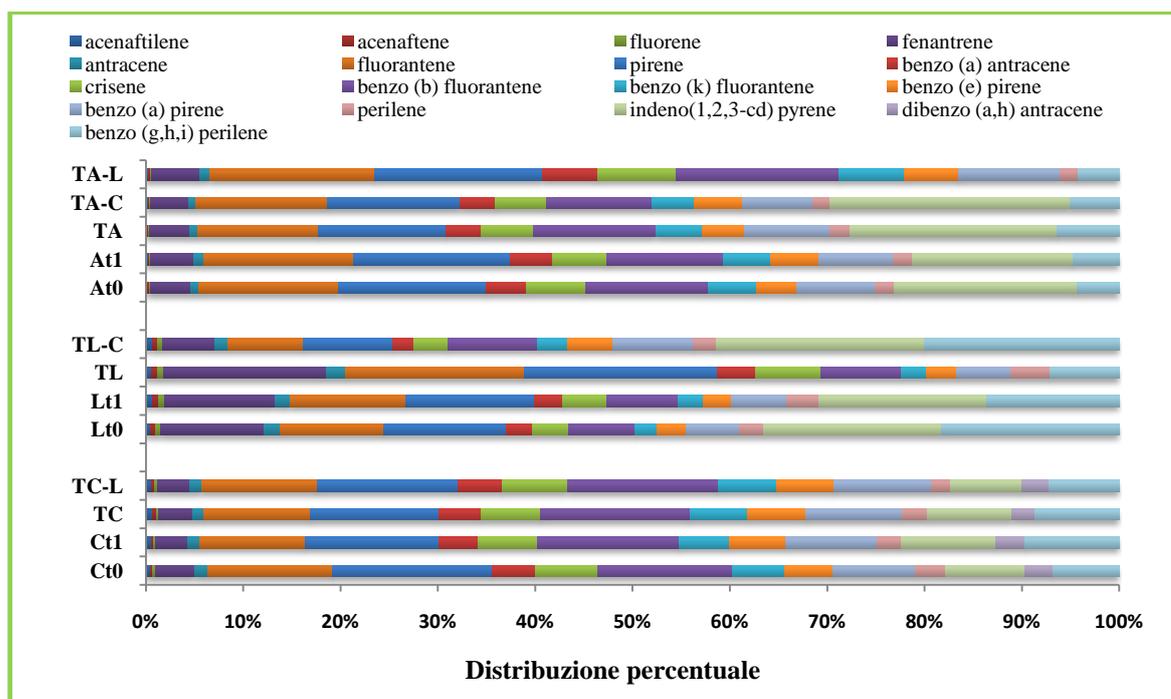


Fig. 67 - Distribuzione percentuale degli IPA nei campioni di tubo di *S. spallanzanii*.

4.4.1 a - Fonti di IPA nei tubi dei policheti

La solubilità in acqua degli IPA diminuisce con l'aumentare del coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (K_{ow}). In pratica, la solubilità degli IPA diminuisce all'aumentare del peso molecolare, quindi, in virtù di ciò, le soluzioni acquose contengono concentrazioni maggiori dei composti aromatici a basso peso molecolare, mentre quelli che hanno peso molecolare più elevato vengono adsorbiti dalle particelle di sedimento oppure associati alle particelle in sospensione nelle acque.

Per verificare quanto ipotizzato, ho provato a individuare, per ogni sito, l'eventuale esistenza di correlazioni tra le concentrazioni dei singoli analiti nelle acque e quelle nei tubi, ma i coefficienti di correlazione sono risultati insoddisfacenti. Tale andamento è da attribuire al fatto che le concentrazioni dei singoli IPA nelle acque sono molto basse, spesso simili al limite di quantificazione, e inoltre, influenzate dalle dinamiche marine e quindi

dalla situazione al momento del campionamento che potrebbe non essere rappresentativa di quella dei policheti durante la loro crescita.

Poiché i sedimenti tendono ad accumulare gli IPA originariamente presenti nelle acque, è stata ipotizzata l'esistenza di correlazioni tra le concentrazioni dei singoli analiti nei sedimenti e quelle nei tubi. Come si vede dalla figura 68, riportata a titolo di esempio, esiste una buona correlazione solo per i siti Cala e Acquasanta tra le concentrazioni degli analiti nei sedimenti e quelle nei tubi (considerando la media delle analisi effettuate nel periodo di studio). I valori dei coefficienti di correlazione per i tre siti sono rispettivamente $r = 0,96$ per il sito Cala, $r = 0,2$ per il sito Licata ed $r = 0,81$ per il sito Acquasanta.

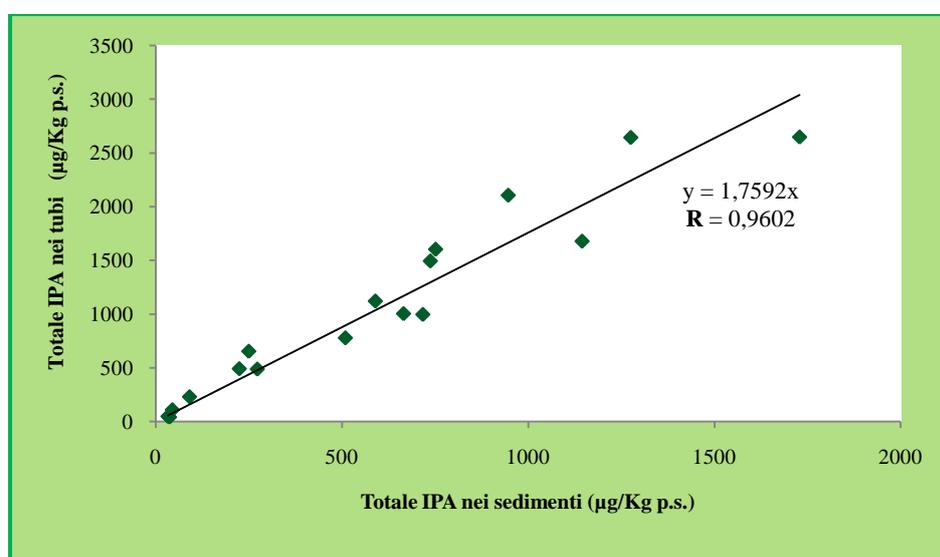


Fig. 68 – Correlazione tra le concentrazioni totali degli IPA nei sedimenti e nei tubi espresse in µg/Kg p.s.

È ragionevole pensare che nei tubi dei policheti si accumulino principalmente gli IPA a basso peso molecolare, più idrosolubili. Pertanto, sono state ripetute le correlazioni, di cui sopra, prendendo in considerazione solo gli IPA con 3 e 4 anelli, che sono quelli più solubili in acqua. I valori dei coefficienti di correlazione per i tre siti, come mostrato a titolo di esempio in figura 69, sono rispettivamente $r = 0,99$ per il sito Cala, $r = 0,97$ per il sito Licata e $r = 0,99$ per il sito Acquasanta. Pertanto le correlazioni migliorano notevolmente confermando l'ipotesi iniziale.

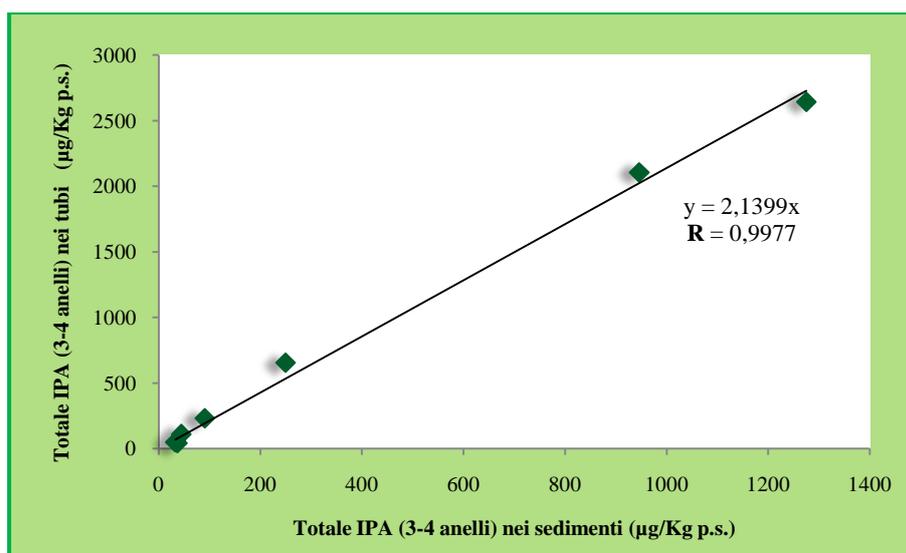


Fig. 69 – Correlazione tra le concentrazioni totali degli IPA (3-4 anelli) nei sedimenti e nei tubi ($\mu\text{g}/\text{Kg p.s.}$).

Ulteriori informazioni sull'origine degli IPA accumulati nei tubi possono ottenersi considerando i rapporti isomerici, come già detto a proposito dei sedimenti. Da tale analisi, è possibile ipotizzare l'origine pirolitica degli IPA e quella biogenica del perilene a Licata nei tubi di *S. spallanzanii* (tabella 31).

Infine, dall'osservazione della distribuzione relativa dei composti in funzione del numero di anelli (figura 70), è stato possibile evidenziare come quelli con 4 e 5 anelli aromatici contribuiscano in maniera determinante al totale degli IPA nelle acque, nei sedimenti e nei tubi confermando ulteriormente, per tutti i campioni, l'origine pirolitica degli IPA.

Tabella 31 – Indici considerati per stabilire l'origine degli IPA nei tubi di *S. spallanzanii*

	Ant/ (Ant+Fen)	Fluor/ (Fluor+Pir)	B[a]A/ (B[a]A+Cri)	I[cd]P/ (I[cd]P+B[ghi]P)	Total index	LMW/HMW	Perylene index
Ct0	0,25	0,44	0,42	0,55	7,6	0,55	0,08
Ct1	0,28	0,44	0,40	0,50	7,5	0,43	0,06
TC	0,26	0,45	0,41	0,50	7,6	0,43	0,06
TC-L	0,27	0,45	0,41	0,50	7,5	0,47	0,05
Lt0	0,14	0,46	0,41	0,50	6,9	0,59	0,13
Lt1	0,13	0,47	0,40	0,56	6,9	0,66	0,15
TL	0,10	0,48	0,37	0,56	5,4	1,42	0,17
TL-C	0,20	0,46	0,39	0,52	7,2	0,34	0,08
At0	0,18	0,49	0,40	0,81	7,8	0,54	0,06
At1	0,18	0,49	0,43	0,78	8,0	0,60	0,06
TA	0,17	0,49	0,41	0,77	7,7	0,45	0,06
TA-C	0,17	0,49	0,41	0,50	6,2	0,69	0,05
TA-L	0,17	0,50	0,41	0,83	7,8	0,48	0,06
Origine	P	P	P	P	P	P	P B (solo a Licata)

Abbreviazioni: P = origine pirolitica; PE = origine petrolifera; B = biogenesi; U = contributo scarichi urbani.

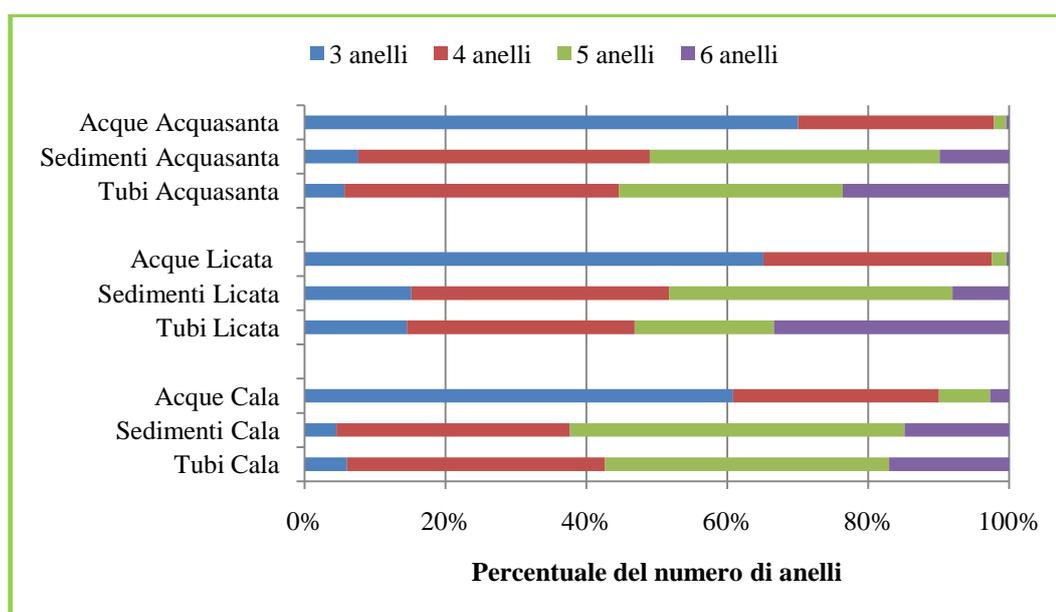


Fig. 70 – Distribuzione percentuale degli IPA, sulla base del numero di anelli, nei campioni di acqua, sedimento e tubo di *S. spallanzanii*.

In considerazione dell'esperimento di *transplanting* è stata ipotizzata anche l'esistenza di correlazioni tra le concentrazioni dei singoli IPA nei sedimenti dell'area di trapianto e quelle nei tubi degli organismi trapiantati. Anche in questo caso sono stati presi in considerazione gli analiti a basso peso molecolare.

Come si può notare dalla figura 71, esiste una buona correlazione per tutti gli organismi trapiantati TC-L, TL-C, TA-C e TA-L. I valori dei coefficienti di correlazione per i tre siti sono rispettivamente $r = 0,94$ per gli organismi di Cala trapiantati a Licata (TC-L), $r = 0,91$ per gli organismi di Licata trapiantati a Cala (TL-C), $r = 0,98$ per gli organismi di Acquisanta trapiantati a Cala (TA-C), $r = 0,94$ per gli organismi di Acquisanta trapiantati a Licata (TA-L).

Pertanto, si può affermare che gli organismi di Licata ed Acquisanta trapiantati a Cala bioaccumulano nei loro tubi gli analiti, mentre quelli di Cala trapiantati a Licata li biodiluiscono.

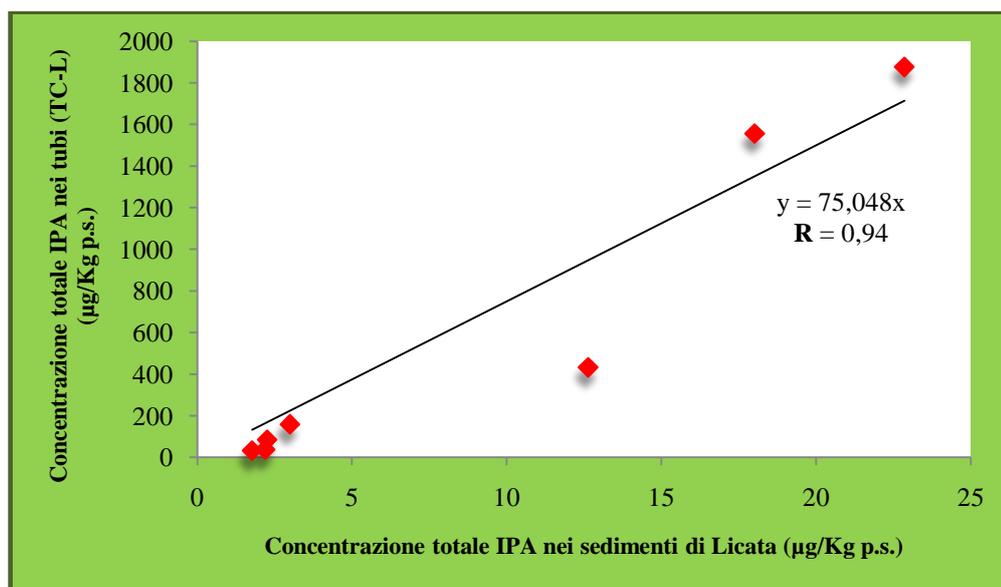


Fig. 71 – Correlazione tra le concentrazioni dei singoli IPA nei sedimenti dell'area di Licata e quelle nei tubi degli organismi trapiantati.

Per studiare la biodisponibilità e il bioaccumulo dei contaminanti è stato utilizzato il *fattore di bioaccumulo (BAF)*, che rappresenta il rapporto tra la concentrazione dell'analita nell'organismo e la concentrazione dello stesso analita nel sedimento: in questo modo si può stimare l'accumulo del contaminante nell'organismo in rapporto a quello presente nel sedimento.

Il fattore di bioaccumulo è stato calcolato per ogni idrocarburo policiclico aromatico preso in considerazione e per ciascun sito mediante l'equazione:

$$BAF = C_b / C_s$$

Come si può osservare nelle figure 72, 73, 74 i fattori di bioaccumulo sono più elevati rispetto ai rispettivi controlli C (media dei controlli Ct₀, Ct₁ e TC), L (media dei controlli Lt₀, Lt₁ e TL) ed A (media dei controlli At₀, At₁ e TA) per gli organismi trapiantati a Cala (TL-C, TA-C).

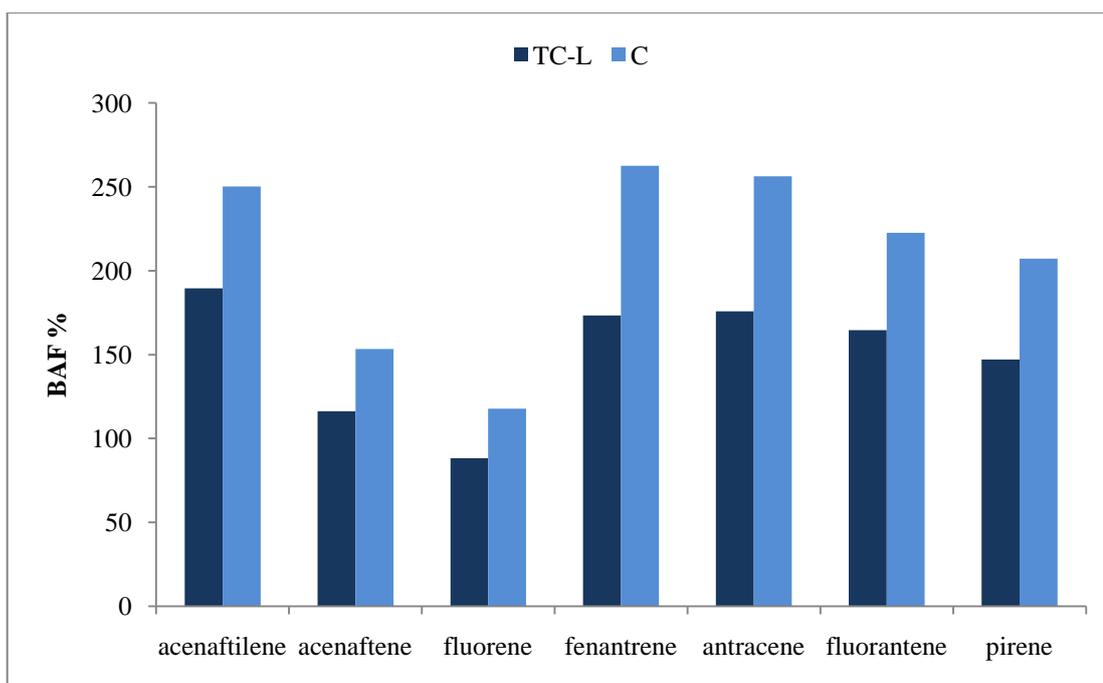


Fig. 72 - BAF % degli IPA a basso peso molecolare (3-4 anelli) dei controlli di Cala (C) e dei trapiantati da Cala a Licata (TC-L).

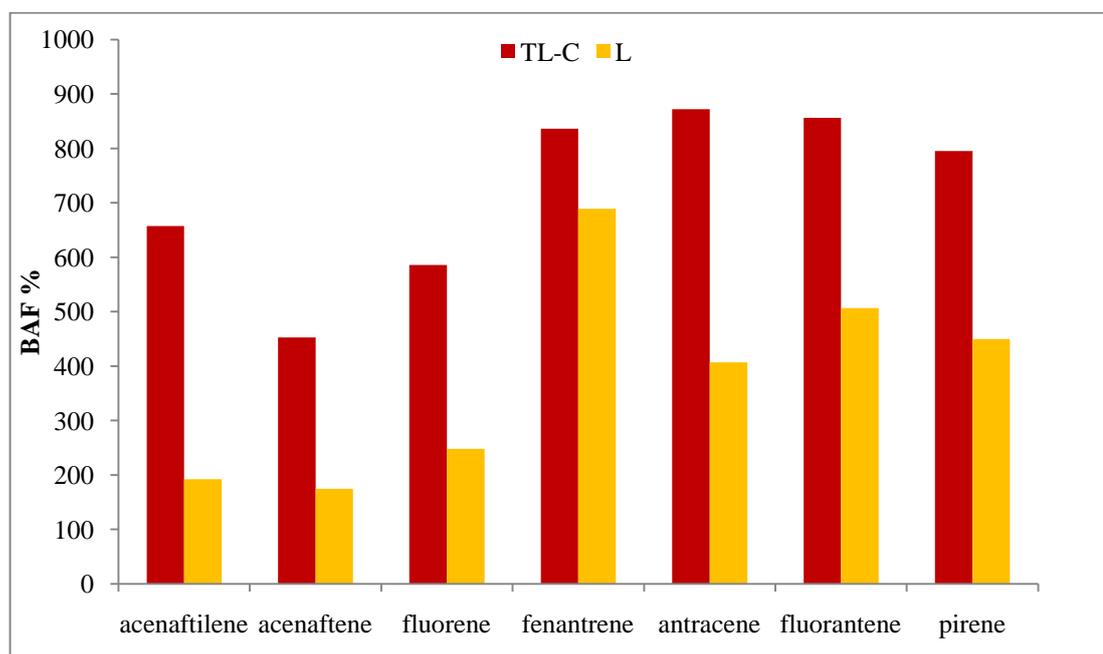


Fig. 73 - BAF % degli IPA a basso peso molecolare (3-4 anelli) dei controlli di Licata (L) e dei trapiantati da Licata a Cala (TL-C).

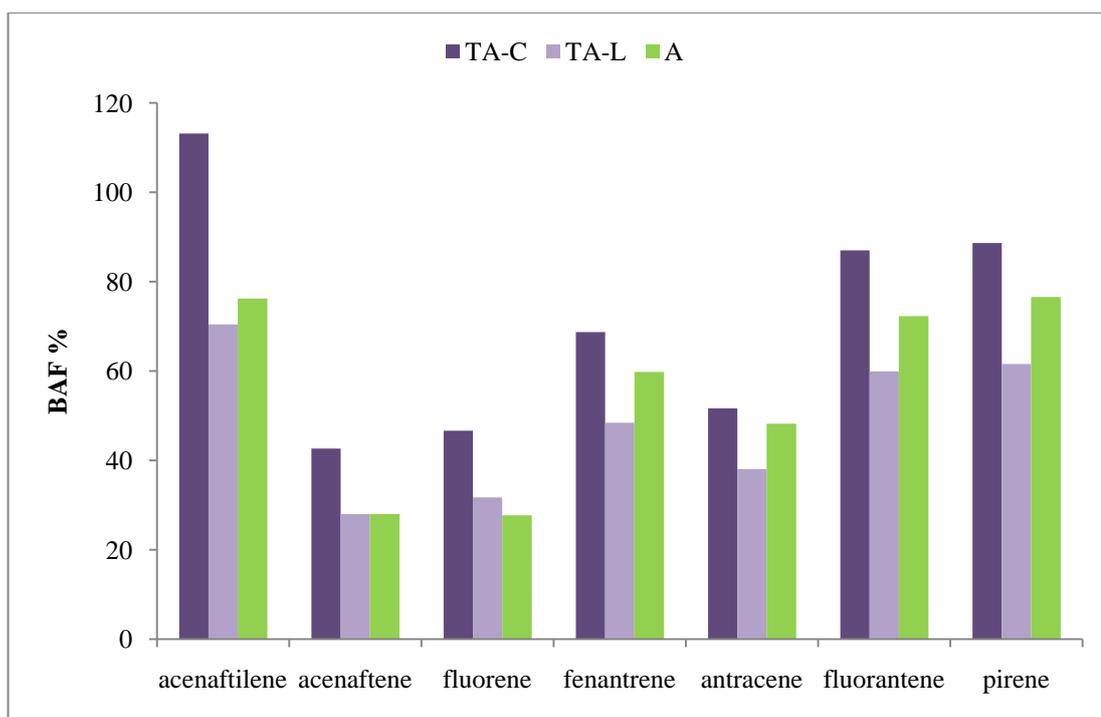


Fig. 74 - BAF % degli IPA a basso peso molecolare (3-4 anelli) dei controlli di Acquisanta (A) e dei trapiantati da Acquisanta a Cala (TA-C) e da Acquisanta a Licata (TA-L).

Infine, come si può facilmente notare nella figura 75, le concentrazioni maggiori di IPA cancerogeni sono state determinate nei tubi degli organismi di Cala, in accordo con i risultati riscontrati nei sedimenti. Inoltre l'indice B[a]Peq aumenta in maniera significativa per gli organismi trapiantati da Licata a Cala (TC-L).

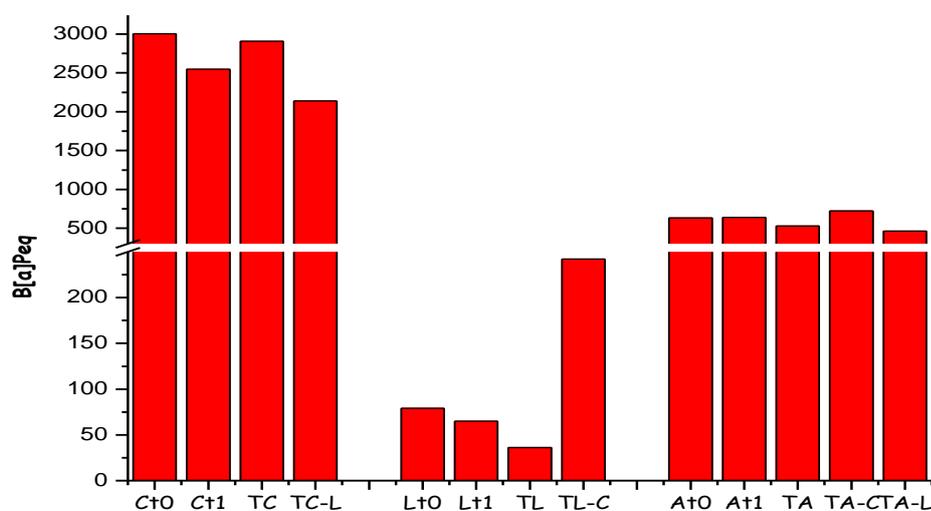


Fig. 75 - L'indice B[a]Peq nei tubi degli organismi controllo e trapiantati relativi agli esperimenti di *transplanting*.

4.4.2 - Corpi

Le concentrazioni dei singoli IPA e quelle totali nei corpi dei gruppi controllo e trapiantati di *S. spallanzanii*, sono riportate in tabella 32 e si riferiscono alla media di tre determinazioni. Considerando i singoli analiti, le deviazioni standard calcolate sui dati di uno stesso sito variano dal 3% al 10% per i corpi di Cala, dal 10% al 18% per i corpi di Licata e dall'3% al 14% per quelli di Acquasanta.

Nei campioni di corpo di *S. spallanzanii* le concentrazioni totali di IPA variano da 428 $\mu\text{g/Kg p.s.}$ a 3661 $\mu\text{g/Kg p.s.}$ (figura 76).

Come nel caso dei tubi, le concentrazioni maggiori, sono state riscontrate nei corpi degli organismi di Cala, mentre quelle più basse in quelli di Licata ed Acquasanta.

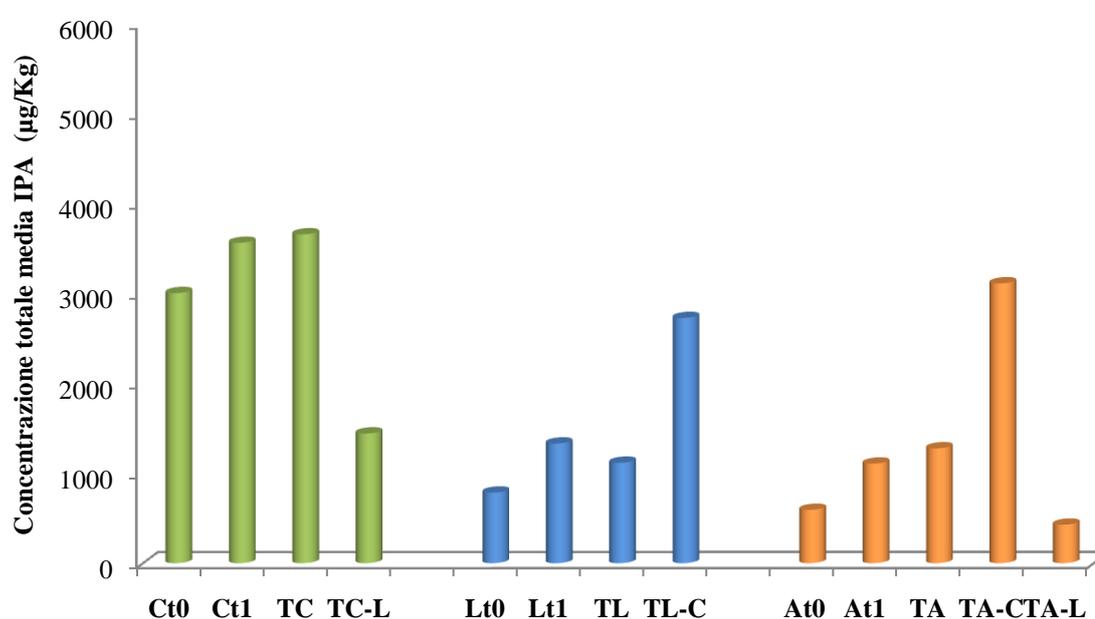


Fig. 76 – Concentrazioni totali di IPA ($\mu\text{g/Kg p.s.}$) nei campioni di corpi di *S. spallanzanii*.

Per quanto riguarda l'esperimento di *transplanting* Cala-Licata, come è possibile osservare in figura 76, la concentrazione totale di IPA nei tubi dei gruppi controllo Ct₁ e TC aumenta rispettivamente del 16% e 18% rispetto al controllo Ct₀. Nei corpi del gruppo TC-L (*transplant*) si verifica una diminuzione della concentrazione totale di IPA del 61% rispetto al controllo TC.

Durante l'esperimento di *transplanting* Licata-Cala, la concentrazione totale di IPA nei corpi dei gruppi controllo Lt₁ e TL aumenta rispettivamente del 41% e 30% rispetto al

controllo Lt₀. Nei corpi del gruppo TL-C si verifica un aumento della concentrazione totale di IPA del 71% rispetto al controllo TL.

Infine, per quanto concerne l'esperimento di *transplanting* Acquasanta-Cala/ Acquasanta-Licata, la concentrazione totale di IPA nei corpi dei gruppi controllo At₁ e TA varia rispettivamente del 46% e 54% rispetto al controllo At₀. Nei corpi dei gruppi TA-C e TA-L si verificano rispettivamente un aumento del 59% e una diminuzione del 67% rispetto al controllo TA.

Nella figura 77 sono riportate le distribuzioni percentuali dei singoli IPA presenti nelle acque, nei sedimenti, nei tubi e nei corpi dei policheti.

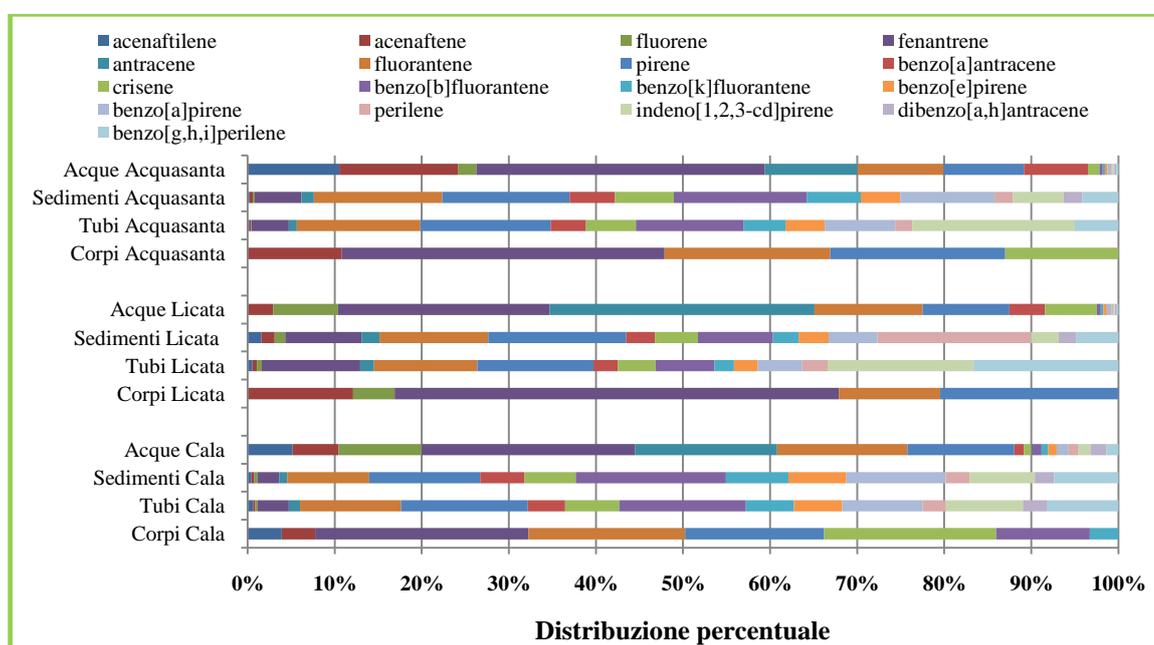


Fig. 77 - Distribuzione percentuale degli IPA nei campioni di acqua ($\mu\text{g/L}$), sedimento e tubo di *S. spallanzanii* ($\mu\text{g/Kg p.s.}$)

Nella maggior parte dei campioni di corpo prevalgono quasi gli stessi idrocarburi presenti nelle acque (acenaftene, fenantrene, fluorantene, e pirene), ovvero i composti a basso peso molecolare (con minor numero di anelli 3-4). Conseguentemente è ragionevole pensare che questi policheti assumono gli analiti principalmente dall'acqua che rappresenta il mezzo di contatto diretto di questi con l'ambiente.

Nella figura 78 sono riportate le distribuzioni percentuali dei singoli IPA nei tubi dei policheti relative agli esperimenti di *transplanting*. Nei corpi degli organismi trapiantati a Cala (TL-C e TA-C) aumentano le concentrazioni di quasi tutti gli analiti, invece nei corpi degli organismi trapiantati a Licata le concentrazioni diminuiscono.

Tabella 32 – Concentrazioni dei singoli IPA e totale ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ p.s.) nei campioni di tubo di *S. spallanzanii*.

	Acen	Ace	Flu	Fen	Ant	Fluor	Pir	B(a)A	Cri	B(b)F	B(k)F	B(e)P	B(a)P	Per	I(cd)P	D(ah)A	B(ghi)P	Σ IPA	
Ct0	108	105	<LOQ	682	<LOQ	455	550	<LOQ	612	388	107	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3007
Ct1	134	133	<LOQ	838	<LOQ	716	576	<LOQ	631	401	138	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3566
TC	159	156	<LOQ	984	<LOQ	671	508	<LOQ	778	315	88	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3661
TC-L	123	181	<LOQ	442	60	178	460	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1444
Lt0	<LOQ	103	<LOQ	445	<LOQ	117	121	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	786
Lt1	<LOQ	193	114	813	<LOQ	117	96	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1332
TL	<LOQ	96	41	394	<LOQ	143	445	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1215
TL-C	118	121	<LOQ	617	<LOQ	626	477	<LOQ	357	317	96	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2730
At0	<LOQ	90	<LOQ	198	<LOQ	122	94	<LOQ	89	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	594
At1	<LOQ	114	<LOQ	402	<LOQ	206	244	<LOQ	141	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1108
TA	<LOQ	119	<LOQ	504	<LOQ	238	260	<LOQ	157	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1279
TA-C	<LOQ	98	<LOQ	1020	<LOQ	673	1113	<LOQ	211	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3115
TA-L	<LOQ	<LOQ	<LOQ	246	<LOQ	97	85	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	428

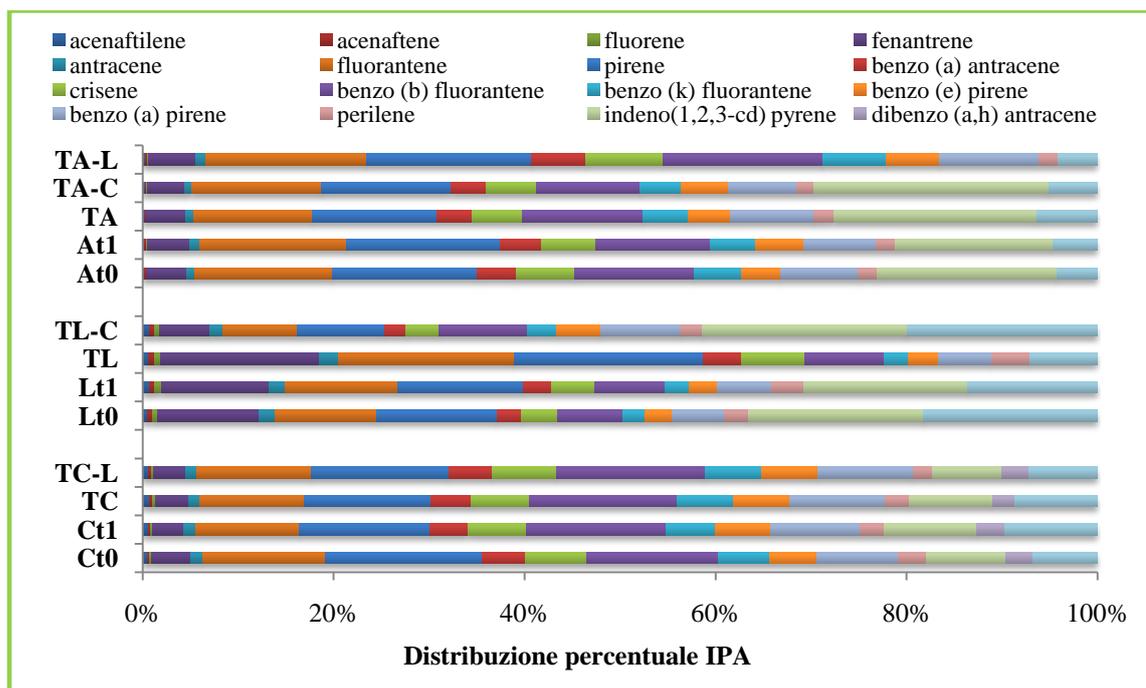


Fig. 78 - Distribuzione percentuale degli IPA nei campioni tubo ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ p.s.) di *S. spallanzanii*.

4.4.2 a - Fonti di IPA nei corpi dei policheti

Anche nel caso dei corpi si è cercato di individuare l'eventuale esistenza di correlazioni tra le concentrazioni dei singoli analiti nelle acque e nei sedimenti, e quelle nei corpi. Nel caso dei sedimenti i coefficienti di correlazione sono risultati insoddisfacenti. Tale andamento è da attribuire al fatto che, probabilmente, gli organismi assumono maggiormente gli analiti dalle acque in cui sono presenti quelli a basso peso molecolare (3-4 anelli).

In ogni caso i valori dei coefficienti di correlazione non sono elevati, poiché le concentrazioni dei singoli IPA nelle acque sono molto basse, spesso simili al limite di rilevabilità del metodo, e inoltre, influenzate dalle dinamiche marine e quindi dalla situazione al momento del campionamento che potrebbe non essere rappresentativa di quella dei policheti durante la loro crescita.

Come si vede dalla figura 79, riportata a titolo di esempio, esiste una buona correlazione solo per i siti Cala e Acquasanta tra le concentrazioni degli analiti a basso peso molecolare nelle acque e quelle nei corpi (considerando la media delle analisi effettuate nel periodo di studio). I valori dei coefficienti di correlazione per i tre siti sono rispettivamente $r = 0,66$ per il sito Cala, $r = 0,3$ per il sito Licata ed $r = 0,78$ per il sito Acquasanta.

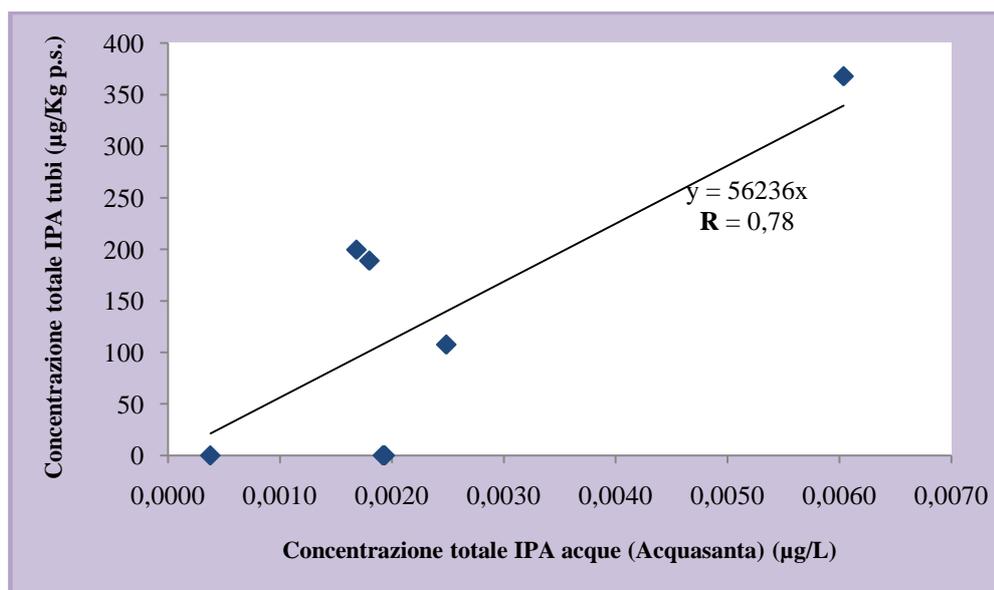


Fig. 79 – Correlazione tra le concentrazioni totali degli IPA (3-4 anelli) nelle acque e nei tubi espresse in µg/Kg p.s.

Pertanto, si può dire che gli organismi di Cala ed Acquasanta bioaccumulano nei loro corpi gli analiti con 3-4 anelli, invece a Licata un maggiore idrodinamismo al momento del campionamento potrebbe aver causato una situazione diversa da quella in cui i policheti sono vissuti.

Il polichete *S. spallanzanii* è esposto direttamente alle sostanze tossiche contenute nelle acque e nel sedimento presente in sospensione e le assimila sia per diffusione attraverso le pareti del corpo, sia tramite ingestione ed assorbimento dalle acque stesse.

L'acqua risulta la più importante via di esposizione nei policheti (Eadie *et al.*, 1982). Gli IPA aventi un K_{ow} di circa 5 si assumono principalmente dall'acqua e dai sedimenti in essa associati (Landrum, 1989; Suedel *et al.*, 1993). In pratica, si può confermare quanto è stato già visto in altri studi (Landrum, 1989), cioè che gli IPA maggiormente accumulati sono quelli con $\log K_{ow}$ intermedio, quelli con $\log K_{ow} > 5$ non risultano biodisponibili.

Dall'osservazione della distribuzione relativa dei composti in funzione del numero di anelli, quelli con 4 e 5 anelli aromatici contribuiscono in maniera determinante sul totale degli IPA nei corpi del polichete (figura 80).

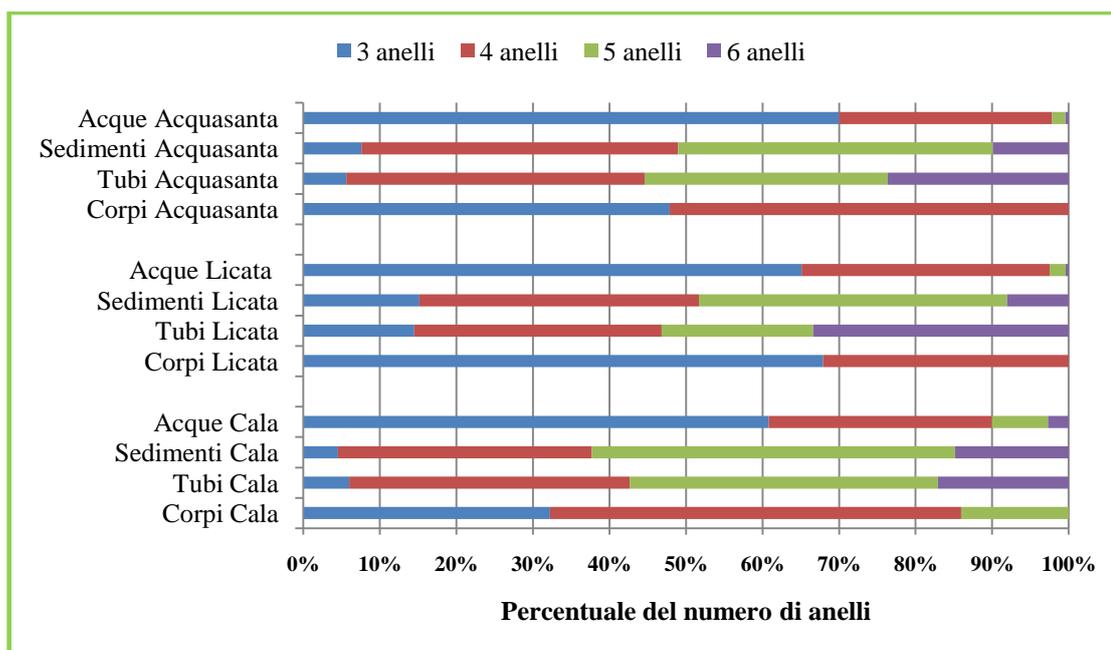


Fig. 80 – Distribuzione percentuale del numero di anelli nei campioni di acque, sedimenti e tubi di *S. spallanzanii*.

In considerazione dell'esperimento di *transplanting* si è ipotizzato anche l'esistenza di correlazioni tra le concentrazioni dei singoli analiti nei sedimenti dell'area di trapianto e quelle nei corpi degli organismi trapiantati. Anche in questo caso sono stati presi in considerazione gli analiti a basso peso molecolare.

Si può osservare in figura 81, riportata sempre a titolo di esempio, che esiste una buona correlazione per tutti gli organismi trapiantati a Cala TL-C e TA-C. I valori dei coefficienti di correlazione per i tre siti sono rispettivamente $r = 0,6$ per gli organismi di Licata trapiantati a Cala (TL-C), $r = 0,6$ per gli organismi di Acquasanta trapiantati a Cala (TA-C), $r = 0,4$ per gli organismi di Acquasanta trapiantati a Licata (TA-L). Per gli organismi di Cala trapiantati a Licata (TC-L) non esiste una correlazione.

Pertanto, si può dire che gli organismi di Licata ed Acquasanta trapiantati a Cala bioaccumulano gli IPA nei loro corpi, mentre quelli di Cala trapiantati a Licata sembrano non rispondere alle nuove condizioni ambientali. In realtà la situazione al momento del campionamento di acque potrebbe non essere rappresentativa di quella dei policheti durante il periodo di permanenza nel sito di trapianto.

Questo può essere confermato dal fatto che Christensen *et al.*, 2002 hanno mostrato in due specie di policheti la possibilità di bioaccumulo ed escrezione rapida degli IPA, dovuta sia alle capacità metaboliche che alla perdita per diffusione attraverso le pareti del corpo. In generale, questi dati evidenziano una buona capacità di bioaccumulo di *S. spallanzanii*.

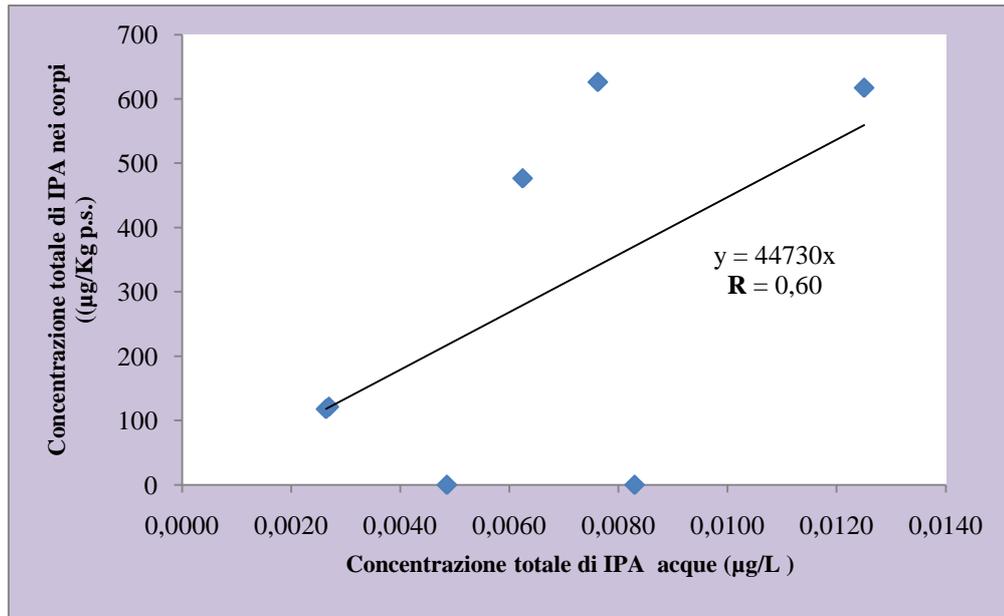


Fig. 81 - Correlazione tra le concentrazioni totali degli IPA (3-4 anelli) nelle acque e nei corpi espresse in µg/Kg p.s.

Infine, come si può facilmente notare nella figura 82, le concentrazioni maggiori di IPA cancerogeni sono state determinate nei tubi degli organismi di Cala, in accordo con i risultati sui sedimenti. L'indice B[a]P_{eq}, come nei tubi, aumenta molto per gli organismi trapiantati da Licata a Cala (TC-L).

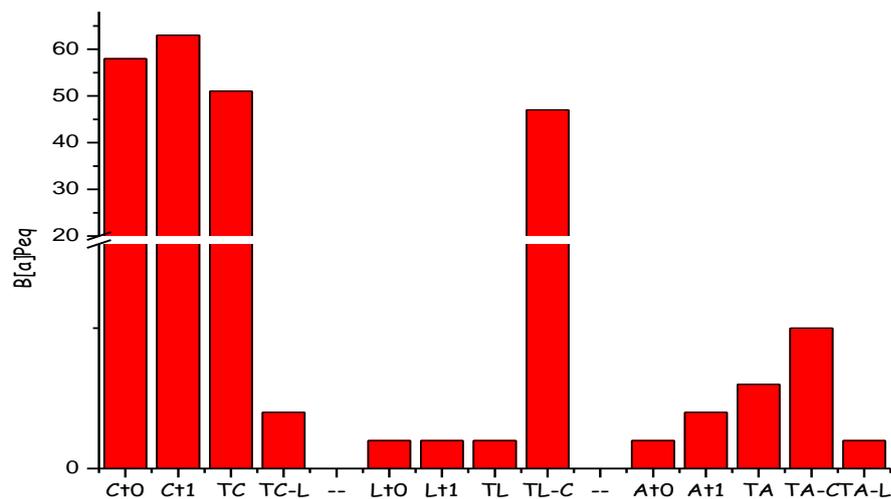


Fig. 82 - L'indice B[a]P_{eq} nei tubi degli organismi controllo e trapiantati relativi agli esperimenti di *transplanting*.

4.4.2 b - Analisi nMDS

Per quanto riguarda gli organismi, con l'ordinamento nMDS (figure 83, 84, 85) vengono messe in luce le differenze di concentrazione degli IPA tra i gruppi controllo e i trapiantati, in particolare queste risultano più marcate nei corpi rispetto ai tubi di *S. spallanzanii*. Inoltre, queste differenze sono maggiori per gli organismi trapiantati a Cala, mostrando quindi che gli organismi rispondono alle nuove condizioni ambientali. Questi risultati hanno implicazioni sul ruolo e il possibile utilizzo di questo polichete come bioindicatore.

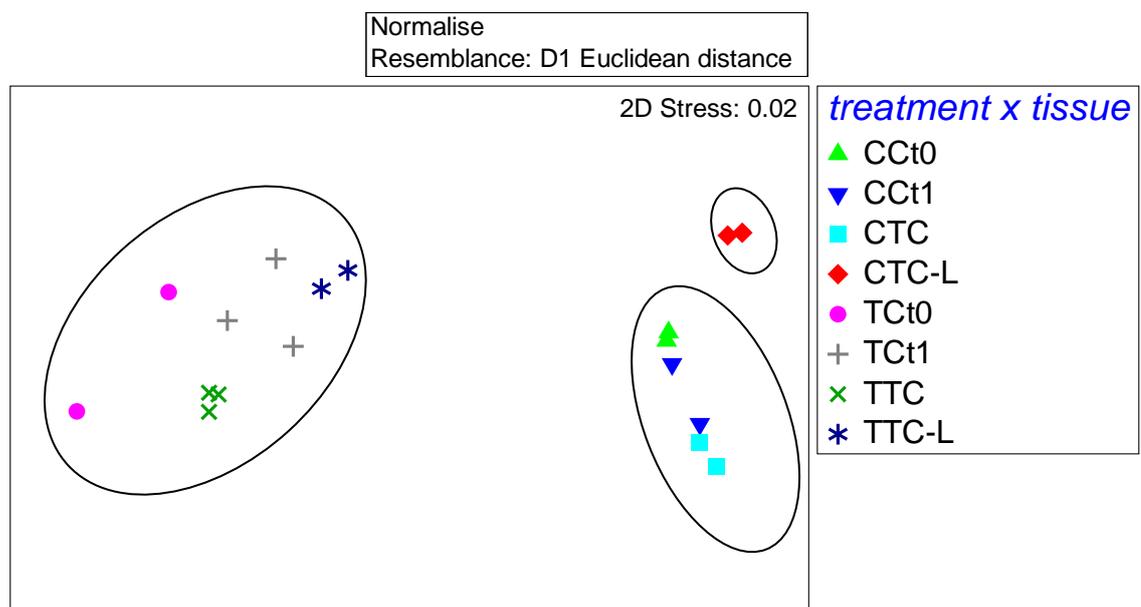


Fig. 83 – nMDS basato sulle distanze eucleree normalizzate dei valori delle concentrazioni di IPA nei tubi e nei corpi di *S. spallanzanii* dei gruppi controllo e trapiantati relativi all'esperienza di *transplanting* Cala-Licata.

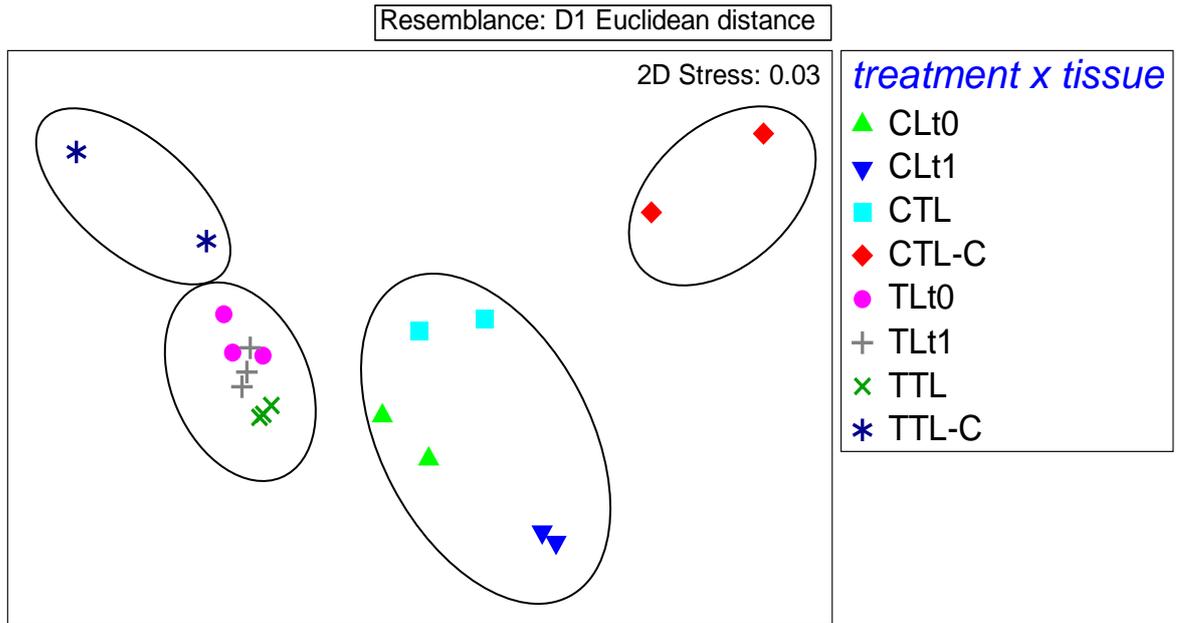


Fig. 84 – nMDS basato sulle distanze euclidee normalizzate dei valori delle concentrazioni di IPA nei tubi e nei corpi di *S. spallanzanii* dei gruppi controllo e trapiantati relativi all'esperienza di *transplanting* Licata-Cala.

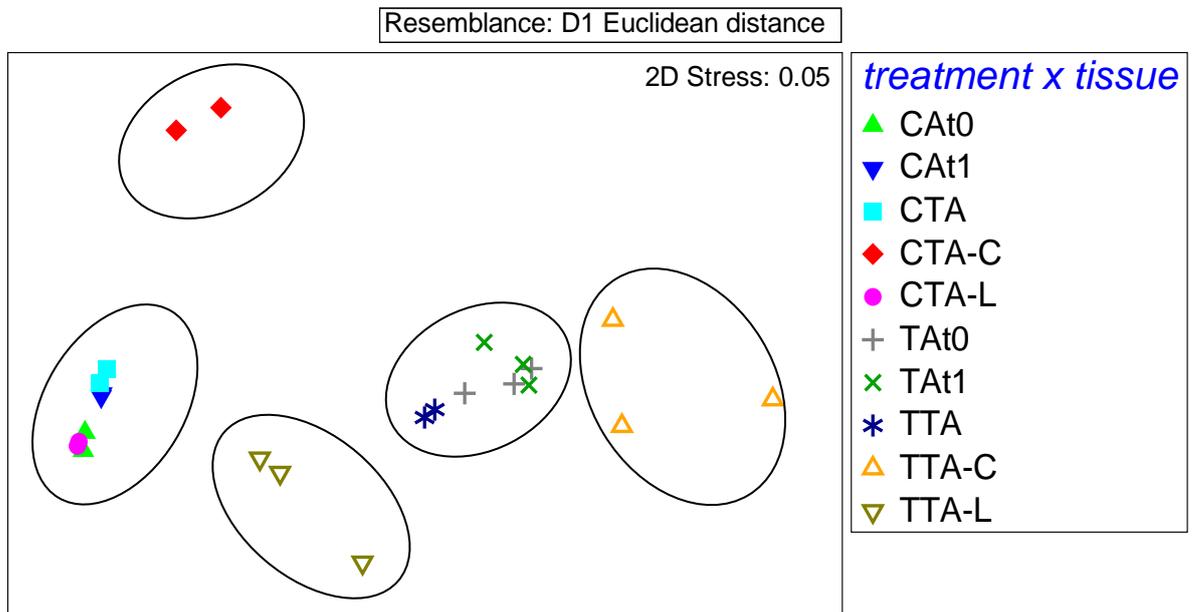


Fig. 85 – nMDS basato sulle distanze euclidee normalizzate dei valori delle concentrazioni di IPA nei tubi e nei corpi di *S. spallanzanii* dei gruppi controllo e trapiantati relativi agli esperimenti di *transplanting* Acquisanta-Cala e Acquisanta-Licata.

4.5 – Metalli pesanti in *Sabella spallanzanii*

4.5.1 – Tubi

4.5.1 a - Esperimento di *transplanting* Cala-Licata

Le concentrazioni dei metalli pesanti nei gruppi controllo di *S. spallanzanii* prelevati a Cala e in quelli trasferiti a Licata, e le relative deviazioni standard sono riportate in tabella 33.

Tabella 33 - Medie delle concentrazioni di metalli pesanti (mg/Kg p.s.±ds) nei tubi di *S. spallanzanii* del *transplanting* Cala-Licata.

	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg	As	V
Ct₀	0,3	9	217	10	35	206	0,4	10	7
ds	0,03	0,4	8	0,4	2	17	0,03	2	0,2
Ct₁	0,3	7	189	9	24	200	0,3	10	6
ds	0,02	0,5	3	2	1	46	0,02	1	0,3
TC	0,3	7	181	8,5	27	161	0,2	9	6
ds	0,03	0,4	13	0,2	1	18	0,03	1	0,2
TC-L	0,2	8	138	11	20	132	0,1	10	7
ds	0,02	0,4	17	0,4	0,3	3	0,02	0,1	0,2

Come è possibile osservare nelle figure 86 e 87 nei tubi dei gruppi controllo Ct₁ e TC (*transplant in situ*) non vengono riscontrare variazioni significative delle concentrazioni di metalli pesanti rispetto al gruppo Ct₀, ed è possibile osservare soltanto una lieve diminuzione del Pb e Hg. Nei tubi del gruppo TC-L (*transplant*) si verifica una diminuzione di Cu, Pb, Zn, Hg e un lieve aumento del Ni rispetto ai tubi del gruppo controllo Ct₀. Queste differenze tra i tubi del gruppo controllo TC e quelli del gruppo trapiantato a Licata TC-L mostrano in *S. spallanzanii* una perdita di Cu, Pb, Zn, e Hg dovuta probabilmente alla cessione di parte dei metalli alle acque, e il bioaccumulo del Ni, in accordo con il fatto che le concentrazioni di nichel sono maggiori a Licata rispetto a Cala.

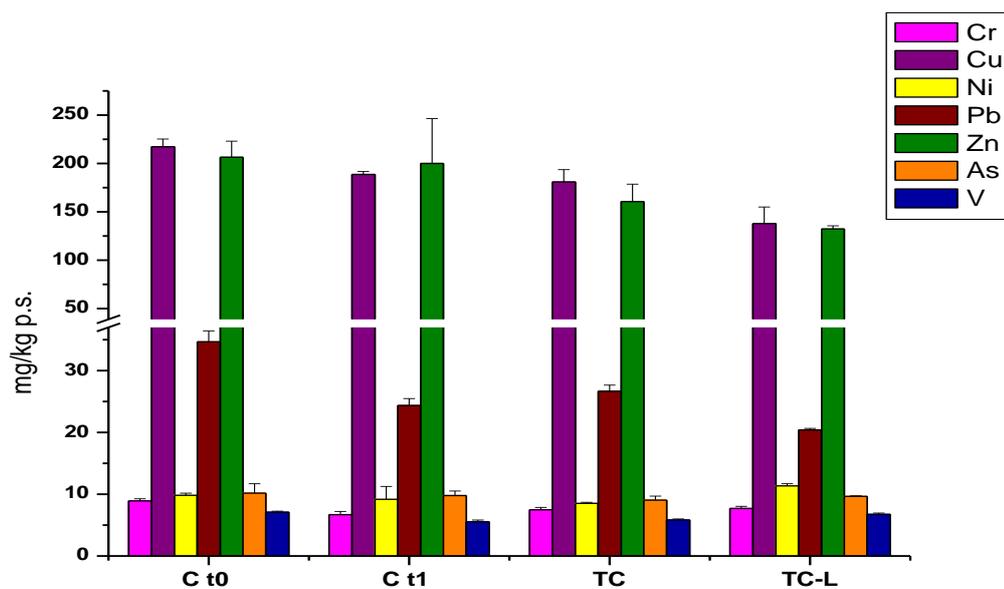


Fig. 86 - Concentrazioni di Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, As e V (mg/Kg p.s. \pm ds) nei tubi di *S. spallanzanii* del *trasplanting* Cala-Licata.

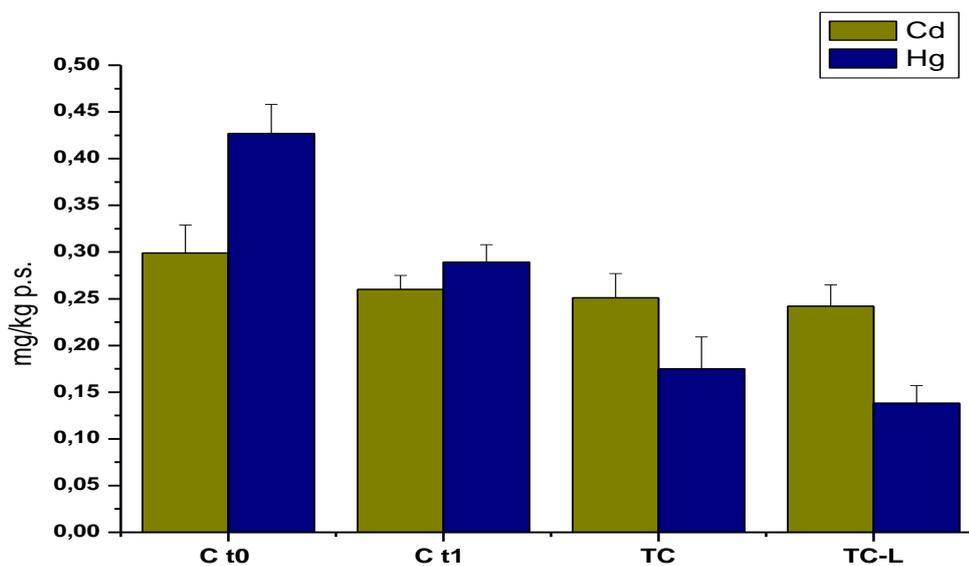


Fig. 87 - Concentrazioni di Cd e Hg (mg/Kg p.s. \pm ds) nei tubi di *S. spallanzanii* del *trasplanting* Cala-Licata.

4.5.1 b - Esperimento di *transplant* Licata-Cala

Le concentrazioni dei metalli pesanti nei tubi di *S. spallanzanii* dei gruppi controllo prelevati a Licata e in quelli trasferiti a Cala, e le relative deviazioni standard sono riportate in tabella 34:

Tabella 34 - Medie delle concentrazioni di metalli pesanti (mg/Kg p.s.±ds) nei tubi di *S. spallanzanii* del *transplant* Licata-Cala.

	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg	As	V
Lt ₀	0,2	4	16	22	2	46	0,01	10	5
ds	0,02	1	0,4	2	0,2	7	0,005	3	1
Lt ₁	0,3	6	18	20	3	42	0,01	7	7
ds	0,03	1	1	1	0,2	1	0,006	1	1
TL	0,2	4	16	22	2	40	0,005	9	5
ds	0,03	0,1	1	1	0,2	1	0,002	1	0,2
TL-C	0,2	4	53	18	4	79	0,02	10	6
ds	0,04	0,1	1	2	0,2	4	0,003	1	0,1

Nei tubi dei gruppi controllo Lt₁ e LC (*transplant in situ*) non vengono riscontrare variazioni di rilievo delle concentrazioni di metalli pesanti rispetto al gruppo Lt₀ (figure 88 e 89). Nei tubi del gruppo TL-C (*transplant*) si verifica un significativo aumento di Cu, Zn, e Hg, un lieve aumento del Pb e una lieve diminuzione del Ni rispetto ai tubi del gruppo controllo Ct₀. Queste differenze tra i tubi del gruppo controllo LC e quelli del gruppo trapiantato a Licata TL-C sono in accordo con i risultati dell'esperimento precedente e delle concentrazioni di metalli nei sedimenti dei due siti.

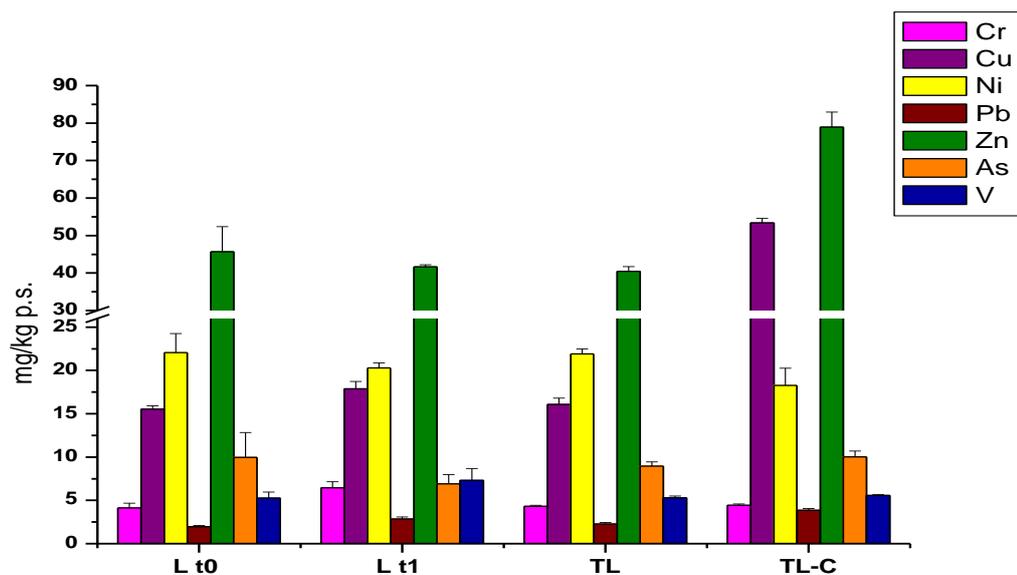


Fig. 88 - Concentrazioni di Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, As e V (mg/Kg p.s.±ds) nei tubi di *S. spallanzanii* del *trasplanting* Cala-Licata.

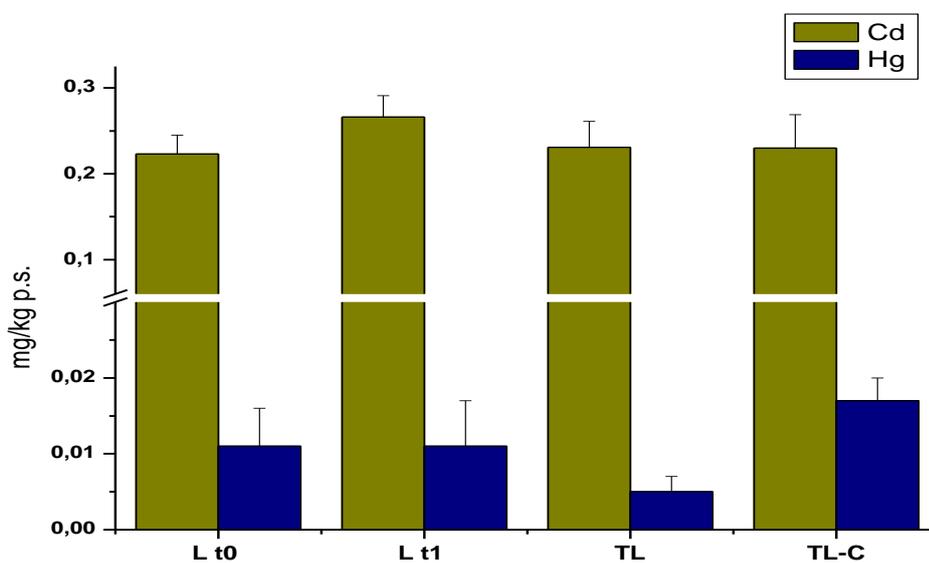


Fig. 89 - Concentrazioni di Cd e Hg (mg/Kg p.s.±ds) nei tubi di *S. spallanzanii* del *trasplanting* Cala-Licata.

4.5.1 c - Esperimenti di *transplant* Acquasanta-Cala e Acquasanta-Licata

Le concentrazioni dei metalli pesanti nei tubi di *S. spallanzanii* dei gruppi controllo prelevati ad Acquasanta e in quelli trasferiti a Cala e a Licata, e le relative deviazioni standard sono riportate in tabella 35:

Tabella 35 - Medie delle concentrazioni di metalli pesanti (mg/Kg p.s.±ds) nei tubi di *S. spallanzanii* del *transplant* Acquasanta-Cala/Aquasanta-Licata.

	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg	As	V
A t ₀	0,2	4	55	13	10	91	0,1	12	6
ds	0,03	1	6	1	1	6	0,01	0,2	1
A t ₁	0,2	4	47	14	10	96	0,09	9	6
ds	0,03	1	2	1	0,4	10	0,01	2	0,3
TA	0,3	4	51	13	9	100	0,08	9	4
ds	0,02	0,3	6	0,3	0,4	2	0,01	0,1	0,3
TA-C	0,2	6	113	12	13	132	0,1	8	8
ds	0,03	0,4	7	0,4	1	2	0,01	0,3	1
TA-L	0,2	4	38	16	6	80	0,07	8	5
ds	0,02	0,3	2	0,4	0,40	7	0,02	1	0,4

Nelle figure 90 e 91 è evidente come nei tubi di *S. spallanzanii* dei gruppi controllo At₁ e TA (*transplant in situ*) non vengono riscontrare variazioni significative delle concentrazioni di metalli pesanti rispetto al gruppo At₀. Nei tubi del gruppo TA-C (*transplant*) si verifica un significativo aumento di Cu, Zn, Pb e Hg, e una lieve diminuzione del Ni rispetto ai tubi del gruppo controllo Ct₀. Nei tubi del gruppo TA-L (*transplant*) si verifica una significativa diminuzione di Cu, Zn, Pb, As e Hg, e un lieve aumento del Ni rispetto ai tubi del gruppo controllo Ct₀.

Queste differenze tra i tubi del gruppo controllo At₀ e quelli dei gruppi trapiantati a Cala (TA-C) e a Licata (TA-L) sono in accordo con le differenze riscontrate rispettivamente tra gruppi il controlli Ct₀ e Lt₀ e i rispettivi gruppi trapiantati a Cala (TC-L) e a Licata (TL-C).

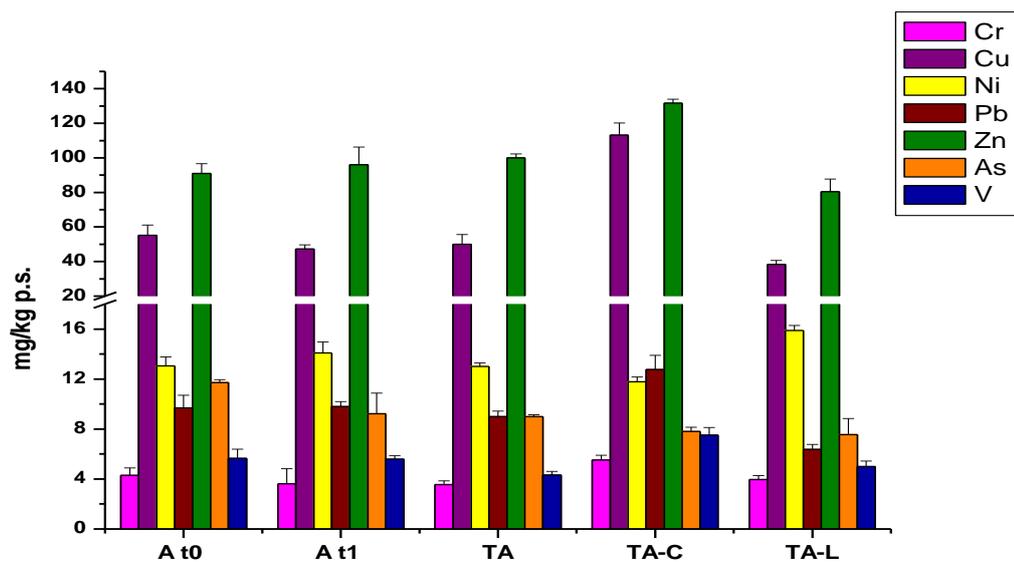


Fig. 90 - Concentrazioni di Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, As e V (mg/Kg p.s.±ds) nei tubi di *S. spallanzanii* del *trasplanting* Acquasanta-Cala/Acquasanta-Licata.

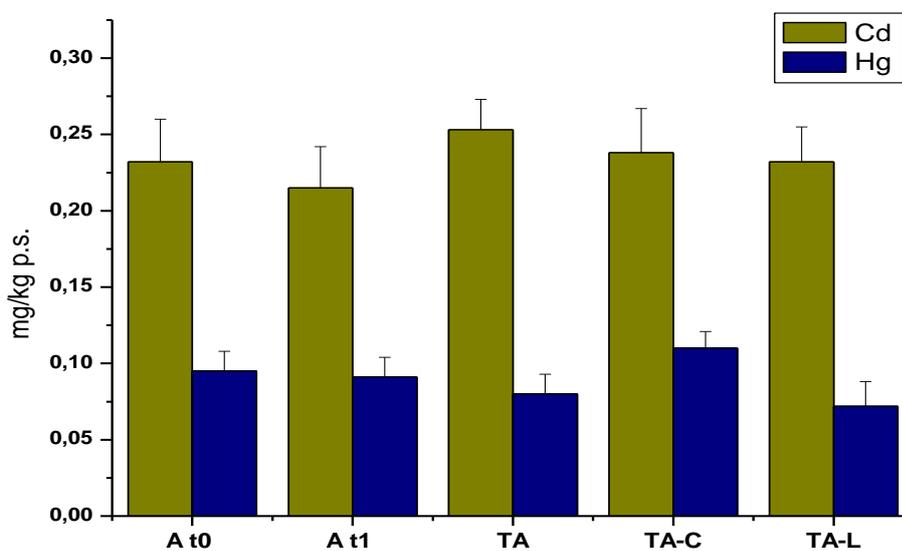


Fig. 91 - Concentrazioni di Cd e Hg (mg/Kg p.s.±ds) nei tubi di *S. spallanzanii* del *trasplanting* Acquasanta-Cala/Acquasanta-Licata.

4.5.1 d – Origine dei metalli pesanti nei tubi

I policheti, quali *S. spallanzanii*, sono esposti direttamente alle sostanze tossiche contenute nelle acque e nel sedimento in sospensione, e potrebbero perciò rappresentare dei buoni indicatori della contaminazione presente nel sedimento stesso. Poiché i sedimenti tendono ad accumulare i metalli originariamente presenti nelle acque, si è ipotizzato l'esistenza di correlazioni tra le concentrazioni dei singoli analiti nei sedimenti e quelle negli organismi.

Come si vede dalla figura 92, riportata a titolo d'esempio, esiste una buona correlazione tra le concentrazioni dei metalli nei sedimenti e quelle negli organismi (considerando la media delle analisi effettuate nel periodo di studio) solo per i siti Cala e Acquasanta. I valori dei coefficienti di correlazione per i due siti sono rispettivamente $r = 0,86$ per il sito Cala, $r = 0,94$ per il sito Acquasanta e $r = 0,52$ per il sito Licata.

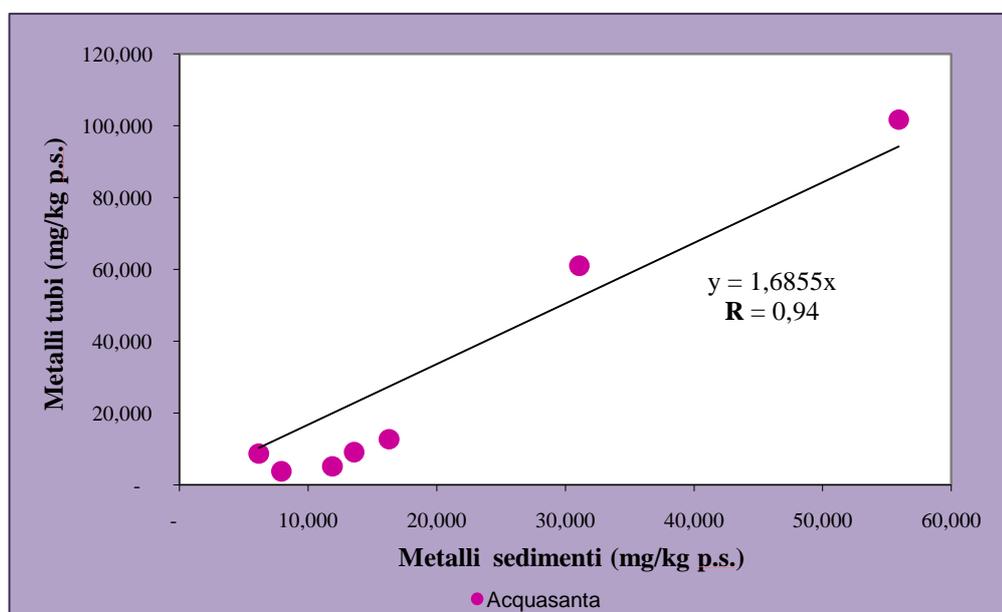


Fig. 92 - Correlazione tra le concentrazioni di metalli (mg/Kg p.s.) nei sedimenti dell'area di origine nei tubi degli organismi di Acquasanta.

Questa buona correlazione nei siti Cala ed Acquasanta mostra in generale una buona capacità di bioaccumulo di *S. spallanzanii* nei confronti dei metalli pesanti, e quindi di assolvere alla funzione di bioindicatore. Probabilmente a Licata il bioaccumulo di metalli pesanti è limitato a causa di una scarsa biodisponibilità dei contaminanti.

Inoltre, è stata presa in considerazione la correlazione tra le concentrazioni degli analiti nei sedimenti dell'area di trapianto e quelle negli organismi trapiantati, e si può notare nella figura 93, riportata sempre a titolo di esempio, che esiste una buona correlazione solo per gli

organismi di Licata trapiantati a Cala (TL-C) e quelli di Acquasanta trapiantati a Cala (TA-C). I valori dei coefficienti di correlazione per i tre siti sono rispettivamente $r = 0,1024$ per gli organismi di Cala trapiantati a Licata (TC-L), $r = 0,92$ per gli organismi di Licata trapiantati a Cala (TL-C), $r = 0,28$ per gli organismi di Acquasanta trapiantati a Licata (TA-L), $r = 0,90$ per gli organismi di Acquasanta trapiantati a Cala (TA-C).

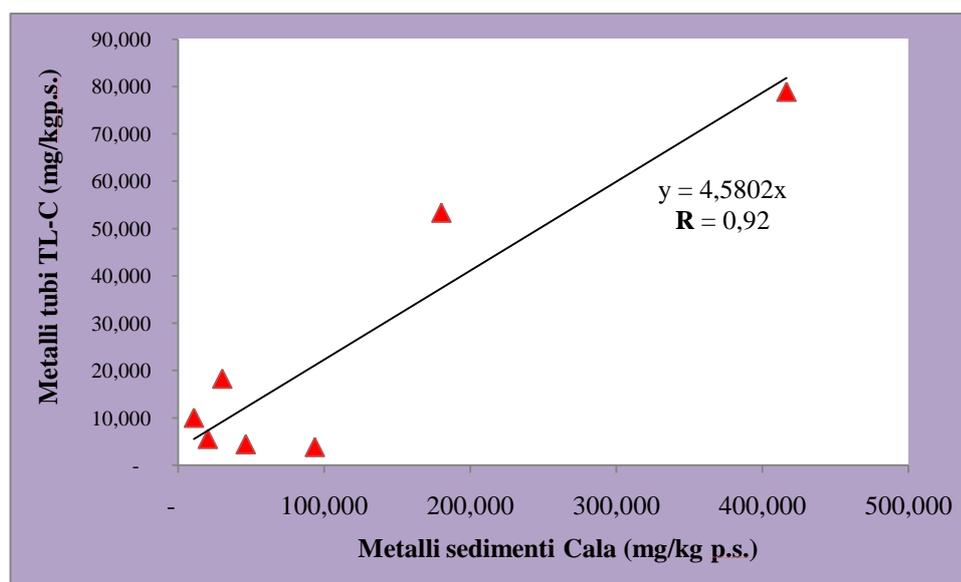


Fig. 93 - Correlazione tra le concentrazioni di metalli (mg/Kg p.s.) nei sedimenti dell'area di trapianto e nei tubi degli organismi trapiantati da Licata a Cala (TL-C).

Pertanto queste correlazioni mostrano come probabilmente nei tubi il processo di biodiluzione non è particolarmente attivo per i metalli pesanti a Licata.

Per studiare la biodisponibilità e il bioaccumulo dei contaminanti è stato utilizzato, anche nel caso dei metalli, il *fattore di bioaccumulo (BAF)*. Questo è stato calcolato per ogni metallo e per ciascun sito di campionamento.

Come si può osservare dalle figure 94, 95 e 96 in accordo con i risultati iniziali, gli organismi di Cala trapiantati a Licata (TC-L) smaltiscono dai loro tubi Cd, Cu, Pb, Zn e Hg, e bioaccumulano il Ni.

Gli organismi di Licata trapiantati a Cala (TL-C) bioaccumulano nei loro tubi Cd, Cu, Pb, Zn e Hg, e perdono il Ni.

Infine, gli organismi di Acquasanta trapiantati a Cala (TA-C) bioaccumulano nei loro tubi Cd, Cu, Pb, Zn e Hg, e cedono il Ni, e gli organismi di Acquasanta trapiantati a Licata (TA-L) bioaccumulano nei loro tubi Cd, Cu, Pb, Zn e Hg, e cedono il Ni.

Le differenze tra i tubi del gruppo controllo TC e TL, e quelli dei gruppi trapiantati a Cala (TA-C) e a Licata (TA-L) sono in accordo con le differenze riscontrate durante l'esperimento di Acquisanta.

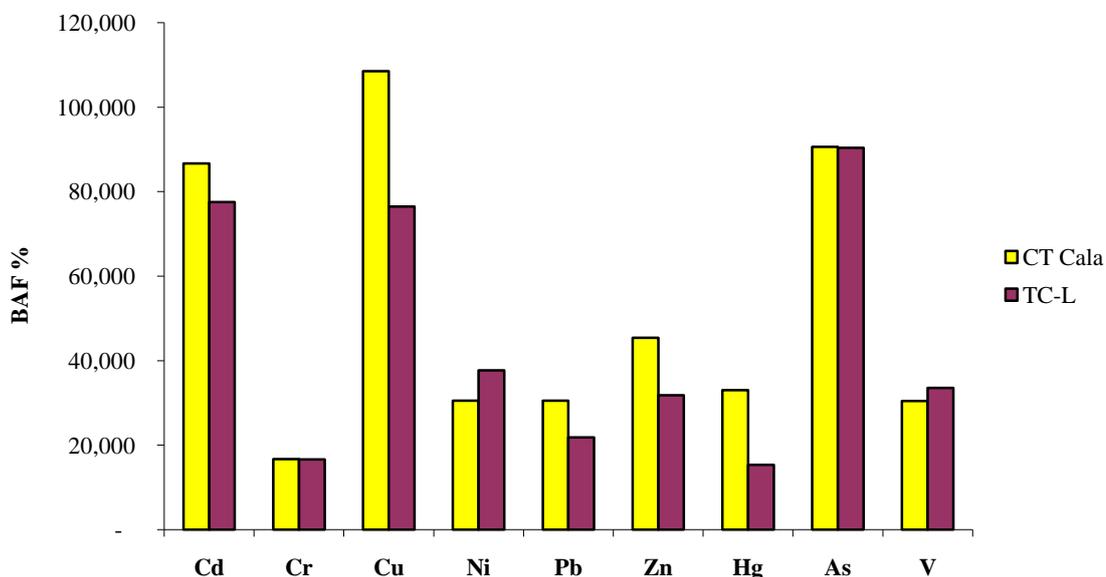


Fig. 94 - Fattore di bioaccumulo (BAF %) dei tubi degli organismi di Cala (CT Cala) e dei rispettivi trapiantati a Licata (TC-L).

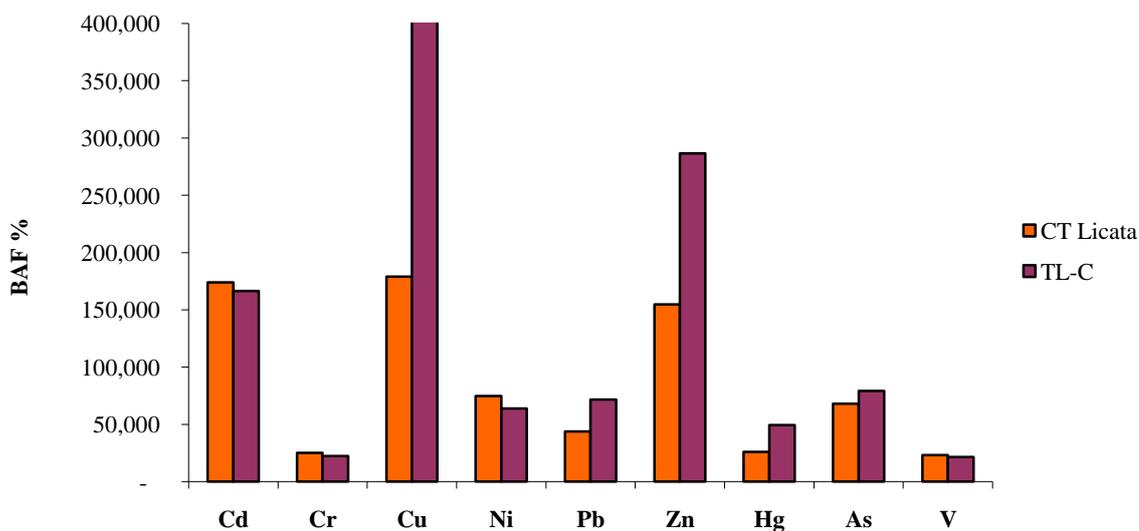


Fig. 95 - Fattore di bioaccumulo (BAF %) dei tubi degli organismi di Licata (CT Licata) e dei rispettivi trapiantati a Cala (TL-C).

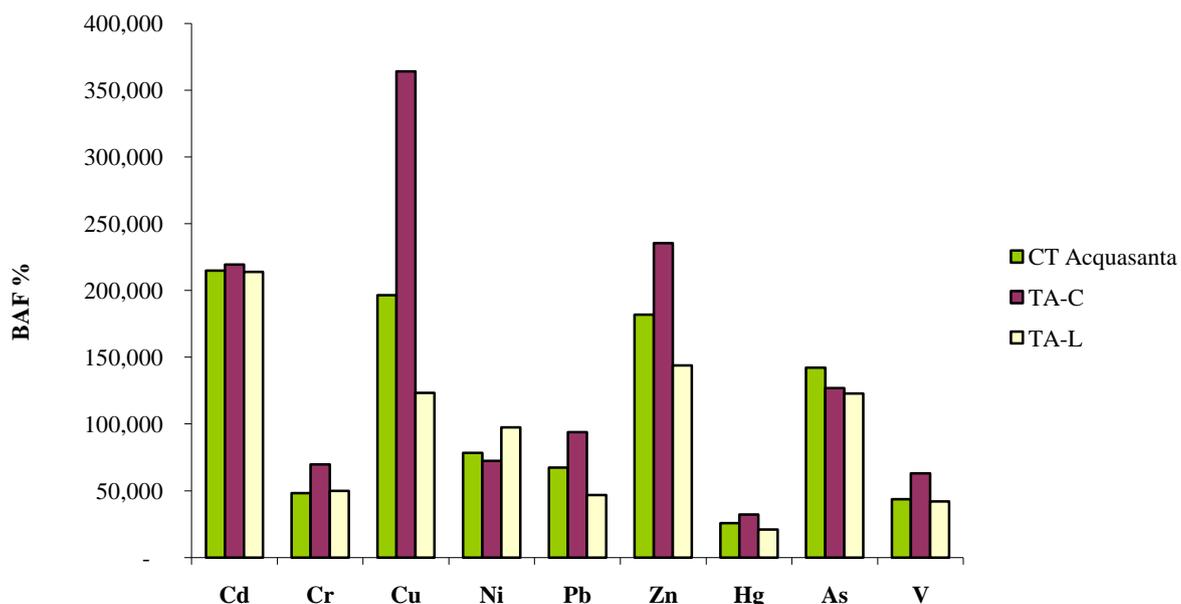


Fig. 96 - Fattore di bioaccumulo (BAF %) dei tubi degli organismi di Acquisanta (CT Acquisanta) e dei rispettivi trapiantati (TA-C e TA-L).

4.5.2 – Corpi

4.5.2 a - Esperimento di *transplantig* Cala-Licata

Le concentrazioni dei metalli pesanti nei corpi di *S. spallanzanii* dei gruppi controllo prelevati a Cala e in quelli trasferiti a Licata, e le relative deviazioni standard sono riportate in tabella 36:

Tabella 36 – Medie delle concentrazioni di metalli pesanti (mg/Kg p.s.±ds) in *S. spallanzanii* del *transplantig* Cala-Licata.

	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg	As	V
Ct0	0,09	2	88	5	6	80	0,2	6	3
ds	0,02	0,2	3	0,3	0,8	0,08	0,08	0,7	0,3
Ct1	0,07	0,1	66	4	3	106	0,08	8	1
ds	0,01	0,08	1	0,2	0,04	0,02	0,02	0,5	0,04
TC	0,09	0,7	46	4	3	121	0,08	9	1
ds	0,01	0,06	0,4	0,3	0,03	0,003	0,003	0,8	0,03
TC-L	0,1	2	35	11	1	74	0,07	9	3
ds	0,01	0,4	2	0,6	0,1	0,002	0,002	0,3	0,4

Come è possibile osservare nelle figure 97 e 98 nei gruppi controllo Ct₁ e TC (TRS *in situ*) si possono riscontrare piccole variazioni delle concentrazioni di metalli pesanti rispetto al

gruppo Ct₀: si tratta di una diminuzione di Cr, Cu, Ni, Pb, V e Hg, e un aumento di Zn e As. Nel gruppo TC-L (*transplant*) si osserva una diminuzione di Cu, Pb, e Hg, e un aumento di Ni e V rispetto ai gruppi controllo Ct₁ e TC. Le differenze tra i gruppi controllo Ct₁ e TC e il gruppo trapiantato a Licata TC-L mostrano, in *S. spallanzanii*, un evidente bioaccumulo di Ni e V, e la possibile attivazione di meccanismi di detossificazione che le permettono di far diminuire la concentrazione di Cu, Pb, Hg e Zn.

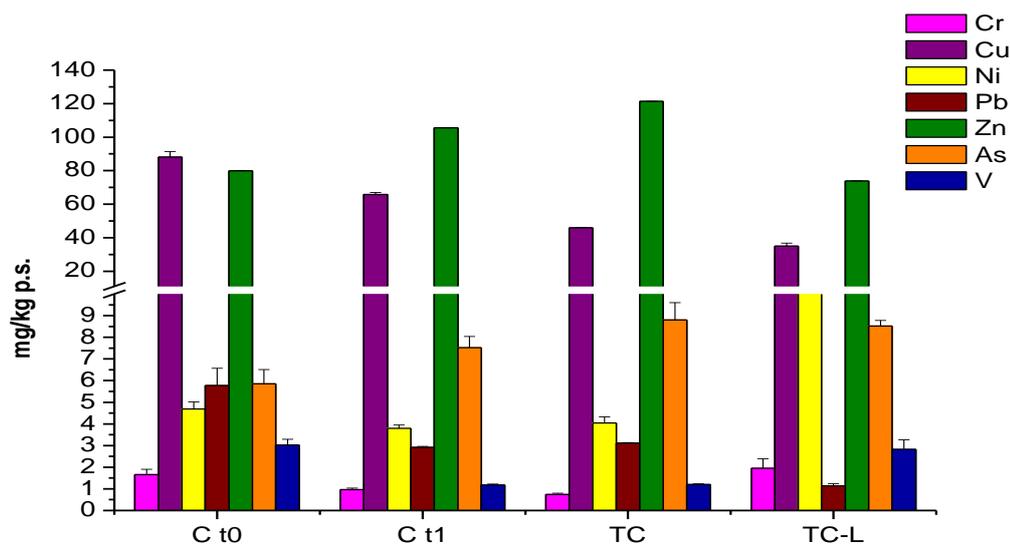


Fig. 97 - Concentrazioni di Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, As e V (mg/Kg p.s.±ds) in *S. spallanzanii* del *trasplanting* Cala-Licata.

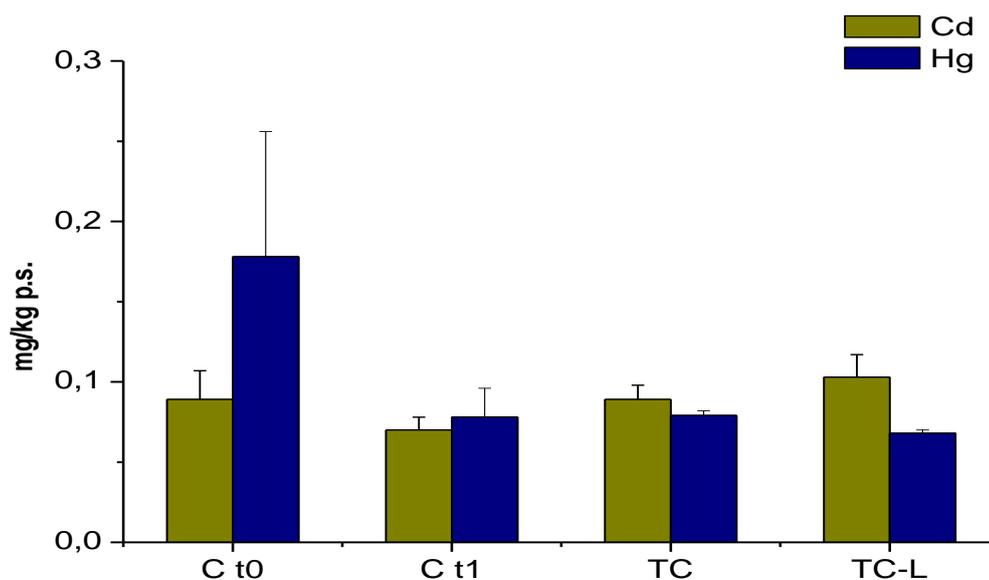


Fig. 98 - Concentrazioni di Cd e Hg (mg/Kg p.s.±ds) in *S. spallanzanii* del *trasplanting* Cala-Licata.

4.5.2 b - Esperimento di *transplantig* Licata-Cala

Le concentrazioni dei metalli pesanti in *S. spallanzanii* dei gruppi controllo prelevati a Licata e in quelli trasferiti a Cala, e le deviazioni standard sono riportate nella tabella 37:

Tabella 37 – Medie delle concentrazioni di metalli pesanti (mg/Kg p.s.±ds) in *S. spallanzanii* del *transplantig* Licata- Cala.

	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg	As	V
Lt0	1	6	19	9	2	60	0,1	17	8
ds	0,02	0,4	3	0,4	0,1	0,03	0,03	1	0,4
Lt1	1	5	20	10	2	68	0,08	24	7
ds	0,1	0,09	1	2	0,2	0,006	0,006	1	0,05
TL	1	2	16	7	1	70	0,1	27	2
ds	0,08	0,04	1	1	0,1	0,004	0,004	3	0,1
TL-C	1	1	32	5	2	125	0,08	2	1
ds	0,3	0,05	1	0,2	1	0,008	0,008	0,4	0,2

Come si osserva nelle figure 99 e 100 nel gruppo LC (*transplant in situ*) si possono osservare diminuzioni delle concentrazioni di Cr, Ni e V rispetto ai gruppi controllo Lt₁ e TL_{t0}. Nel gruppo TL-C (*transplant*) è stato riscontrato un aumento di Cu e Zn e una diminuzione di tutti gli altri analiti, soprattutto di As, rispetto ai gruppi controllo Lt₁ e LC. Le differenze tra i gruppi controllo e il gruppo trapiantato a Licata TC-L mostrano, in *S. spallanzanii*, un bioaccumulo di Zinco e Rame.

L'attivazione di meccanismi di detossificazione potrebbe giustificare la minore concentrazione di Cr, Ni, As e V riscontrata negli organismi trapiantati a Licata.

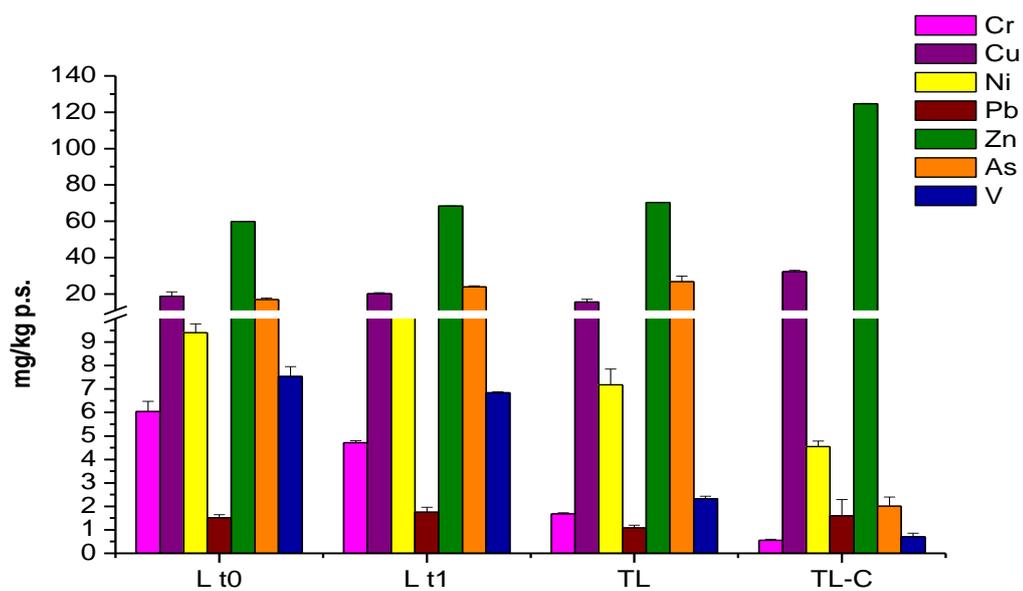


Fig. 99 - Concentrazioni di Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, As e V (mg/Kg p.s.±ds) in *S. spallanzanii* del *trasplanting* Licata-Cala.

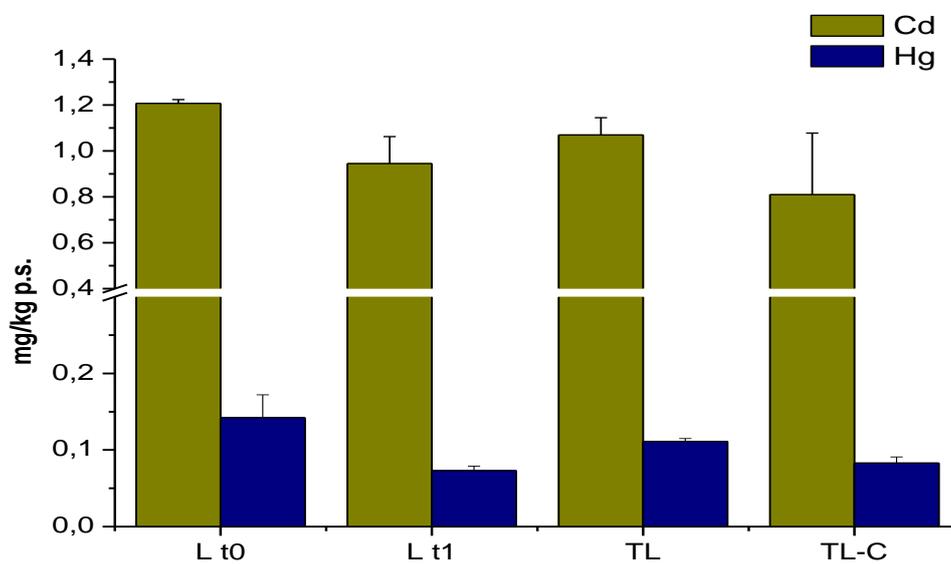


Fig. 100 - Concentrazioni di Cd e Hg (mg/Kg p.s.±ds) in *S. spallanzanii* del *trasplanting* Licata-Cala.

4.5.2 c - Esperimento di *transplantig* Acquasanta-Cala/Aquasanta-Licata

Le concentrazioni dei metalli pesanti in *S. spallanzanii* dei gruppi controllo prelevati ad Acquasanta e in quelli trasferiti a Cala e a Licata, e le deviazioni standard sono riportate in tabella 38:

Tabella 38 – Medie delle concentrazioni di metalli pesanti (mg/Kg p.s.±ds) in *S. spallanzanii* dei *transplantig* Acquasanta-Cala e Acquasanta-Licata.

	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg	As	V
At0	0,80	1	24	6	2	79	0,1	36	2
ds	0,1	0,2	4	0,4	0,5	0,02	0,02	5	0,2
At1	0,4	1	25	6	2	79	0,08	16	2
ds	0,2	0,2	2	1	0,5	0,01	0,01	1	0,34
TA	0,6	0,7	31	4	1	95	0,1	6	1
ds	0,04	0,07	0,5	0,6	0,4	0,01	0,01	2	0,03
TA-C	0,7	0,7	30	3	2	129	0,09	2	1,21
ds	0,03	0,1	3	0,3	0,3	0,01	0,01	0,7	0,14
TA-L	0,5	1	17	7	1	73	0,07	3	1
ds	0,2	0,2	2	1	0,04	0,004	0,004	0,8	0,3

Come si osserva nelle figure 101 e 102 nel gruppo TA (*transplant in situ*) non si possono riscontrare delle variazioni rilevanti delle concentrazioni di metalli pesanti rispetto ai gruppi controllo At₁ e At₀.

I gruppi trapiantati a Cala TA-C mostrano, in *S. spallanzanii*, un accumulo di Zn e una diminuzione dell'As e del Ni, invece quelli trapiantati a Licata TA-L, evidenziano un bioaccumulo di Nichel e una diminuzione del Piombo. Questi risultati sono in accordo, rispettivamente, con quelli degli organismi trapiantati da Cala a Licata (TC-L) e da Licata a Cala (TL-C).

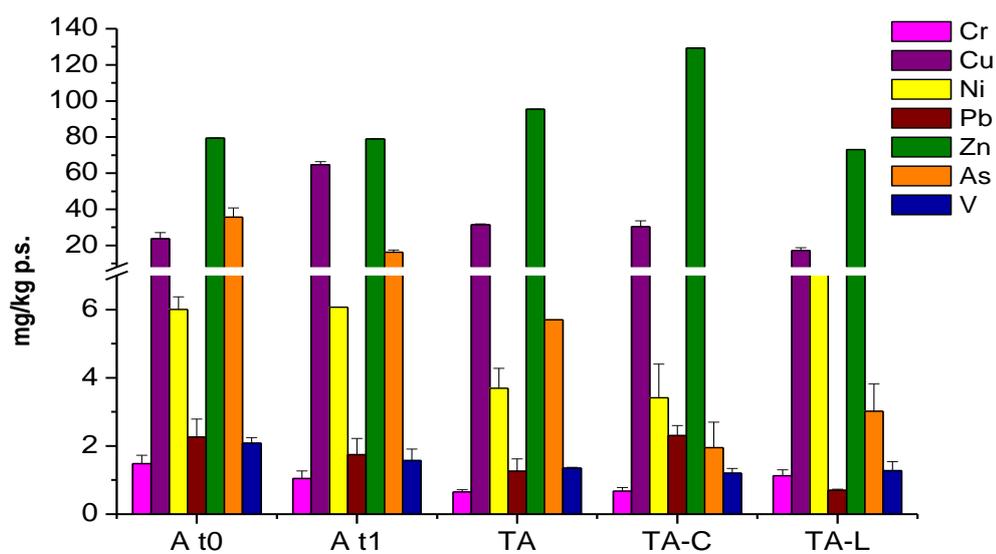


Fig. 101 - Concentrazioni di Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, As e V (mg/Kg p.s.±ds) in *S. spallanzanii* dei *transplantig* Acquisanta-Cala e Acquisanta-Licata.

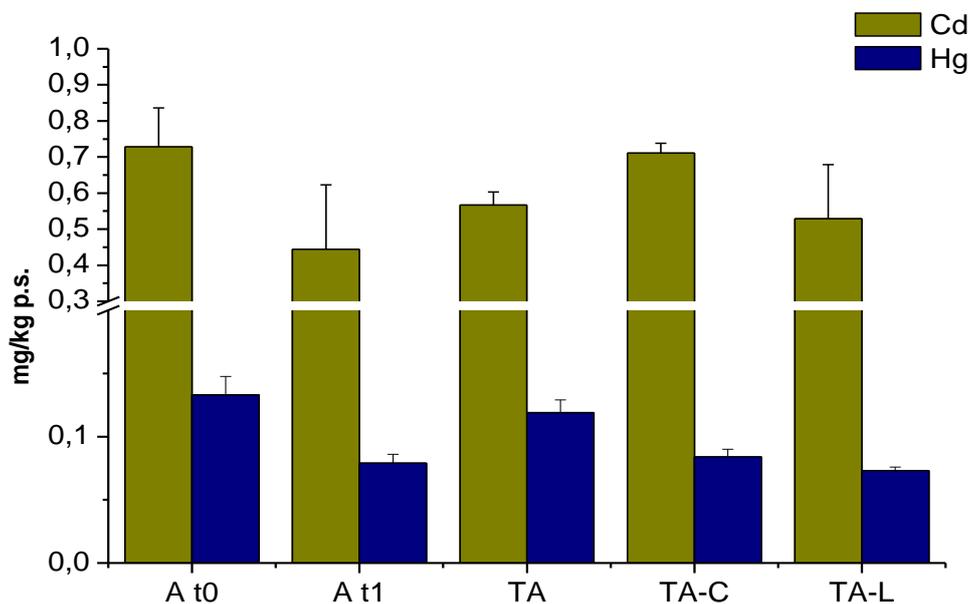


Fig. 102- Concentrazioni di Cd e Hg (mg/Kg p.s.±ds) in *S. spallanzanii* dei *transplantig* Acquisanta-Cala e Acquisanta-Licata.

4.5.2 d – Origine dei metalli pesanti nei corpi di *S. spallanzanii*

Anche nel caso dei corpi di *S. spallanzanii* sono state studiate le correlazioni tra le concentrazioni degli metalli nei sedimenti e quelle negli organismi.

Come si vede dalla figura 103, a titolo d'esempio, e come nel caso dei tubi, anche per i corpi di *S. spallanzanii* esiste una buona correlazione solo per i siti Cala e Acquasanta tra le concentrazioni degli metalli nei sedimenti e quelle negli organismi (considerando la media delle analisi effettuate nel periodo di studio). I valori dei coefficienti di correlazione per i tre siti sono rispettivamente $r = 0,94$ per il sito Cala, $r = 0,94$ per il sito Acquasanta e $r = 0,33$ per il sito Licata.

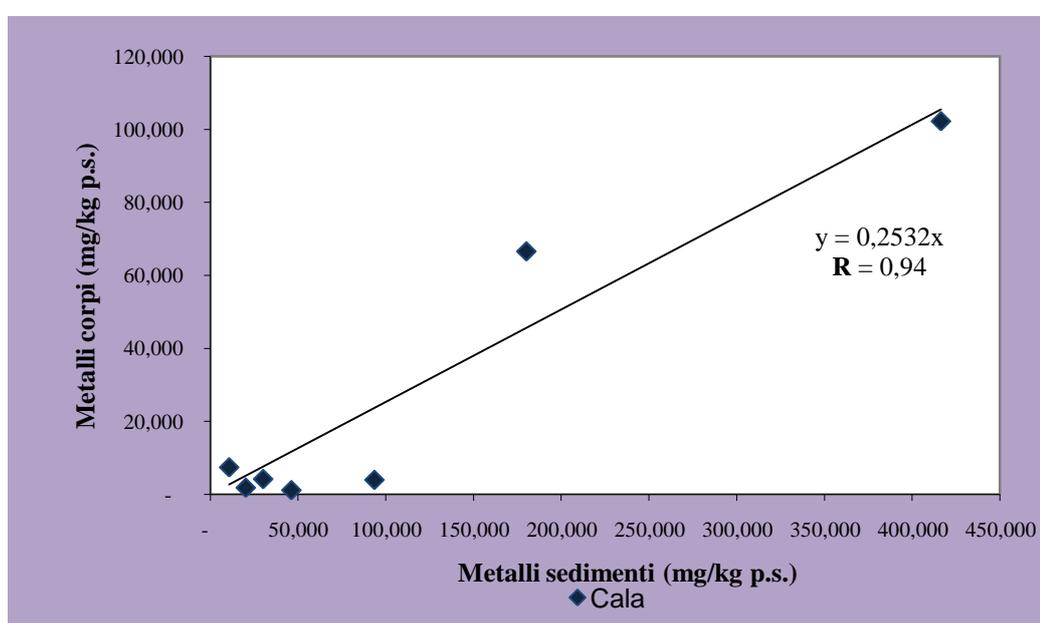


Fig. 103 - Correlazione tra le concentrazioni di metalli (mg/Kg p.s.) nei sedimenti dell'area di origine e nei tubi degli organismi di Cala, Licata e Acquasanta.

Anche in questo caso, come nei tubi, la buona correlazione nei siti Cala ed Acquasanta mostra in generale una buona capacità di bioaccumulo di *S. spallanzanii*, e quindi di un suo possibile utilizzo come bioindicatore.

Inoltre, è stata presa in considerazione la correlazione tra le concentrazioni degli analiti nei sedimenti dell'area di trapianto e quelle negli organismi trapiantati, e si può notare nella figura 104, che esiste una buona correlazione solo per gli organismi di Licata trapiantati a Cala (TL-C) e quelli di Acquasanta trapiantati a Cala (TA-C). I valori dei coefficienti di correlazione per i tre siti sono rispettivamente $r = 0,93$ per gli organismi di Licata trapiantati a Cala (TL-C), $r = 0,37$ per gli organismi di Acquasanta trapiantati a Licata (TA-

L), $r = 0,97$ per gli organismi di Acquasanta trapiantati a Cala (TA-C), e per gli organismi di Cala trapiantati a Licata (TC-L) $r = 0,924$.

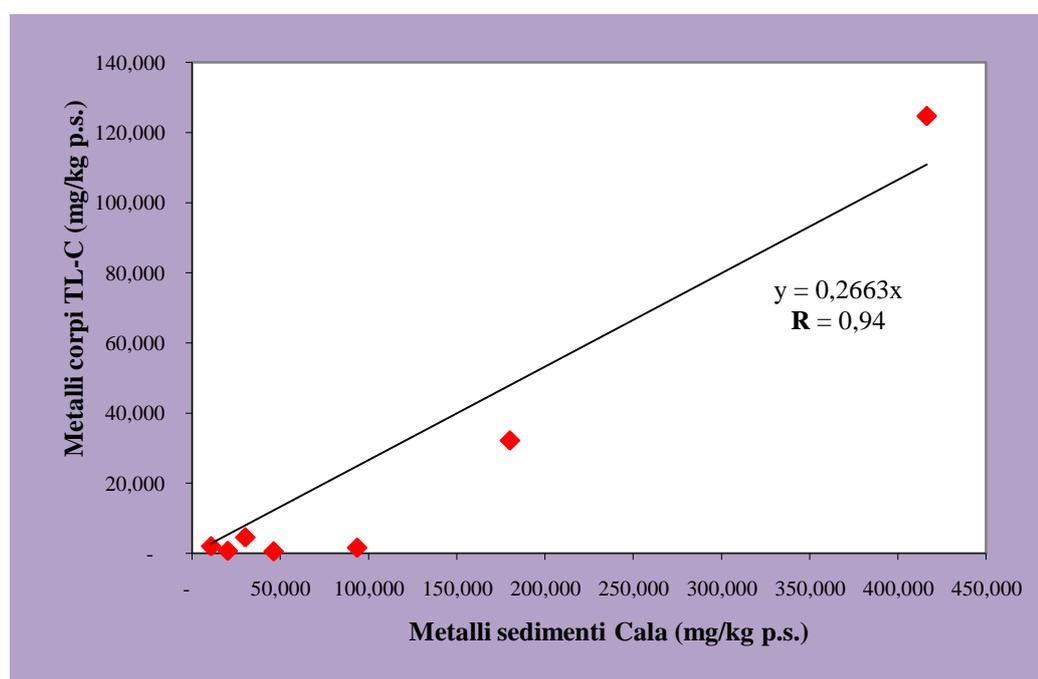


Fig. 104 - Correlazione tra le concentrazioni di metalli (mg/Kg p.s.) nei sedimenti dell'area di trapianto e nei tubi degli organismi trapiantati.

Pertanto anche queste correlazioni sono in accordo con i risultati ottenuti per i tubi. Probabilmente gli organismi di Cala e Acquasanta trapiantati a Licata non riescono a smaltire in 1 mese la quantità di metalli più di quanto non riescano a bioaccumulare, tale da rendere le concentrazioni ed essere paragonabili a quelle dei sedimenti del sito di trapianto. Per studiare la biodisponibilità e il bioaccumulo dei contaminanti è stato utilizzato, anche nel caso dei corpi, il *fattore di bioaccumulo (BAF)*.

Come si può osservare dalle figure 105, 106 e 107 gli organismi di Cala trapiantati a Licata (TC-L) smaltiscono dai loro tubi Cu, Pb, Zn e Hg, e bioaccumulano Cr, Cd, Ni, As e V. Gli organismi di Licata trapiantati a Cala (TL-C) bioaccumulano nei loro tubi Cu, Pb, Zn e Hg, ed eliminano tutti gli altri. Infine, gli organismi di Acquasanta trapiantati a Cala (TA-C) bioaccumulano nei loro tubi Cd, Zn e Pb, e smaltiscono lievemente gli altri analiti, e gli organismi di Acquasanta trapiantati a Licata (TA-L) bioaccumulano solo il Ni, ed eliminano Pb, Hg e As. Queste differenze tra i tubi del gruppo controllo TA e quelli dei gruppi trapiantati a Cala (TA-C) e a Licata (TA-C) sono in accordo con le differenze riscontrate

rispettivamente tra gruppi il controlli TC e TL e i rispettivi gruppi trapiantati a Cala (TC-L) e a Licata (TL-C).

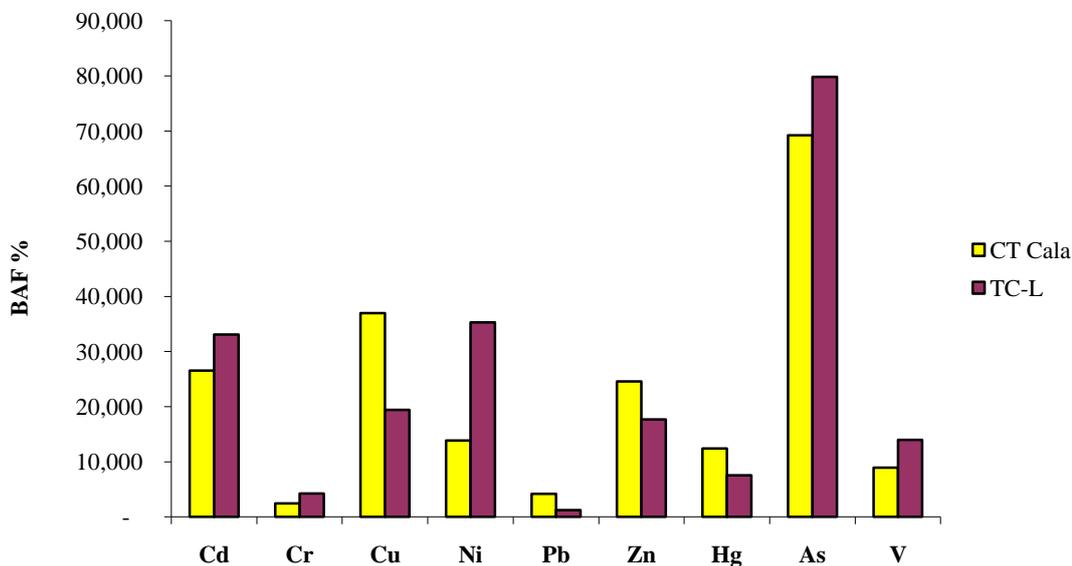


Fig. 105 - Fattore di bioaccumulo (BAF %) dei corpi degli organismi di Cala (CT Cala) e dei rispettivi trapiantati a Licata (TC-L).

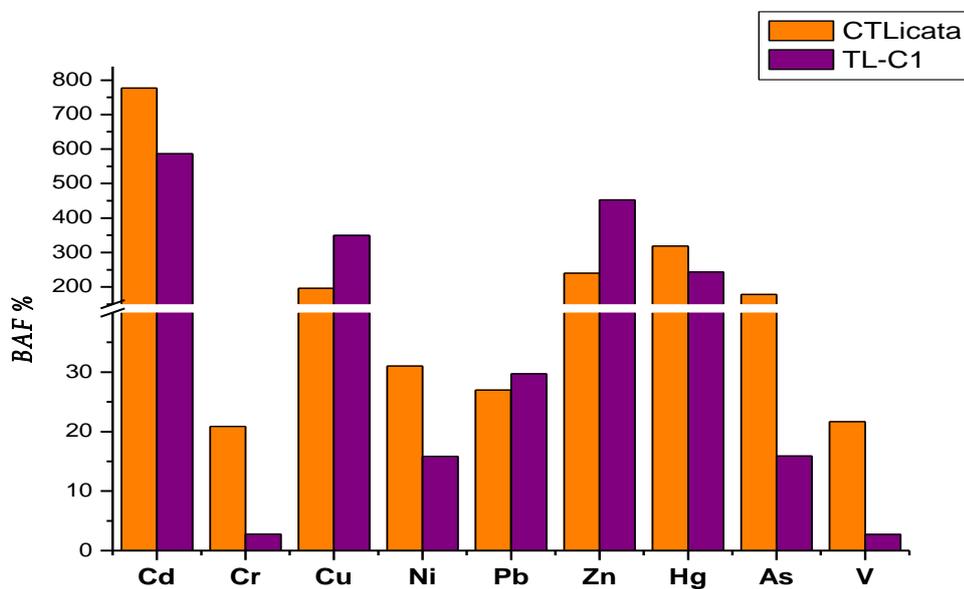


Fig. 106 - Fattore di bioaccumulo (BAF %) dei corpi degli organismi di Licata (CT Licata) e dei rispettivi trapiantati a Cala (TL-C).

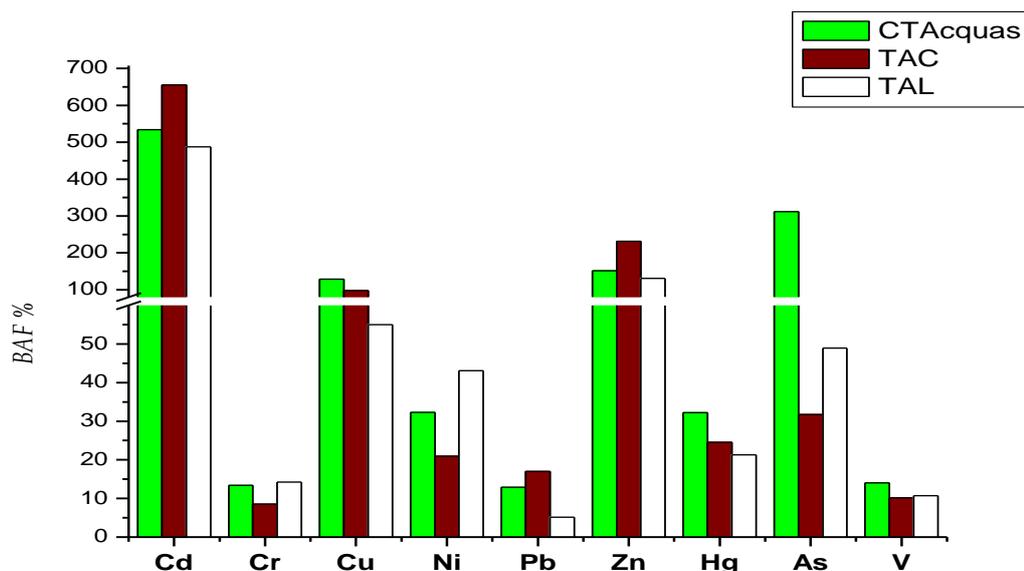


Fig. 107 - Fattore di bioaccumulo (BAF %) dei corpi degli organismi di Acquasanta (CT Acquasanta) e dei rispettivi trapiantati a Cala (TA-C) e a Licata (TA-L).

4.5.2 e - Confronto con i dati di letteratura

Diversi studi hanno riportato le concentrazioni in tracce dei metalli in diverse specie di policheti considerati come potenziali bioindicatori per questo tipo di contaminanti (Rainbow e Phillips, 1993).

La specie *Nereis diversicolor* è stata studiata in diverse condizioni ambientali, al fine di valutare il suo potenziale utilizzo come organismo bioindicatore per le specie metalliche come il Mn e Zn (Amiard *et al.* 1987; Saiz-Salinas e France's-Zubillaga 1997).

Nel presente studio, le concentrazioni di metalli analizzati in *S. spallanzanii* rientrano nei valori basali determinati da Bocchetti *et al.*, (2003), e sono dello stesso ordine di grandezza di quelli riportati per altre specie di policheti tipiche di ambienti contaminati e notevolmente più bassi rispetto a organismi prelevati da zone contaminate, dove sono presenti impianti di trattamento effluenti, emissari di depurazione, minerari e rifiuti industriali (Bryan e Hummerstone, 1977; Ahn *et al.*, 1995; Carral *et al.*, 1995; Saiz-Salinas *et al.*, 1996; Me'ndez e Pa `EZ-Osuna, 1998).

La variazioni nell'accumulo di metalli in tracce negli organismi marini è notoriamente influenzato da fattori ambientali e biologici, tra cui la stagione, le dimensioni corporee e il ciclo riproduttivo (Rainbow e Phillips. 1993). L'influenza di tali fattori non è stata considerata in questo studio preliminare di *S. spallanzanii*, in cui gli organismi analizzati per

ciascun esperimento sono stati raccolti nello stesso periodo ed erano di dimensioni simili, per ciascun esperimento. I livelli basali di arsenico sono stati determinate da Fattorini *et al.*, (2004) nei tessuti del polichete mediterraneo *S. spallanzanii* e sono pari a 1036 ± 136 $\mu\text{g/g}$ di peso secco di As totale nella corona branchiale e $47,5 \pm 19,1$ $\mu\text{g/g}$ di peso secco nel torace, quindi valori rispettivamente maggiori e simili a ciò che è stato riscontrato nei nostri campioni.

4.5.3 - Analisi multivariata nMDS

Per quanto riguarda gli organismi, con l'ordinamento nMDS (figure 108, 109, 110) vengono messe in luce le differenze di concentrazione dei metalli pesanti tra i gruppi controllo e i trapiantati, in particolare queste risultano più marcate nei corpi rispetto ai tubi di *S. spallanzanii*. Inoltre, queste differenze sono maggiori per gli organismi trapiantati a Cala, mostrando quindi che gli organismi rispondono alle nuove condizioni ambientali. Questi risultati hanno implicazioni sul ruolo e il possibile utilizzo di questo polichete come bioindicatore.

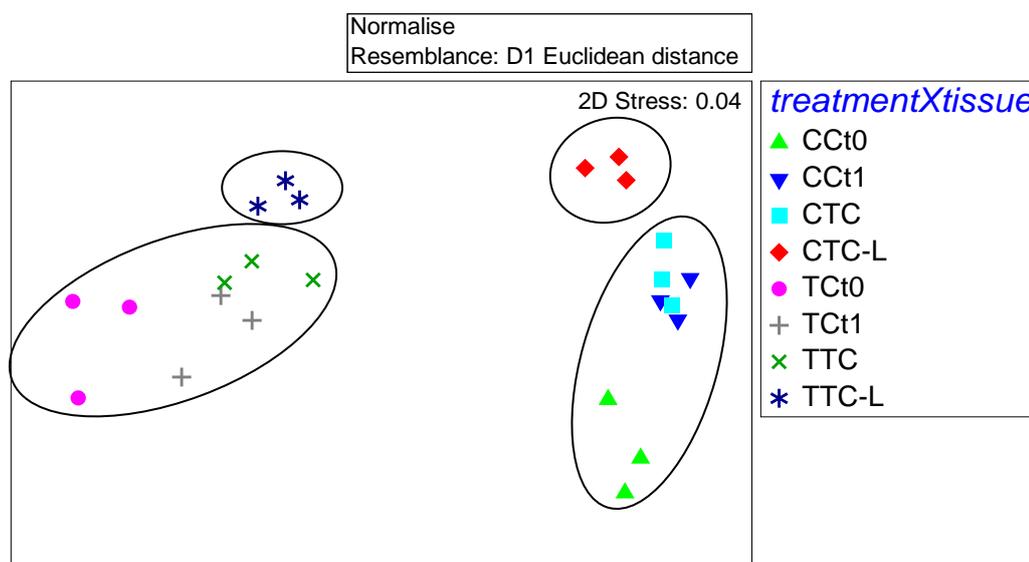


Fig. 108 – nMDS basato sulle distanze euclidee normalizzate dei valori delle concentrazioni di metalli pesanti nei tubi e nei corpi di *S. spallanzanii* dei gruppi controllo e trapiantati relativi all'esperimento di *transplanting* Cala-Licata.

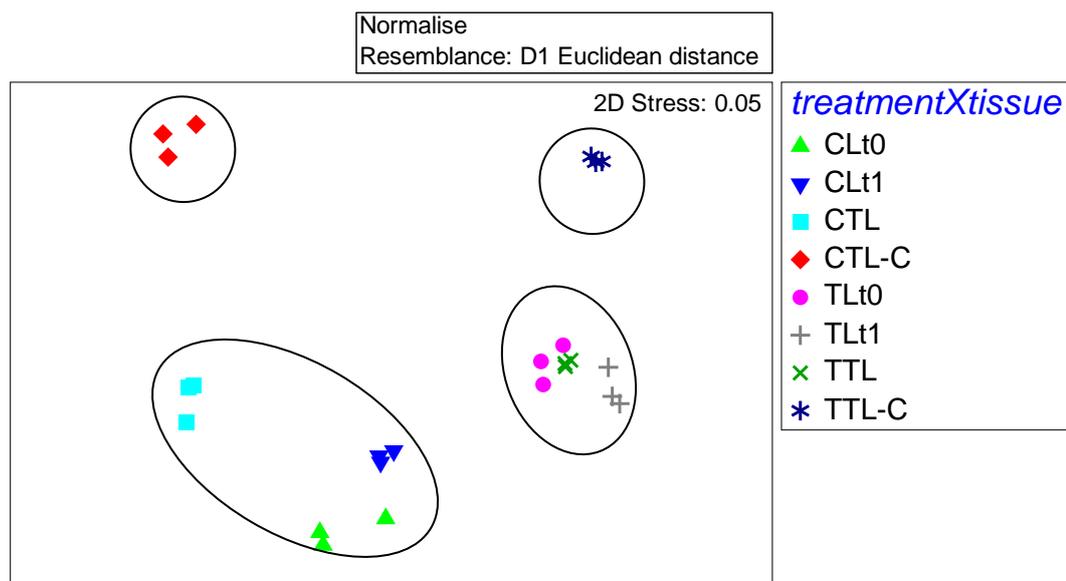


Fig. 109 – nMDS basato sulle distanze euclidee normalizzate dei valori delle concentrazioni di metalli pesanti nei tubi e nei corpi di *S. spallanzanii* dei gruppi controllo e trapiantati relativi all’esperimento di *transplanting* Licata-Cala.

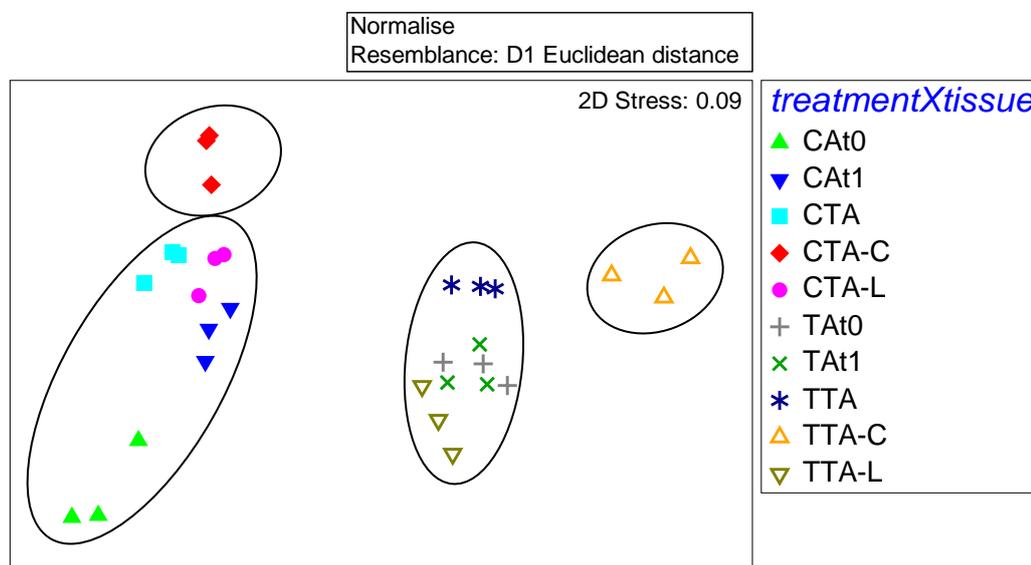


Fig. 110 – nMDS basato sulle distanze euclidee normalizzate dei valori delle concentrazioni di metalli pesanti nei tubi e nei corpi di *S. spallanzanii* dei gruppi controllo e trapiantati relativi agli esperimenti di *transplanting* Acquasanta-Cala e Acquasanta-Licata.

4.6 - Isotopi $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ in *Sabella spallanzanii*

I valori medi di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ e le relative deviazioni standard dei gruppi di *S. spallanzanii* coinvolti negli esperimenti di *transplanting* C-L, L-C, A-C, A-L, sono riportati nella tabella 39.

Tabella 39 – Media e deviazione standard (ds) dei rapporti isotopici di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ (‰) negli organismi e nei tubi di *S. spallanzanii* coinvolti negli esperimenti di *transplanting*.

	CORPI		TUBI			CORPI		TUBI			CORPI		TUBI	
	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$
C t0	3,1	-20,2	3	-18,9	L t0	6,9	-19,5	6,3	-17,5	A t0	6,3	-19,7	6,2	-15,7
ds	0,1	0,1	0,08	0,4	ds	0,09	0,06	0,1	0,5	ds	0,1	0,1	0,08	0,6
CT t1	3,4	-19,9	3,5	-18,7	L t1	6,7	-19,8	6,7	-17,6	A t1	6,3	-19,9	6,3	-15,4
ds	0,07	0,07	0,07	0,4	ds	0,04	0,04	0,1	1	ds	0,01	0,1	0,3	0,8
TC	3,4	-19,6	3,6	-18,3	TL	6,6	-19,7	6,4	-17,6	TA	6,3	-20,2	6	-16,5
ds	0,03	0,1	0,3	0,4	ds	0,09	0,03	0,1	1	ds	0,06	0,2	0,2	0,3
TC-L	4	-20,8	3,4	-18,5	TL-C	6,3	-19,5	6	-17,8	TA-C	6,2	-19,4	6	-16
ds	0,09	0,1	0,2	0,4	ds	0,1	0,1	0,2	0,7	ds	0,1	0,2	0,8	0,4
										TA-L	6,5	-19,5	6,4	-16
										ds	0,1	0,1	0,05	1

o riguarda il primo esperimento di *transplanting* Cala-Licata (tabella 39), gli organismi trapiantati a Licata (TC-L) hanno presentato i valori di $\delta^{15}\text{N}$ più arricchiti (in media $4\pm 0,09\%$) ed i valori di $\delta^{13}\text{C}$ più impoveriti (in media $-20,4\pm 0,1\%$). Gli altri organismi dei gruppi controllo Ct₀, Ct₁ e TC hanno mostrato valori di $\delta^{15}\text{N}$ paragonabili (in media rispettivamente $3,1\pm 0,05\%$, $3,4\pm 0,07\%$ e $3,4\pm 0,03\%$) ed i valori di $\delta^{13}\text{C}$ sono rispettivamente $-20,2\pm 0,1\%$, $-19,9\pm 0,07\%$ e $-19,6\pm 0,1\%$. I tubi degli organismi controllo Ct₀, Ct₁, TC e dei trapiantati a Cala (TC-L) hanno mostrato invece valori di $\delta^{15}\text{N}$ paragonabili (in media rispettivamente $3\pm 0,08\%$, $3,5\pm 0,07\%$, $3,6\pm 0,3\%$ e $3,4\pm 0,2\%$) ed i valori di $\delta^{13}\text{C}$ sono rispettivamente $-18,9\pm 0,4\%$, $-18,7\pm 0,4\%$, $-18,3\pm 0,04\%$ e $18,5\pm 0,04\%$. Inoltre, come si può osservare in figura 111, i valori dei rapporti isotopici di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ negli organismi trapiantati da Cala a Licata (TC-L), sono quelli che più si avvicinano ai valori dei sedimenti del sito di trapianto (Licata) rispetto agli organismi controllo Ct₀, Ct₁ e TC.

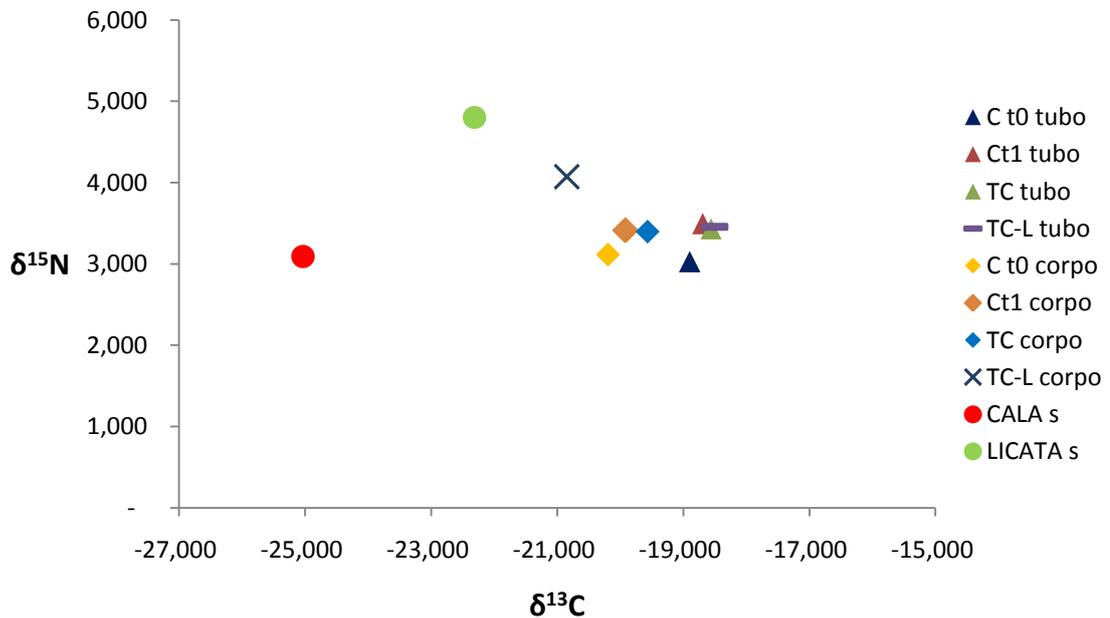


Fig. 111 – Valori dei rapporti isotopici di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ in *S. spallanzanii* del *transplantig* Cala-Licata.

Per quanto concerne l'esperimento di *transplantig* Licata-Cala (tabella 39), gli organismi controllo Lt_0 hanno presentato i valori di $\delta^{15}\text{N}$ più arricchiti rispetto agli organismi degli altri trattamenti (in media $6,9 \pm 0,09\text{‰}$), ed il valore medio di $\delta^{13}\text{C}$ è $-19,5 \pm 0,06\text{‰}$. Gli organismi trapiantati a Cala (TL-C) hanno presentato, invece, i valori di $\delta^{15}\text{N}$ più impoveriti (in media $6,3 \pm 0,1\text{‰}$), ed il valore medio di $\delta^{13}\text{C}$ è $-19,5 \pm 0,1\text{‰}$. Gli altri organismi dei gruppi controllo Lt_1 e TL hanno mostrato invece valori di $\delta^{15}\text{N}$ paragonabili, (in media rispettivamente $6,7 \pm 0,04\text{‰}$, $6,6 \pm 0,03\text{‰}$) ed i valori di $\delta^{13}\text{C}$ sono $-19,8 \pm 0,04\text{‰}$ e $-19,7 \pm 0,03\text{‰}$. I tubi degli organismi trapiantati a Cala (TL-C) hanno presentato i valori di $\delta^{15}\text{N}$ più impoveriti (in media $3 \pm 0,08\text{‰}$), ed il valore medio di $\delta^{13}\text{C}$ è $-19,5 \pm 0,06\text{‰}$. I tubi degli organismi controllo Lt_0 , Lt_1 e TL hanno mostrato invece valori di $\delta^{15}\text{N}$ paragonabili (in media rispettivamente $3,5 \pm 0,07\text{‰}$, $3,6 \pm 0,3\text{‰}$ e $3,4 \pm 0,2\text{‰}$) ed i valori di $\delta^{13}\text{C}$ sono $-19,8 \pm 0,04\text{‰}$, $-19,7 \pm 0,03\text{‰}$, $-19,5 \pm 0,03\text{‰}$, $-19,5 \pm 0,1\text{‰}$. Pertanto, come viene mostrato in figura 112, i valori dei rapporti isotopici di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ negli organismi trapiantati da Licata (TL-C), si discostano meno dai valori dei sedimenti del sito di origine (Licata) piuttosto che da quelli del sito di trapianto (Cala).

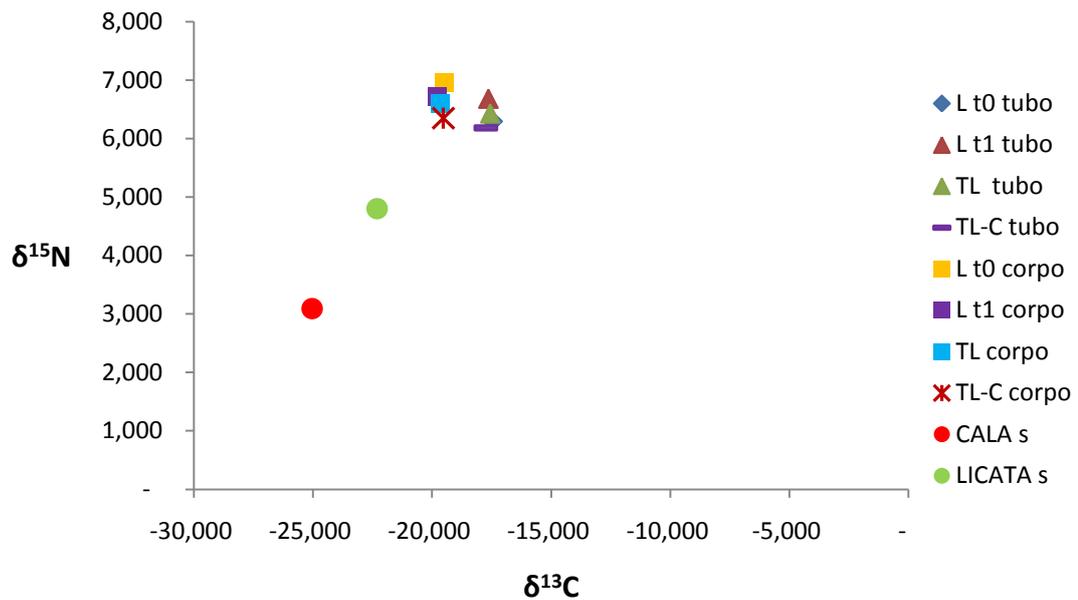


Fig. 112 – Valori dei rapporti isotopici di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ *S. spallanzanii* del *transplantig* Licata-Cala.

Infine, per quanto riguarda gli esperimenti di *transplantig* Acquasanta-Cala/Acquasanta-Licata (tabella 39), tutti gli organismi At_0 , At_1 , TA, TCA-C e TA-L presentano i valori paragonabili di $\delta^{15}\text{N}$ (in media rispettivamente $6,3 \pm 0,1\text{‰}$, $6,3 \pm 0,01$, $6,3 \pm 0,06\text{‰}$, $6,2 \pm 0,1\text{‰}$, $6,5 \pm 0,1\text{‰}$). I valori di $\delta^{13}\text{C}$ sono invece $-19,7 \pm 0,1\text{‰}$, $-19,9 \pm 0,1\text{‰}$, $-20,2 \pm 0,2\text{‰}$, $-19,4 \pm 0,2\text{‰}$ e $-19,5 \pm 0,1\text{‰}$.

Anche i tubi degli organismi At_0 , At_1 , TA, TCA-C e TA-L presentano i valori paragonabili di $\delta^{15}\text{N}$ (in media rispettivamente $6,2 \pm 0,08\text{‰}$, $6,3 \pm 0,3$, $6 \pm 0,2\text{‰}$, $6 \pm 0,8\text{‰}$, $6,4 \pm 0,05\text{‰}$). I valori di $\delta^{13}\text{C}$ sono invece $-15,4 \pm 0,6\text{‰}$, $-15,7 \pm 0,8\text{‰}$, $-16,5 \pm 0,3\text{‰}$, $16 \pm 0,4\text{‰}$ e $16 \pm 1\text{‰}$. Come si può osservare in figura 113, anche in questo caso i valori dei rapporti isotopici di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ negli organismi trapiantati da Acquasanta (TA-C, TA-L), si discostano poco dai valori dei sedimenti del sito di origine (Acquasanta).

Il metodo d'indagine che utilizza gli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto come traccianti dei percorsi della materia organica nell'ambito delle reti trofiche, risulta importante anche nella determinazione di variazioni nella dieta di organismi che subiscono variazioni nello spazio e nel tempo. Come è possibile osservare nelle figura 109, soltanto i valori dei rapporti isotopici del carbonio e dell'azoto negli organismi trapiantati a Licata (TC-L) suggeriscono la presenza di variazioni spaziali e temporali.

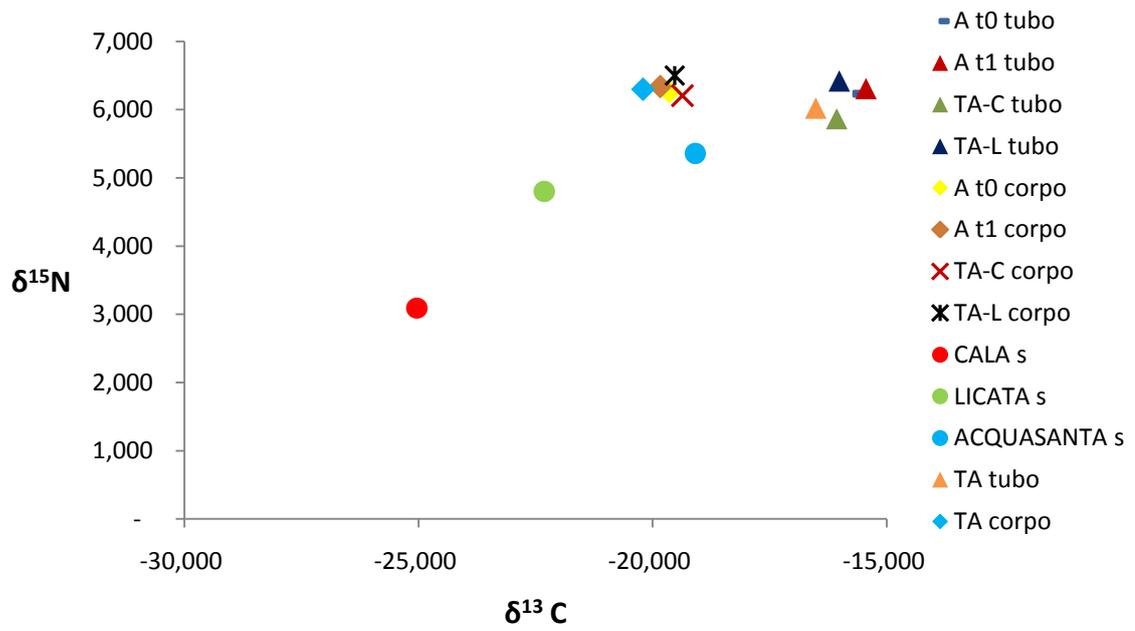


Fig. 113 – Valori dei rapporti isotopici di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ *S. spallanzanii* del *transplantig* Acquasanta-Cala/Acquasanta-Licata.

4.7 - Acetilcolinesterasi (AChE) e glutazione S-transferasi (GST)

Le attività degli enzimi acetilcolinesterasi (AChE) e glutazione-s-transferasi (GST) sono state saggiate nei gruppi controllo e trapiantati di *S. spallanzanii*, utilizzando rispettivamente i substrati acetiltiocolina (ASCh) e glutazione (GHT). I

valori di attività sono espressi in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ di proteine e sono riportati nella tabella 40. I valori dell'analisi statistica della variazione (ANOVA) sono riportati nella tabella 41.

Tabella 40 - Valori dell'attività AChE e GST nei gruppi controllo e trapiantati di *S. spallanzanii*, e le relative deviazioni standard.

$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$					$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$						
Ct0	105±8	Lt0	113±7	At0	77±5	Ct0	54±3	Lt0	66±1	At0	85±6
Ct1	79±7	Lt1	83±4	At1	62±5	Ct1	67±3	Lt1	76±4	At1	76±6
TC	85±10	TL	86±6	TA	55±4	TC	64±3	TL	64±1	TA	69±6
TC-L	68±7	TL-C	48±4	TA-C	42±1	TC-L	72±2	TL-C	93±1	TA-C	84±3
Treatment				TA-L	51±1					TA-L	73±3

Tabella 41 – Analisi statistica di variazione (ANOVA) per i dati parametrici. [* = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$; Ns = differenza non significativa ($P > 0.05$)].

ANOVA AChE				
Source	DF	MS	F	P
Area	3	2047,5262	128,72	0 ***
Treatment	3	3453,4923	217,11	0 ***
Area x Treatment	9	199,1469	12,52	0 ***
Residuals	32	15,9069		
TC-L<TC=Ct1<Ct0	TL-C<Lt1=TL<Lt0	TA-C<TA<At1<At0	TA-L=TA<At1<At0	
ANOVA GST				
Source	DF	MS	F	P
Area	3	481,8072	27,43	0 ***
Treatment	3	381,2667	21,71	0 ***
Area x Treatment	9	198,9735	11,33	0 ***
Residuals	32	17,5642		
Ct0<Ct1=TC=TC-L	TL=Lt0<Lt1<TL-C	TA=At1<TA-C=At0	TA=TA-L=At1<At0	

L'attività acetilcolinesterasica in *S. spallanzanii* è presente sia nei gruppi controlli che in quelli trapiantati, e rientra nei valori basali determinati da Perez *et al.*, (2004), Montserrat *et al.*, (2008) in altre specie di anellidi.

Per quanto riguarda l'esperimento di *transplantating* Cala-Licata, confrontando i valori dell'attività enzimatica, si può osservare in figura 114 come essa diminuisca in modo significativo ($p < 0,001$) passando dal controllo Ct₀ ai controlli Ct₁ e TC, e passando dal controllo TC al trapiantato a Licata (TC-L). Nei controlli Ct₁ e TC l'attività acetilcolinesterasica diminuisce, rispetto al controllo Ct₀, rispettivamente del 24% e 19%. Nel trapiantato a Licata (TC-L) l'attività acetilcolinesterasica diminuisce, rispetto al controllo TC del 20%.

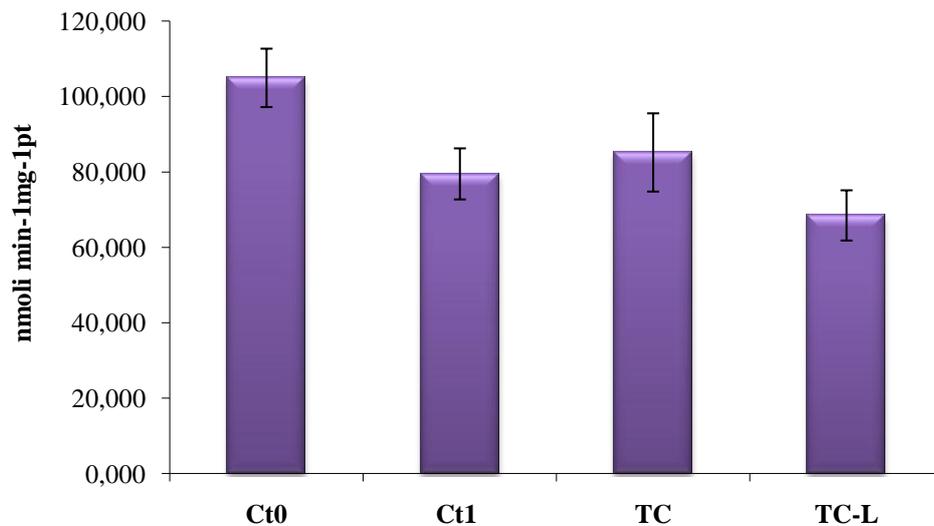


Fig. 114 – Attività AChE nei controlli Ct₀, Ct₁ e TC e trapiantati TC-L di *S. spallanzanii*.

Per quanto concerne l'esperimento di *transplantating* Licata-Cala, confrontando i valori dell'attività acetilcolinesterasica si può osservare in figura 115 come essa diminuisca in modo significativo ($p < 0,001$) passando dal controllo Lt₀ ai controlli Lt₁ e TL, e passando dal controllo TL al trapiantato a Cala (TL-C). Negli organismi dei controlli Lt₁ e TL i valori dell'attività acetilcolinesterasica risultano essere più bassi del controllo Lt₀ rispettivamente del 26% e 24%. Nel trapiantato a Cala (TL-C) l'attività acetilcolinesterasica diminuisce, rispetto al controllo TL del 44%.

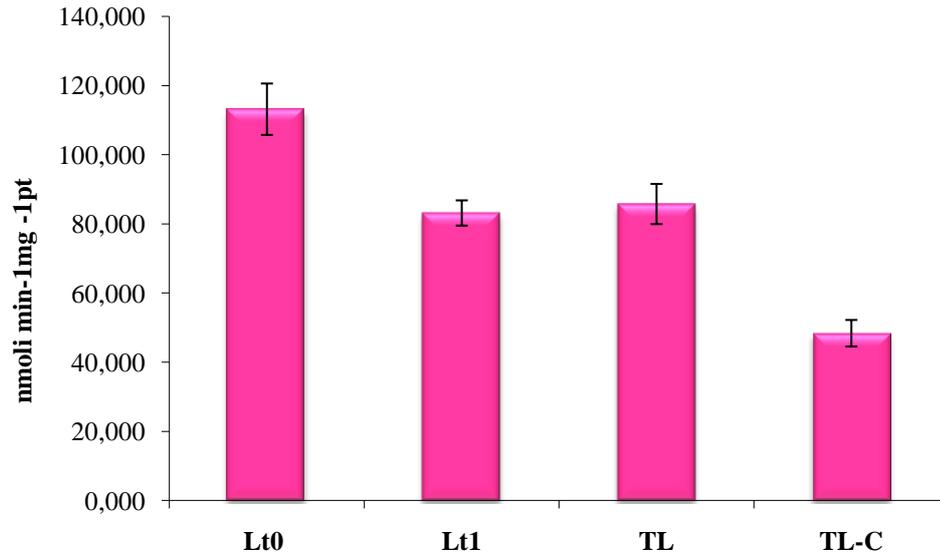


Fig. 115 – Attività AChE nei controlli Lt₀, Lt₁ e TL e trapiantati TL-LC di *S. spallanzanii*.

Infine, per quanto riguarda gli esperimenti di *transplantating* Acquasanta-Cala e Acquasanta-Licata, confrontando i valori dell'attività enzimatica, essa diminuisce in modo significativo ($p < 0,001$) passando dal controllo At₀ ai controlli At₁ e TA, e passando dal controllo TA al trapiantato a Cala (TA-C). Non c'è nessuna apprezzabile differenza tra il controllo TA e il trapiantato a Licata (TA-L) (figura 116).

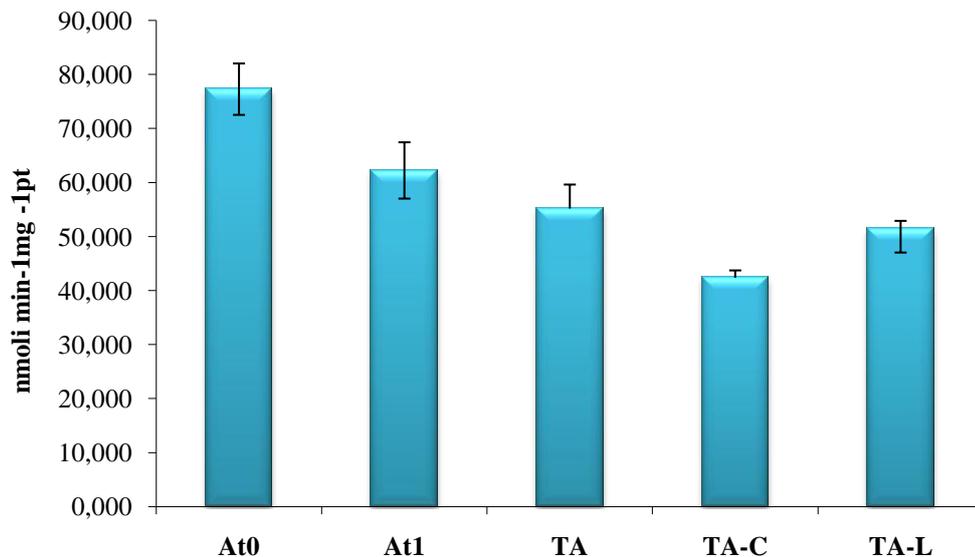


Fig. 116 – Attività AChE nei controlli At₀, At₁ e TA e trapiantati TA-C e TA-L di *S. spallanzanii*.

Negli organismi dei gruppi controllo At₁ e TA i valori dell'attività acetilcolinesterasica risultano essere più bassi dei gruppi controlli At₀ rispettivamente del 19% e 28%. Nei

trapiantati a Cala (TA-C) l'attività acetilcolinesterasica diminuisce rispetto al controllo TA, del 23%.

Considerando tutti e tre gli esperimenti, la riduzione dell'attività AChE nei controlli t_1 rispetto ai controlli t_0 , potrebbe dipendere da altri fattori ambientali, quali ad esempio le variabili chimico-fisiche delle acque (temperatura, pH, salinità, ecc), che si suppone possano incidere sull'attività enzimatica analizzata. L'assenza di differenze significative tra il controllo t_1 e i *transplant in situ* esclude la possibile influenza dello stress da trasferimento sull'attività acetilcolinesterasica.

Le differenze più significative rispetto ai *transplant in situ* (TC, TL, TA) sono state riscontrate per i trapiantati a Cala (TL-C, TA-C).

Questi risultati sono in accordo con quelli precedentemente ottenuti, riguardanti la presenza di IPA e metalli pesanti nei tre siti e negli organismi, e che hanno messo in luce un livello di contaminazione maggiore nel sito Cala e negli organismi di questo sito.

Inoltre, la riduzione dell'attività AChE nei trapiantati a Licata da Cala (TC-L), seppur più bassa, potrebbe far pensare alla possibile influenza di altri fattori, come la presenza di altri contaminanti che non stati presi in considerazione durante questo studio.

Pertanto, la vicinanza dell'area portuale di Licata alla foce del fiume Sarso, che può risultare essere il principale veicolo per l'introduzione in questo tratto di mare di sostanze inquinanti, come è noto in generale per i corsi d'acqua superficiali (Cruzado *et al.*, 2001), potrebbe spiegare e giustificare la presenza di altri xenobiotici, quali pesticidi o detergenti, nell'area portuale.

L'AChE è un enzima coinvolto nella trasmissione sinaptica degli impulsi nervosi ed è comunemente inibita da composti neurotossici come organofosfati e carbammati (Jain-Rang *et al.*, 1998; Yadav *et al.*, 1998; Gill *et al.*, 1990; Rao *et al.*, 1991; Chambers *et al.*, 1992; Sanchez-Hernandez *et al.*, 1998; Fulton e Key, 2001).

Recentemente, il suo campo di applicazione nei programmi di biomonitoraggio, è stato segnalato per essere meno specifico, quindi adesso potrebbe essere considerato come *biomarker* generico di esposizione a contaminanti neurotossici compresi i metalli pesanti (Guilhermino *et al.*, 1998; Sturm *et al.*, 1999; Ait Alla *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2006; Durou *et al.*, 2007), gli idrocarburi policiclici aromatici e gli organoclorurati (Gill *et al.*, 1990a, 1990b; Bocquene *et al.*, 1990; Sturm *et al.*, 1999; Guilhermino *et al.*, 2000; Akcha *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2008; Buet *et al.*, 2008), detergenti (Regoli *et al.*, 1995; Payne *et al.*, 1996), tossine algali (Lehtonen *et al.*, 2003) e composti in misture complesse (Dellali

et al., 2001). Alcuni studi hanno mostrato una buona correlazione tra l'attività AChE e la concentrazione degli IPA nei corpi di anellidi (Jaw-Jou Kang e Huan-Wen Fang, 1997). L'attività glutazione S-transferasica in *S. spallanzanii* è presente sia nei gruppi controllo che in quelli trapiantati e rientra nei valori basali determinati da Bocchetti *et al.*, (2003). Per quanto riguarda l'esperimento di *transplantating* Cala-Licata, confrontando i valori di tale attività, si può osservare in figura 117 come essa aumenti in modo significativo ($p < 0,001$) passando dal controllo Ct_0 ai controlli Ct_1 e TC, e al trapiantato (TC-L). Nessuna differenza significativa può essere riscontrata tra il controllo TC e il trapiantato (TC-L). Nei controlli Ct_1 e TC l'attività glutazione S-transferasica aumenta, rispetto al controllo Ct_0 rispettivamente del 20% e 16%.

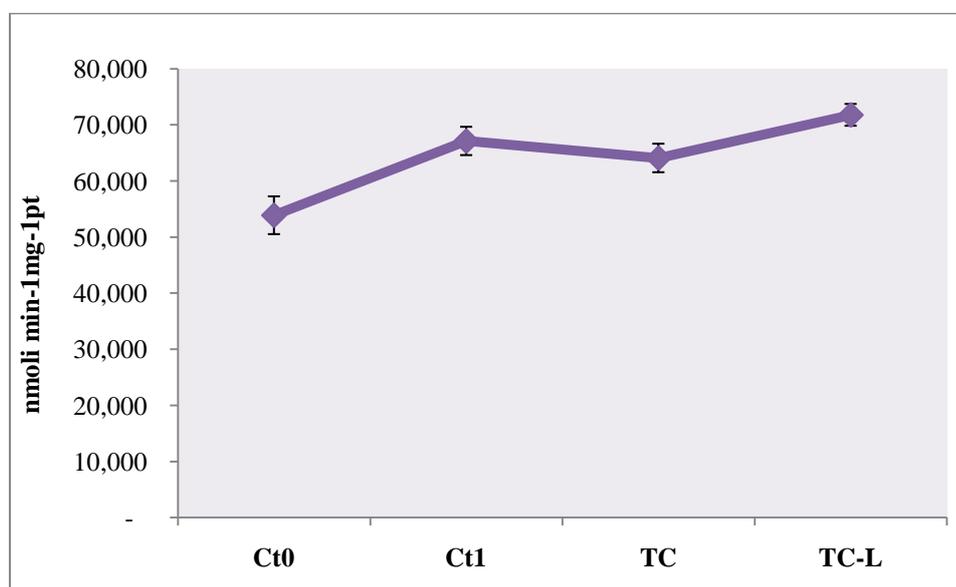


Fig. 117 – Attività GST nei controlli Ct_0 , Ct_1 e TC e trapiantati TC-L di *S. spallanzanii*.

Per quanto concerne l'esperimento di *transplantating* Licata-Cala, confrontando i valori dell'attività glutazione S-transferasica, si può osservare in figura 118 come essa aumenti in modo significativo ($p < 0,001$) passando dal controllo Lt_0 ai controlli Lt_1 , e passando dal controllo TL al trapiantato (TL-C). Nessuna differenza significativa viene riscontrata tra il controllo Lt_0 e il controllo TL. Negli organismi del gruppo controllo Lt_1 i valori dell'attività glutazione S-transferasica risultano essere più bassi del controllo Lt_0 del 13%. Nel trapiantato a Licata (TC-L) l'attività enzimatica diminuisce, rispetto al controllo TC, del 31%.

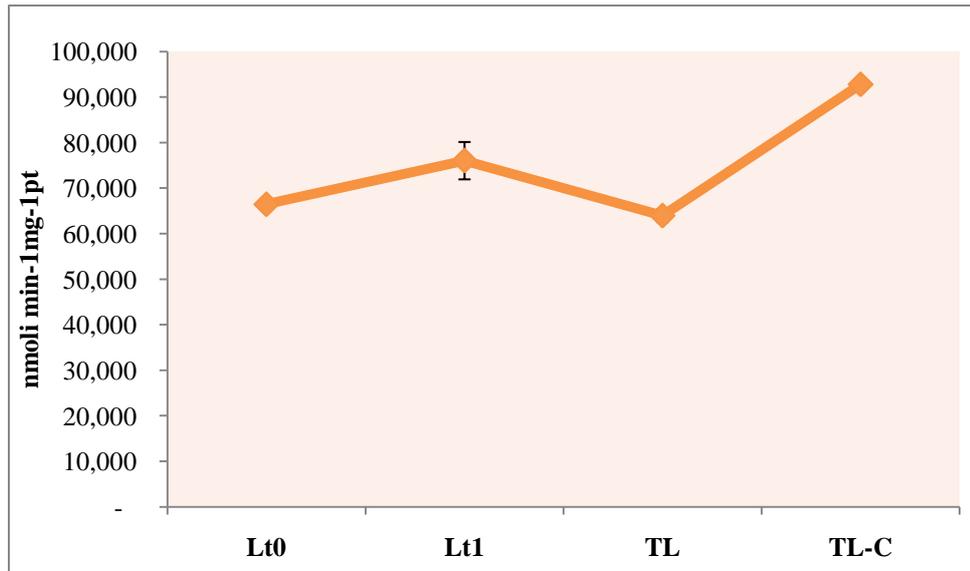


Fig. 118 – Attività GST nei controlli Lt₀, Lt₁ e TL e trapiantati TL-LC di *S. spallanzanii*.

Infine, per quanto riguarda gli esperimenti di *transplanting* Acquasanta-Cala e Acquasanta-Licata, confrontando i valori di tale attività (GST), come viene mostrato in figura 119, essa diminuisce in modo significativo ($p < 0,001$) passando dal controllo At₀ ai controlli At₁ e TA. L'attività GST aumenta in modo significativo ($p < 0,001$) passando dal controllo TA al trapiantato TA-C.

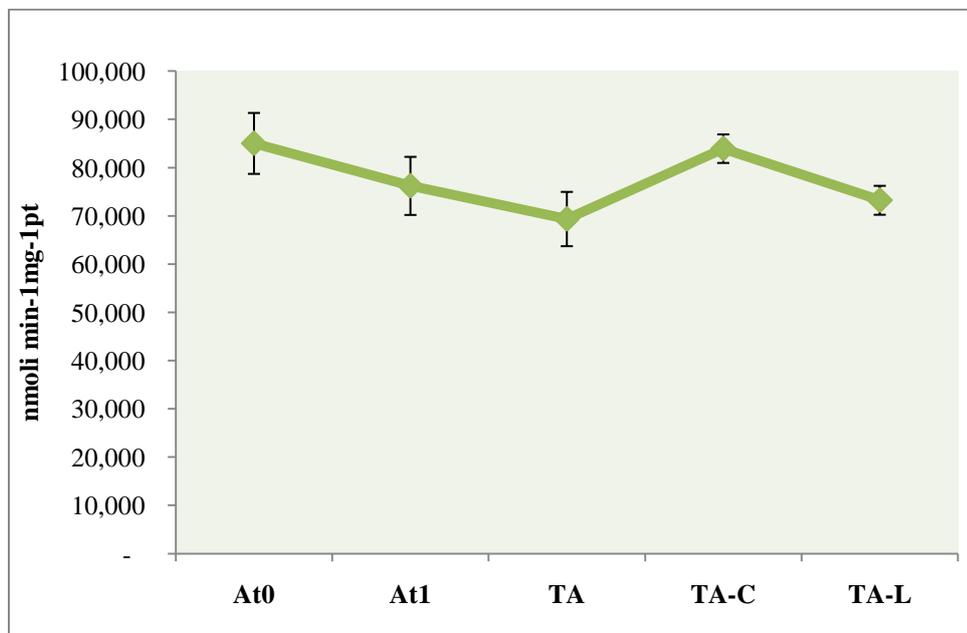


Fig. 119 – Attività AChE nei controlli At₀, At₁ e TA e trapiantati TA-C e TA-L di *S. spallanzanii*.

Nessuna differenza significativa viene riscontrata tra il controllo TA e il trapiantato (TA-L). Negli organismi dei gruppi controllo At₁ e TA i valori dell'attività acetilcolinesterasica risultano essere più bassi dei gruppi controlli At₀ rispettivamente del 10% e 18%. Nei trapiantati a Cala e Licata l'attività glutatione-s-transferasica diminuisce rispettivamente ai controlli TA, del 17% e 6%.

Anche nel caso della GST, le differenze tra l'attività enzimatica nei controlli t₁ e quella nei controlli t₀, potrebbero far supporre a un'influenza di altri fattori ambientali. Soltanto durante l'esperimento di *transplant* a Cala si è potuto evidenziare una possibile risposta enzimatica da stress da trasferimento.

Le differenze più significative, rispetto ai *transplant in situ* (TC, TL, TA) sono state riscontrate, anche in questo caso, per i trapiantati a Cala (TL-C, TA-C).

Gli enzimi antiossidanti sono stati già descritti in alcune specie di policheti come *Nereis diversicolor* (Abele-Oeschger *et al.* 1994), *Phyllodoce mucosa* (Abele-Oeschger e Oeschger 1995), *Arenicola marina* (Buchner *et al.* 1996), *Heteromastus filiformis* (Abele *et al.* 1998b), *Eurithoe complanata* (Nusetti *et al.* 2001), *Laeonereis acuta* (Geracitano *et al.* 2002a).

Bocchetti *et al.*, (2003) hanno mostrato che in *S. spallanzanii* la corona branchiale è caratterizzata da una maggiore attività enzimatica della superossido dismutasi, glutatione S-transferasi, glutatione reduttasi e glutatione perossidasi e anche da una maggiore efficienza di assorbimento dei radicali perossilici rispetto al torace.

È noto che l'enzima GST interviene nella detossificazione di inquinanti elettrofili e pertanto una più alta attività enzimatica, come evidenziata negli esemplari di *S. spallanzanii* trapiantati a Cala, riflette una condizione di stress ossidativo indotta da agenti proossidanti ai quali gli esemplari sono esposti. I valori dell'attività glutatione S-transferasica riscontrati in *S. spallanzanii* in questa ricerca sembrano essere in accordo con quelli riportati da altri autori che, in studi di campo, hanno indicato per gli esemplari esposti a metalli pesanti (Lenártová *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 2001) e per quelli esposti a PCBs e PAHs (Vigano *et al.*, 1995) un'induzione della GST.

L'influenza delle miscele complesse di contaminanti sulle comunità naturali è poco conosciuta (Breitburg *et al.*, 1999). Sono stati condotti relativamente pochi studi di tossicità *in vivo* (Steevens e Benson, 2001), e studi sul campo di miscele di contaminanti riguardano le correlazioni tra concentrazione dei contaminanti e composizione della comunità (Tietjen e Lee, 1984; Peeters *et al.*, 2001). Alcuni studi di laboratorio hanno mostrato che l'effetto congiunto di contaminanti, come i metalli e gli IPA, è pari alla

somma delle risposte dei contaminanti singoli (Swartz *et al.*, 1995; US EPA, 1986; Millward *et al.*, 2004). Questo effetto, chiamato “*respons addition*”, prevede che ogni singolo organismo abbia una specifica tolleranza per ogni contaminante, e che la tossicità venga espressa solo se la concentrazione/dose soglia combinata venga superata.

Swartz *et al.* (1995) hanno stabilito che l'influenza tossica dei singoli IPA è essenzialmente additiva quando gli organismi sono esposti a miscele di IPA. Broderius *et al.* (1995) hanno rilevato alcuni casi di interazioni sinergiche o antagoniste tra una vasta gamma di contaminanti organici. Hagopian-Schlekat *et al.* (2001), tuttavia, hanno stabilito che una miscela di metalli (Cu, Pb, Ni, Zn) è stata significativamente tossica nel copepode harpacticoide più di quanto non lo sarebbero i singoli metalli. In pochi casi esaminati, sono state osservate complesse interazioni (sinergie o antagonismi) di miscele di metalli e idrocarburi (Vandenhurk *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 1999).

Le differenze di attività enzimatica (AChE e GST) dei trapiantati a Cala rispetto ai controlli, potrebbero essere causate sia dalle diverse concentrazioni dei singoli inquinanti, o miscele di essi ai quali le specie sono esposte, sia alle diverse condizioni ambientali.

Secondo Bocquene e Galgani, (1998), la variabilità naturale dell'attività di AChE non è direttamente legata all'età, al sesso o al periodo di riproduzione dell'organismo, la temperatura emerge come il più importante fattore di regolazione. Infatti, diversi fattori ambientali possono influire sull'attività antiossidante in specie di policheti, quali fluttuazioni annuali di irradiazione solare, variazioni di temperatura dell'acqua e concentrazione di ossigeno e l'esposizione a sostanze chimiche inquinanti (Abele-Oeschger *et al.*, 1994; Abele-Oeschger e Oeschger, 1995; Buchner *et al.*, 1996; Abele *et al.*, 1998b; Nusetti *et al.* 2001). La variabilità del livello di attività degli enzimi antiossidanti è presumibilmente collegato con lo stato metabolico dell'organismo che dipende da fattori come la temperatura, la maturazione delle gonadi e la disponibilità di cibo (Viarengo *et al.* 1991; Regoli, 1998; Power e Sheehan, 1996; Vidal *et al.*, 2002).

L'aumento dei livelli di attività di GST osservato in *M. edulis* è stato osservato che può anche essere associata alla presenza di un'intensa fioritura tossica cianobatterica molto comune nelle aree di transizione durante la stagione estiva (Sivonen *et al.*, 1989; Kononen *et al.*, 1993). Il metabolismo di epatotossine cianobatteriche coinvolge la fase II di disintossicazione mediata dalle GST (Pflugmacher *et al.*, 1998).

Negli ultimi 10 anni, studi condotti sui *biomarkers* di esposizione agli inquinanti di ambienti acquatici, hanno evidenziato la necessità di integrare alle interazioni di fattori abiotici (temperatura, salinità, la torbidità, dieta, ecc) quelle dei fattori biotici (ciclo di

riproduzione, crescita, età, sesso, ecc) (Norton *et al.*, 2000; Porte *et al.*, 2001; Ringwood *et al.*, 2002; Kagley *et al.*, 2003). La valutazione delle variazioni stagionali dei *biomarkers* e la determinazione dei livelli basali in organismi modello raccolti in *habitat* specifici, così come valutazione dei fattori fisiologici (crescita, respirazione, riproduzione), costituiscono una strategia di ricerca ampiamente raccomandata oggi (Smolders *et al.*, 2002).

Una combinazione di fattori biochimici, fisiologici e genetici possono essere utili per chiarire la reale influenza dei contaminanti (Ross *et al.*, 2002).

Un ideale *biomarker* dovrebbe non mostrare variazioni stagionali, in risposta a fattori quali l'approvvigionamento di cibo o lo stato riproduttivo e varierebbe solo in risposta all'esposizione di sostanze inquinanti, ma in pratica questo accade raramente (Sheehan e Power, 1999).

4.8 – Analisi statistica su tutte le variabili dei tubi e dei corpi di *Sabella spallanzanii*.

L'analisi multivariata con l'ordinamento nMDS, basata sulle distanze euclidee normalizzate dei valori di tutte le variabili studiate nei tubi (figure 120, 121 e 122) e nei corpi (figure 123, 124 e 125) di *S. spallanzanii* relativi agli esperimenti di *transplantating* Cala-Licata, Licata-Cala, Acquisanta-Cala e Acquisanta-Licata, ha permesso di ricavare i grafici bidimensionali, dove sono rappresentati con dei punti i diversi trattamenti coinvolti in ciascuno dei quattro esperimenti.

L'nMDS ha messo in evidenza le differenze spaziali e temporali tra i gruppi controllo e i trapiantati, in particolare queste risultano più marcate nei corpi di *S. spallanzanii*.

Inoltre, queste differenze sono maggiori per gli organismi trapiantati a Cala, mostrando quindi che qui gli organismi rispondono meglio alle nuove condizioni ambientali.

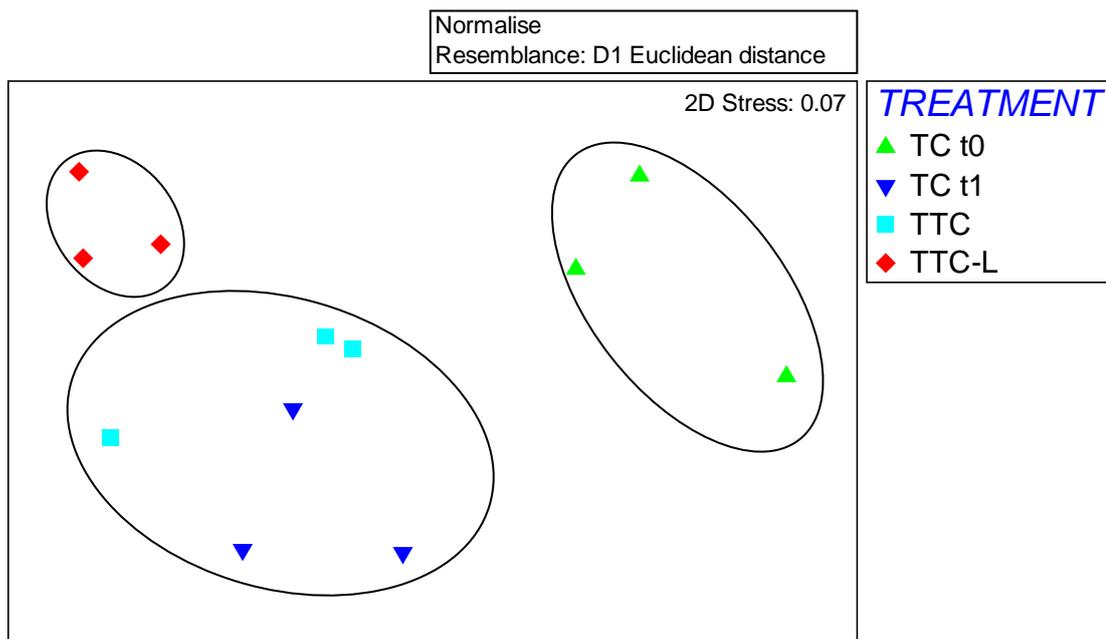


Fig. 120 – nMDS basato sulle distanze euclidee normalizzate dei valori di tutte le variabili studiate nei tubi degli organismi relativi all' esperimento di *transplantating* Cala-Licata.

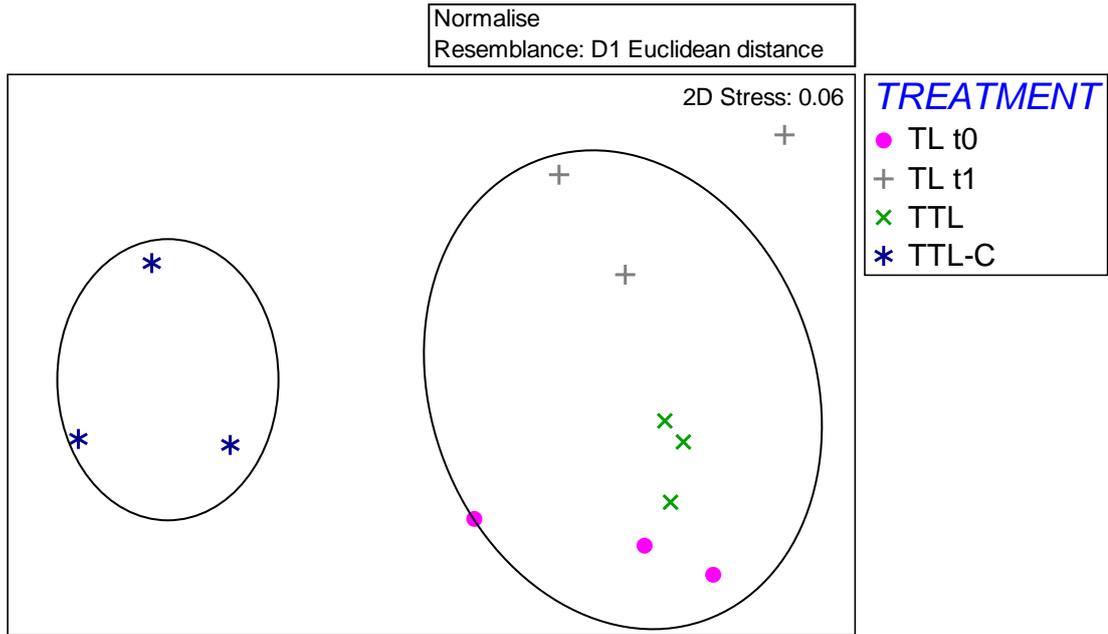


Fig. 121 – nMDS basato sulle distanze euclidee normalizzate dei valori di tutte le variabili studiate nei tubi degli organismi relativi all' esperimento di *transplanting* Licata-Cala.

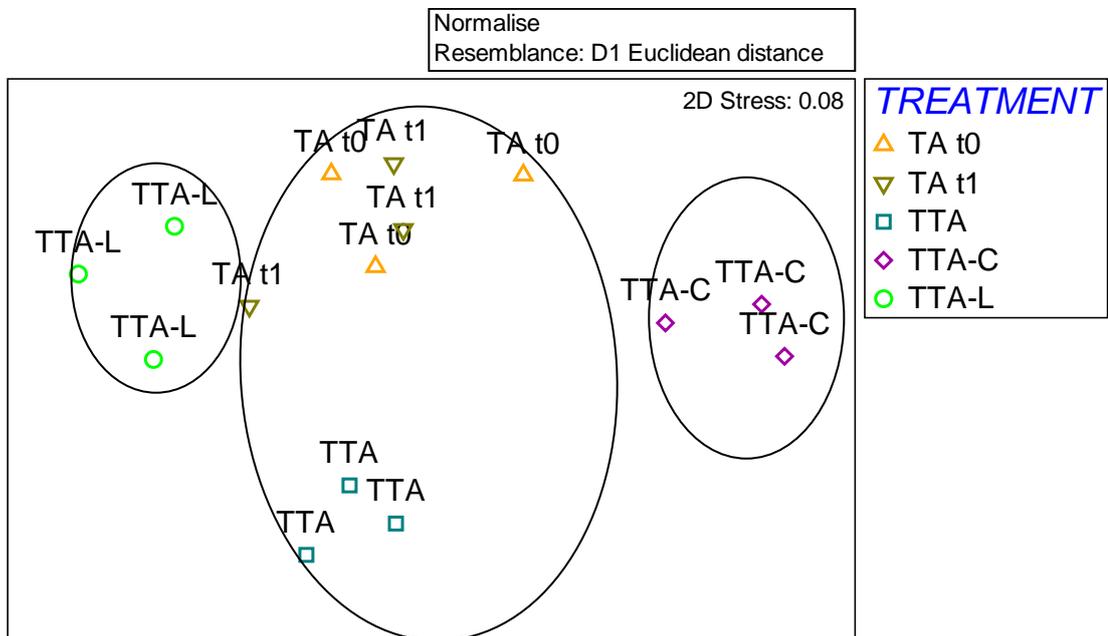


Fig. 122 – nMDS basato sulle distanze euclidee normalizzate dei valori di tutte le variabili studiate nei tubi degli organismi relativi agli esperimenti di *transplanting* Acquisanta-Cala e Acquisanta-Licata.

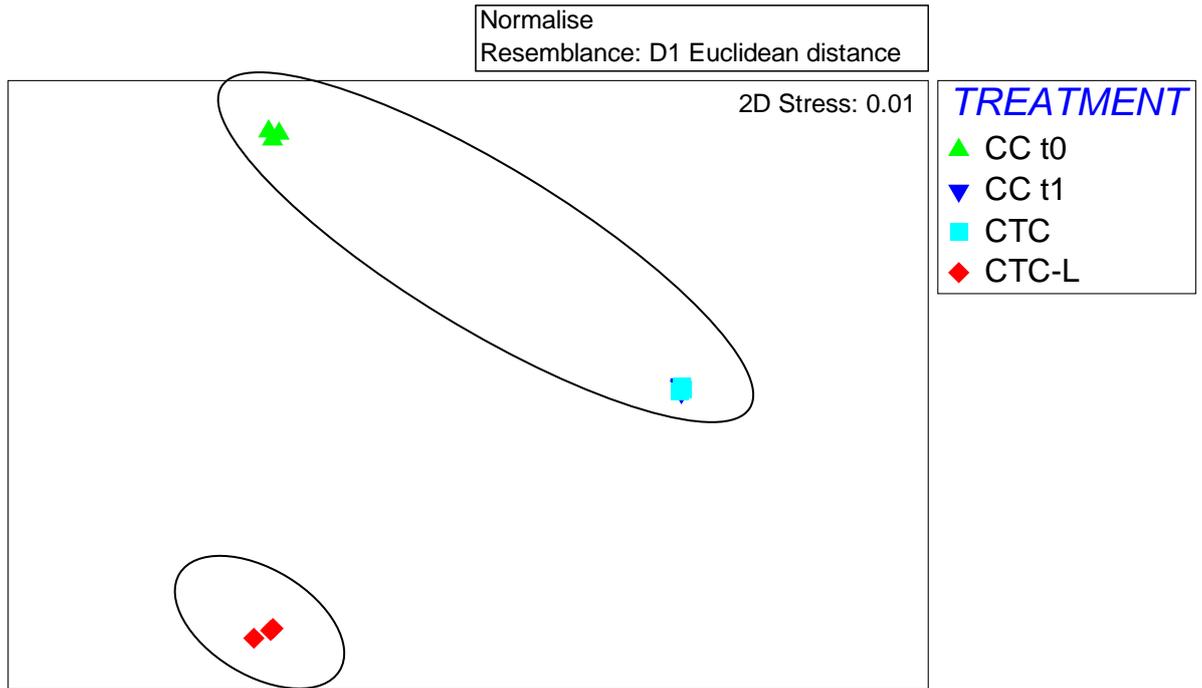


Fig. 123 – nMDS basato sulle distanze euclidee normalizzate dei valori di tutte le variabili studiate nei corpi degli organismi relativi agli esperimenti di *transplantating* Cala -Licata.

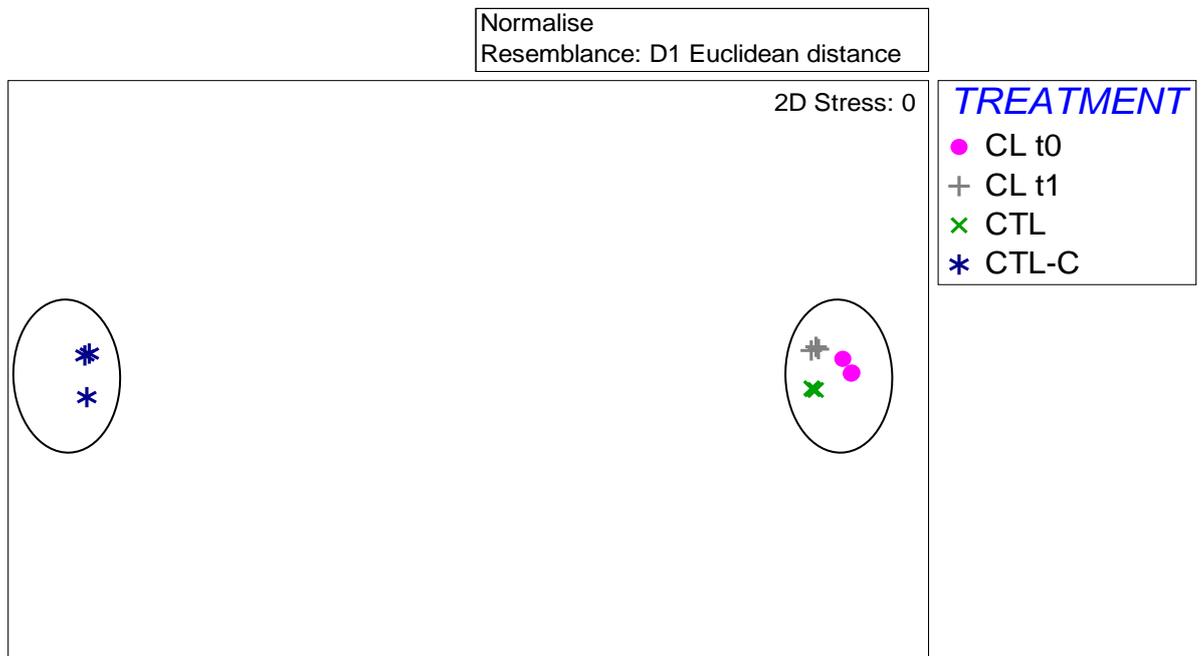


Fig. 124 – nMDS basato sulle distanze euclidee normalizzate dei valori di tutte le variabili studiate nei corpi degli organismi relativi agli esperimenti di *transplantating* Licata-Cala.

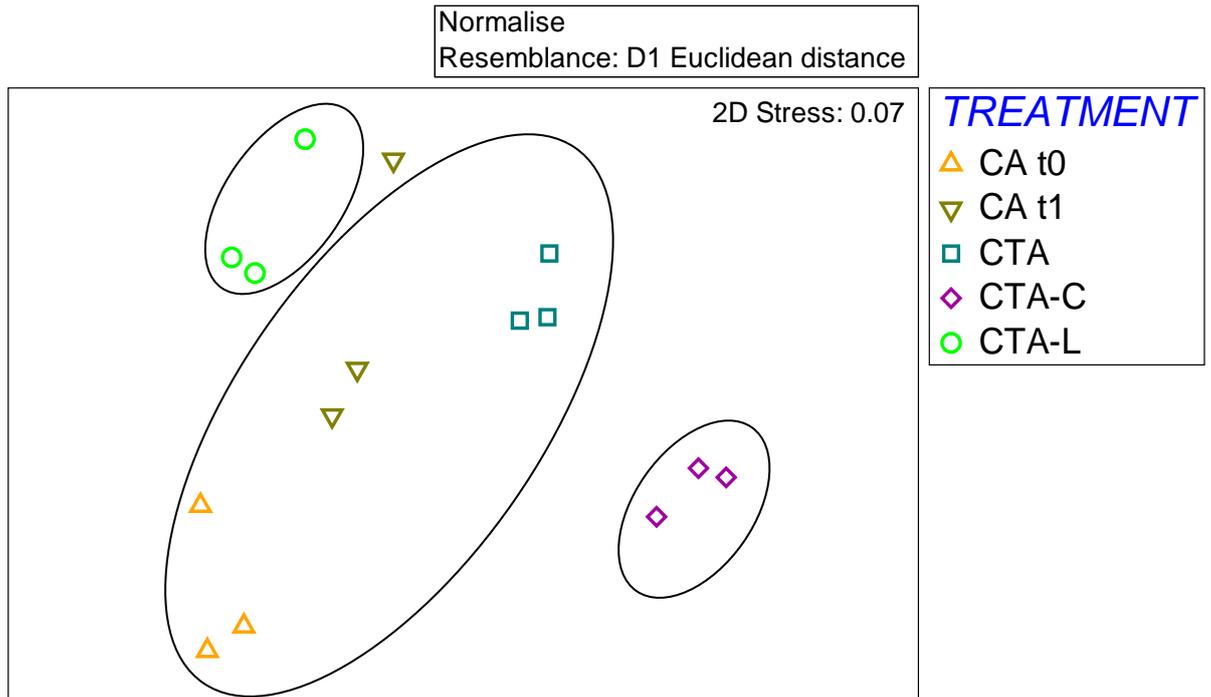


Fig. 125 – nMDS basato sulle distanze eucldee normalizzate dei valori di tutte le variabili studiate nei corpi degli organismi relativi agli esperimenti di *transplanting* Acquasanta-Cala e Acquasanta-Licata.

Per ciascun esperimento di *transplanting*, l'analisi delle similarità (ANOSIM) ha evidenziato differenze significative ($p < 0.001$) tra i vari gruppi controllo, e tra i gruppi controllo e quelli trapiantati, sia per i tubi (tabella 42) che per i corpi (tabella 43).

Per quanto riguarda i tubi, soltanto tra i gruppi $TTCT_1$ TTC e TTL_0 TTL e $TTAt_0$ $TTAt_1$ i valori di R sono risultati più bassi, e sono rispettivamente $R = 0,33$, $R = 0,074$ e $R = -0,185$.

Per quanto riguarda i corpi, soltanto tra i gruppi $CTCT_1$ e CTC, $CTAt_1$ e CTA-L i valori di R sono risultati bassi e sono rispettivamente $R = 0,66$, $R = 0,71$ e $R = 0,48$.

Tabella 42 – ANOSIM di tutte le variabili studiate nei tubi degli organismi relativi agli esperimenti di *transplantating*.

CALA			LICATA			ACQUASANTA		
Global Test								
Sample statistic (Global R): 0.809			Sample statistic (Global R): 0.759			Sample statistic (Global R): 0.895		
Significance level of sample statistic: 0.02%			Significance level of sample statistic: 0.03%			Significance level of sample statistic: 0.01%		
Pairwise Tests								
	R	Significance		R	Significance		R	Significance
Groups	Statistic	Level %	Groups	Statistic	Level %	Groups	Statistic	Level %
TC t0, TC t1	0,963	10	TL t0, TL t1	0,852	10	TA t0, TA t1	-0,185	100
TC t0, TTC	0,926	10	TL t0, TTL	0,074	30	TA t0, TTA	1	10
TC t0, TTC-L	1	10	TL t0, TTL-C	1	10	TA t0, TTA-C	1	10
TC t1, TTC	0,333	10	TL t1, TTL	0,852	10	TA t0, TTA-L	0,926	10
TC t1, TTC-L	0,852	10	TL t1, TTL-C	1	10	TA t1, TTA	1	10
TTC, TTC-L	1	10	TTL, TTL-C	1	10	TA t1, TTA-C	1	10
						TA t1, TTA-L	0,889	10
						TTA, TTA-C	1	10
						TTA, TTA-L	1	10
						TTA-C, TTA-L	1	10

Tabella 43 – ANOSIM di tutte le variabili studiate nei corpi degli organismi relativi agli esperimenti di *transplantating*.

CALA			LICATA			ACQUASANTA		
Global Test								
Sample statistic (Global R): 0.889			Sample statistic (Global R): 0.88			Sample statistic (Global R): 0.951		
Significance level of sample statistic: 0.01%			Significance level of sample statistic: 0.02%			Significance level of sample statistic: 0.01%		
Pairwise Tests								
	R	Significance		R	Significance		R	Significance
Groups	Statistic	Level %	Groups	Statistic	Level %	Groups	Statistic	Level %
CC t0, CC t1	1	10	CL t0, CL t1	1	10	CA t0, CA t1	0,852	10
CC t0, CTC	1	10	CL t0, CTL	1	10	CA t0, CTA	1	10
CC t0, CTC-L	1	10	CL t0, CTL-C	1	10	CA t0, CTA-C	1	10
CC t1, CTC	0,667	10	CL t1, CTL	1	10	CA t0, CTA-L	1	10
CC t1, CTC-L	1	10	CL t1, CTL-C	1	10	CA t1, CTA	0,741	10
CTC, CTC-L	1	10	CTL, CTL-C	1	10	CA t1, CTA-C	1	10
						CA t1, CTA-L	0,481	20
						CTA, CTA-C	1	10
						CTA, CTA-L	1	10
						CTA-C, CTA-L	1	10

5 – CONCLUSIONI

Gli indicatori biologici sono specie animali e/o vegetali sensibili anche a minime variazioni dei fattori ecologici, biotici e abiotici, determinate da certi tipi di inquinamento o da particolari condizioni ambientali. La loro comparsa o scomparsa è pertanto indice inequivocabile di variazione di equilibri. La funzione di indicatori è dovuta al fatto che queste specie tollerano, si sviluppano e, in alcuni casi, diventano dominanti in condizioni ambientali che sono negative per tutte le altre.

Il ruolo centrale di questa ricerca è stato quello di valutare la possibilità di utilizzare la specie di polichete la *S. spallanzanii* come possibile bioindicatore di aree portuali, conosciute per la loro vulnerabilità, basando le attività di indagine su metodi e chimici biochimici.

Al fine di stabilire il rischio ecologico e la relazione causale tra la salute degli organismi e i livelli di contaminazione ambientale, sono stati realizzati degli esperimenti di *transplanting* tra aree portuali a diverso impatto antropico, precisamente le due aree portuali di Cala e Acquasanta nella città di Palermo e l'area portuale di Licata in provincia di Agrigento.

La caratterizzazione abiotica delle tre aree oggetto di studio ha permesso di giungere a delle conclusioni specifiche sulle differenze ambientali delle suddette aree.

Evidenti differenze spaziali sono emerse tra il sito Cala e gli altri due siti Licata ed Acquasanta, che invece mostrano una maggiore similarità.

La Cala è risultata avere una maggiore produttività e un livello di contaminazione più elevato (da IPA e metalli pesanti) rispetto agli altri due siti, nonostante ciò essa non mostra caratteristiche d'inquinamento di grande rilevanza rispetto alle altre aree portuali del mondo. In particolare Licata è risultata avere una contaminazione da IPA e metalli pesanti intermedia tra Cala ed Acquasanta.

Negli organismi trapiantati a Cala (TL-C e TA-C), i livelli di contaminanti nei tubi e nei corpi sono risultati aumentati; invece, i livelli di IPA e di metalli pesanti diminuiscono negli organismi trapiantati a Licata, questo confermerebbe una migliore condizione dell'ambiente di Licata dal punto di vista della contaminazione.

In particolare, è stato visto che gli organismi bioaccumulano principalmente gli analiti (IPA) a basso peso molecolare (3-4 anelli) presenti nell'acqua che rappresenta il mezzo di contatto diretto di questi con l'ambiente.

Inoltre, gli organismi di Cala e Acquasanta trapiantati a Licata probabilmente non riescono a smaltire nell'arco di tempo considerato la quantità di metalli più di quanto non ne riescano a bioaccumulare.

Quindi, le indagini relative agli idrocarburi policiclici aromatici e ai metalli pesanti sugli esemplari di *S. spallanzanii* ci permettono di affermare come questa specie rappresenti un ottimo bioindicatore della qualità dell'ecosistema acquatico in cui vive.

Tuttavia uno scarso adattamento trofico degli organismi trapiantati a Cala è emerso dai valori dei rapporti isotopici del carbonio e dell'azoto, e soltanto negli organismi trapiantati a Licata (TC-L) viene messa in luce la presenza di variazioni spaziali e temporali; ciò può essere dovuto al breve spazio temporale dell'esperimento di *transplantig*, che non ha permesso di evidenziare un eventuale modifica di tali variabili.

Anche le indagini condotte relative ai *biomarkers* ci permettono di confermare il ruolo di questa specie quale ottimo bioindicatore dello stato di salute dell'ecosistema acquatico in cui vive. Gli organismi trapiantati hanno presentato una risposta metabolica, relativa alle attività enzimatiche studiate, ben precisa evidenziando come essi rispondano alle condizioni di un ambiente più contaminato, senza tuttavia, tralasciare l'importanza di altri fattori ambientali ed ecologici in grado di influenzare o contribuire a modulare la risposta enzimatica di questi organismi.

In generale, i risultati di tutte le variabili analizzate hanno messo in evidenza le differenze spaziali e temporali tra i gruppi controllo e i trapiantati, con differenze maggiori per gli organismi trapiantati a Cala, mostrando quindi come gli organismi rispondano alle nuove condizioni ambientali, confermando il ruolo e il possibile utilizzo di *S. spallanzanii* come bioindicatore.

BIBLIOGRAFIA

- Abel, P.D., 1989. *Water Pollution Biology*. Ellis Horwood Limited, Chichester.
- Abele, D., Burlando, B., Viarengo, A., Poertner, H.O., 1998b. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120B:425–435.
- Abele, D., Gropietsch, H., Poertner, H.O., 1998a. Temporal fluctuations and spatial gradients of environmental PO₂, temperature, H₂O₂ and H₂S in its intertidal habitat trigger enzymatic antioxidant protection in the capitellid worm *Heteromastus filiformis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 163:179–191.
- Abele-Oeschger, D., Oeschger, R., 1995. Enzymatic antioxidant protection in spawn, larvae and adult worms of *Phyllodoce mucosa* (Polychaeta). *Ophelia*, 43:101–110.
- Abele-Oeschger, D., Oeschger, R., Theede, H., 1994. Biochemical adaptations of *Nereis diversicolor* (Polychaeta) to temporarily increased hydrogen peroxide levels in intertidal sandflats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 106:101–110.
- Ahn, I.Y., Kang, Y.C., Choi, J.W., 1995. The influence of industrial effluents on intertidal benthic communities in Panweol, Kyeonggi Bay (Yellow Sea) on the west coast of Korea. *Mar. Poll. Bull.*, 30:200–206.
- Ait Alla, 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). *Comp. Biochem. Physiol.*, 43C: 23-9.
- Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J.F., (2000). Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 49, 269 – 287.
- Alabaster, J.S. and Lloyd, R., 1980. *Water Quality Criteria for Freshwater Fish*. FAO and Butterworths. London.
- Allen, H.E., Hansen, D.J., 1996. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Water Environ. Res.*, 68, 42–54.
- Allyson, L., O'Brien, A., C., D., Jeff Ross, A.B. and Michael, J., Keough, A., 2006. Effects of *Sabella spallanzanii* physical structure on soft sediment macrofaunal assemblages. *Marine and Freshwater Research*, 57, 363–371.
- Al-Yousuf, M.H., El-Shahawi, M.S., Al-Ghais S.M., 2000. Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus lentjan* fish species in relation to body length and sex. *The Science of The Total Environment*, Volume 256, Issues 2-3, Pages 87-94.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Berthet, B., Metayer, C., 1987. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 106, 73–89.

- 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. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 49, no. 9-10, pp. 704-712.
- Arcos, J.C., Argus, M.G., 1975. Chemical Induction of Cancer: Structural Bases and Biological Mechanisms, vol. IIA. *Academic Press, New York*.
- Argese, E., Quinci, E., Bettiol, C., Cazzolato, G., Colombo, G., Gion, M., 2004. Studio dell'attività delle glutatione S-transferasi nel *Mytilus galloprovincialis* nella laguna di Venezia. *Meeting of the Italian Society Ecology*.
- Atgin, R.S., El-Agha, O., Zararsız, A., Kocataş, A., Parlak, H., Tuncel, G., 2000. Investigation of the sediment pollution in Izmir Bay: trace elements. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 55, no.7, pp. 1151-1164.
- Athalye, R.P., Gokhale, K.S., 1991. Heavy metals in the polychaete *Lycastis ouanaryensis* from Thane Creek, India. *Mar. Pollut. Bull.*, 22, 233-236.
- Ayres, P.A., Burton, H.W., Cullum, M.L., 1978. Sewage pollution and shellfish. In: Davies, L. (Ed.), Techniques for the Study of Mixed Populations. *Academic Press, New York*, pp. 51-62.
- Bacchiocchi, S., Gorbi, S., Orletti, R., Palombo, P., Regoli F., 2002. Valutazione rapida della capacità antiossidante totale in *Mytilus galloprovincialis*. *Webzine sanità pubblica veterinaria* 14.
- Baird, C., Cann, M., 2004. *Environmental Chemistry*, Third Edition., Freeman, W.H.
- Baker, J.E., Eisenreich, S.J., Eadie, B.J., 1991. Sediment trap fluxes and benthic recycling of organic carbon, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorobiphenyl congeners in Lake Superior. *Environmental Science and Technology*, 25, 500-509.
- Banni, M., Bouraoui, Z., Clerandeanu, C., Narbonne, J.F., Boussetta, H., 2009. Mixture toxicity assessment of cadmium and benzo[a]pyrene in the sea worm *Hediste diversicolor*. *Chemosphere*, 77, 902-906
- Barata, C., Markich, S.J., Baird, D.J. and Soares, A.M.V.M., 2002. The Relative Importance of Water and Food as Cadmium Source to *Daphnia magna* Straus. *Aquat. Toxicol.*, vol. 61, no. 3-4, pp. 143-154.
- Bargagli, R., Cruscanti, M., Leonzio, C., Bacci, E., 1998. I bioindicatori in ecotossicologia, Vighi e Bacci editori. *Trattato di farmacologia e terapia*, UTET, 40-45.
- Batley, G.E., Apte, S.C., Stauber, J.L., 1999. Acceptability of aquatic toxicity data for the derivation of water quality guidelines for metals. *Mar. Fresh. Res.*, 50, 729-738.
- Bauer, J.E., Kerr, R.P., Bautista, M.F., Decker, C.J., Capone, D.G., 1988. Stimulation of microbial activities in marine sediments inhabited by *Capitella capitata*. *Marine Environmental Research*, 25, 63-84.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T. and Bellocq, J., 1998. Concentrations of PAHs (Polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin*, 36, 951-960.
- Bayne, B.L., 1986. Measuring the effects of pollution at the cellular and organism level. In: *Organic Geochemistry*, 34, 209- 224.

- Belahcen, K.T., Chaoui, A., Budzinski, H., Bellocq, J., Garrigues, P., 1997. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Mediterranean coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 34, 298–316.
- Belfroid, A.C., Seinen, W., van den Berg, M., Hermens, J., van Gestel, C.A.M., 1995. Uptake bioavailability and elimination of hydrophobic compounds in earthworms (*Eisenia andrei*) in field contaminated soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 605-612.
- Belfroid, A.C., Sijm, D.T.H.M., Van Gestel, C.A.M., 1996. Bioavailability and toxicokinetics of hydrophobic aromatic compounds in benthic and terrestrial invertebrates. *Environ. Rev.*, 4, 276-299.
- Bendschneider K., R.J. Robinson 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.*, 11, 87-96.
- Berntssen, H.K., Hylland, K. and Julshamn, K., 2004. Maximum Organic and Inorganic Mercury in Fish Feed. *Nutrition*, vol. 10, no. 2, pp. 83–97.
- Bhatkar, N., Vankhede, G.N. and Dhande, R.R., 2004. Heavy Metal Induced Biochemical Alterations in the Fresh Water Fish *Labeo rohita*. *J. Ecotoxicol. Environ. Monit.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–7.
- Bidleman, T.F., Castleberry, A.A., Foreman, W.T., Zaranski, M.T., Wall, D.W., 1990. Petroleum hydrocarbons in the surface water of two estuaries in the Southeastern United States. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 30, 91–109.
- Bidleman, T.F., Olney, C.E., 1974. Chlorinated hydrocarbons in the Sargasso Sea atmosphere and surface water. *Science*, 183, 516–518.
- Bieger, T., Hellou, J., Abrajano, T.A., 1996. Petroleum biomarkers as tracers of lubricating oil contamination. *Marine Pollution Bulletin*, 32, 270-274.
- Birkbeck, T.H., McHenry, J.G., 1982. Degradation of bacteria by *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 72, 7–15.
- Bixian, M., Jiamo, F., Gan, Z., Zheng, L., Yushun, M., Guoying, S., Xingmin, W., 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the Pearl River and Estuary, China: spatial and temporal distribution and sources. *Applied Geochemistry*, 16, 1429–1445.
- Bocchetti, R., Fattorini, D., Gambi, M.C., Regoli, F., 2004. Trace metal concentrations and susceptibility to oxidative stress in the polychaete *Sabella spallanzanii* (Gmelin) (Sabellidae): potential role of antioxidants in revealing stressful environmental conditions in the Mediterranean. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 46, 353–361.
- Bocquené, G., Galgani, F., Walker, H., 1997. Les cholinestérases, Biomarqueurs de neurotoxicité. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., ŽEd., *Biomarqueurs en Ecotoxicologie, Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris, pp. 202-240.
- Bocquené, G., Galgani, F., 1998. Biological effects of contaminants: cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES Tech. Mar. Environ. Sci.* 22, 12.
- Boehm, P.D., Farrington, J.W., 1984. Aspects of the polycyclic aromatic hydrocarbon geochemistry of Recent sediments in the Georges Bank region. *Environmental Science and Technology*, 18, 840–845.
- Bolinches, J., Toranzo, A.E., Silva, A., Barja, J.L., 1986. Vibriosis as the main causative factor of heavy mortalities in the oyster culture industry in North-Western Spain. *Bull. Euro. Assoc. Fish Pathol.*, 6, 1–4.

- Bonar, D.B., 1972. Feeding and tube construction in *Chone mollis* Bush (Polychaeta, Sabellidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 9, 1–18.
- Bostock, A.D., 1979. Hepatitis A infection associated with the consumption of mussel. *J. Infect. Dis.*, 1, 171–177.
- Bouloubassi, I., Saliot, A., 1993. Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbon markers. *Oceanologica Acta*, 16, 145–161.
- Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 –248.
- Breitburg, D.L., Seitzinger, S., Sanders, J.G., 1999. *Preface. Limnol. Oceanogr.*, 33, 737–738.
- Broderius, S.J., Kahl, M.D., Hoglund, M.D., 1995. Use of joint toxic response to define the primary-mode of toxic action for diverse industrial organic-chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 1591–1605.
- Brown, D.A., Bay, S.M. and Hershelman, G.P., 1990. Exposure of Scorpionfish (*Scorpaena guttata*) to Cadmium: Effects of Acute and Chronic Exposures on the Cytosolic Distribution of Cadmium, Copper and Zinc. *Aquat. Toxicol.*, vol. 16, no. 4, pp. 295–310.
- Bryan, G.W., Hummerstone, L.G., 1997. Indicators of heavy metal contamination in Looe estuary (Cornwall) with particular regard to silver and lead. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 57:75–92.
- Bucheli, T.D., Fent, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 25, 201–268.
- Buchner, T., Abele-Oeschger, D., Theede, H., 1996. Aspects of antioxidant status in the polychaete *Arenicola marina*: Tissue and subcellular distribution, and reaction to environmental hydrogen peroxide and elevated temperatures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 143:141–150.
- Budzinski H., Jones, J., Bellocq, J., Piérard, C., Garrigues, P., 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry*, 58, 85–97.
- Budzinski, H., Baumard, P., Papineau, A., Wise, S. & Garrigues, P., 1998. Focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic compounds from standard reference materials, sediments and biological tissues. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 9, 225–232.
- Budzinski, H., Letellier, M., Garrigues, P., Le Leuach, K., 1999. Optimisation of the microwave-assisted extraction in open cell of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil and sediments. Study of moisture effect. *Journal of Chromatography, A*, 837, 187–200.
- Buet, A., Banas, D., Vollaire, Y., Coulet, E., Roche, H., 2006. Biomarker responses in European eel (*Anguilla anguilla*) exposed to persistent organic pollutants. A field study in the Vaccarès lagoon (Camargue, France). *Chemosphere*, 65, 1846–1858.
- Burdige, D.J., 1993. The biochemistry of manganese and iron reduction in marine sediments. *Earth Sci. Rev.*, 35, 249–284.
- Bury, N.R., Walker, P.A. and Glover, C.N., 2003. Nutritive Metal Uptake in Teleost Fish. *J. Exp. Biol.*, vol. 206, no. 1, pp. 11–23.
- Cain, D.J., Luoma, S.N., Carter, J.L. and Fend, S.V., 1992. Aquatic Insects as Bioindicators of Trace Element Contamination in Cobble-Bottom Rivers and Streams. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, vol. 49, no. 10, pp. 2141–2154.

- Cairns, J. Jr. and Van der Shalie, W.H., 1980. Biological monitoring: Part I- early warning systems. *Water Res.*, 14, 1179–1190.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C. and Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. *Sci. Total Environ.*, 247, 295-311.
- Callaway, R., 2003. Long-term effects of imitation polychaete tubes on benthic fauna: they anchor *Mytilus edulis* (L.) banks. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 283, 115–132. doi:10.1016/S0022-0981(02)00474-4.
- Calmano, W., Hong, J., Förstner, U., 1993. Binding and mobilisation of heavy metals in contaminated sediments affected by pH and redox potential. *Water Sci. Technol.*, 28, 223–235.
- Campbell, H.A., Handy, R.D. and Sims, D.W., 2005. Shift in a Fish's Resource Holding Power During a Contact Paired Interaction: the Influence of a Copper-Contaminated Diet in Rainbow Trout, *Physiol. Biochem. Zool.*, vol. 78, no. 5, 706–714.
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic toxicology*, 46, 67 – 76.
- Canicattì, C., Ville, P., Pagliara, P., Roch, P., 1992. Hemolysins from the mucus of *Spirographis spallanzanii* (Polychaeta, Sabellidae). *Mar. Biol.*, 114, 453–458.
- Carey, J.M., Watson, J.E., 1992. Benthos of the muddy bottom habitat of the Geelong Arm of Port Phillip Bay, Victoria, Australia. *The Victorian Naturalist*, 196–202.
- Carral, E., Puente, X., Villares, R., Carballeira, A., 1995. Background heavy metal levels in estuarine sediments and organisms in Galicia (Northwest Spain) as determined by modal analysis. *Sci Total Environ.* 172, 175–188.
- Cavallo, R.A., Stabili, L., 2002. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). *Water Research*, 36, 3719–3726.
- Cavallo, A. and Giangrande, A., 2003. Prove di sperimentazione ai fini dell'utilizzazione di *Sabella spallanzanii* come biorimediatore in acquacoltura. *Biologia Marina Mediterranea*, 10(2), 4–5.
- Chambers, J.E. and Levi, E.P., 1992. Organophosphates: Chemistry, Fate, and Effects, p.443. *Academic, New York*.
- Chapman, P.M., Wang, F.Y., Janssen, C., Persoone, G., Allen, H.E., 1998. Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 55, 2221–2243.
- Chatterje, S. & Bhattacharya, S., 1984. Detoxification of industrial pollutants by the glutathione-S-transferase system in the liver of *Anabas testudineus* (Bloch.). *Toxicol. Lett.*, 22, 187-198.
- Chen, C.F., Dong, C.D., Chen, C.W., Kao, C.M., 2007. Distribution and accumulation of heavy metals in the sediments of Kaohsiung Harbor, Taiwan. *Chemosphere*, 66, 1431–1440.
- Chowdhury, M.J., Baldisserotto, B., and Wood, C.M., 2005. Tissue-Specific Calcium and Metallothionain Levels in Rainbow Trout Chronically Acclimated to Waterborne or Dietary Cadmium., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 48, no. 3, pp. 381–390.

- Christensen, M., Andersen, O., Banta, G.T., 2002. Metabolism of pyrene by the polychaetes *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*. *Aquatic Toxicology*, 58, 15-25.
- Ciucinelli, A., Stortini, A.M., Perugini, M., Cecchini, L., Lepri, L., 2001. Organic pollutants in sea-surface microlayer and aerosol in the coastal environment of Leghorn (Tyrrhenian Sea). *Marine Chemistry*, 76, 77–98.
- Ciutat, A., Boudou, A., 2003. Bioturbation effects on cadmium and zinc transfers from a contaminated sediment and on metal bioavailability to benthic bivalves. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22, 1574–1581.
- Clapin, G., Evans, D.R., 1995. The status of the Introduced marine fan worm. *Sabella spallanzanii* (Gmelin. 1791) in Western Australia: a preliminary investigation. *Technical Report No. 2, CSIRO Centre for Research on Introduced Marine Pests, Hobart*.
- Clapin, G., 1996. The filtration rate, oxygen consumption and biomass of the introduced polichaete *Sabella spallanzanii* Gmelin within Cockburn Sound. *Honours thesis, Edith Cowan University. Joondalup*.
- Cloern, J. E., 1996. Phytoplankton bloom dynamics in coastal ecosystems. A review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. *Reviews of Geophysics*, 34, 127–168.
- Coates, J.D., Woodward, J., Allen, J., Philp, P., Lovley, D.R., 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (9), 3589–3593.
- Colombo, J.C., Pelletin, E., Brochn, C., Khall, M., Catoggio, A., 1989. Determination of hydrocarbon distribution indexes case study: Rio de la Plata estuary, Argentina. *Environmental Science and Technology*, 23, 888– 894.
- Connell, D.W., Wu, R.S.S, Richardson, B.J., Leung, K., Lam, P.S.K., Connell, P.A., 1998. Occurrence of persistent organic contaminants and related substances Hong Kong marine areas an overview. *Marine Pollution Bulletin*, 36, 376-384.
- Connor, M.S., 1984. Fish/sediment concentration ratios for organic compounds. *Environ. Sci. Technol.*, 18, 31-35.
- Countway, R.E., Dickhut, R.M., Canuel, E.A., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) distributions and associations with organic matter in surface waters of the York River, VA estuary. *Org. Geochem.*, 34,209–224.
- Craig, A., Hare, L. and Tessier, A., 1999. Experimental Evidence for Cadmium Uptake via Calcium Channels in the Aquatic Insect *Ch. staegeri*. *Aquat. Toxicol.*, vol. 44, no. 4, pp. 255–262.
- Cross, F.A., Duke, T.W., Willis, J.S., 1970. Biogeochemistry of trace elements in a coastal plain estuary: distribution of manganese, iron and zinc in sediments, water and polychaetous worms. *Chesapeake Science*, 11:221–234.
- CSIRO, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation 2001. *Marine Pest Information Sheet: giant fanworm (Sabella spallanzanii)*.
- Cummings, V. J., Thrush, S. F., Hewitt, J. E., and Funnell, G. A., 2001. Variable effect of a large suspension-feeding bivalve on in fauna: experimenting in a complex system. *Marine Ecology Progress Series*, 209, 159–175.

- Currie, D.R., McArthur, M.A. and Cohen., B.F., 2000. Reproduction and distribution of the invasive European fan worm *Sabella spallanzanii* (Gmelin) (Polychaeta: Sabellidae) in Port Phillip Bay, Victoria, Australia. *Mar. Biol.*, 136, 645-656.
- Dales, R.P., 1957. Some quantitative aspects of feeding in sabellid and sepiolid fan worms. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 36, 309-316.
- De Boeck, G., Nilsson, G.E., Elofsson, U., Vlaeminck, A., Blust, R., 1995. Brain monoamine levels and energy status in common carp (*Cyprinus carpio*) after exposure to sublethal levels of copper. *Aquatic Toxicology*, vol. 33, no. 3-4, pp. 265-277.
- De Castro, E., Ferreira, H., Cunha, M., Bulcao, C., Sarmento, C., De Oliveira, I., Fregoneze, J.B., 1996. Effect of central acute administration of cadmium on drinking behavior. *Pharmacol Biochem Behav*, 53, 687-693.
- De La Torre, F.R., Ferrari, L., Salibian, A., 2002. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 131, 271-280.
- De Luca, G., Furesi, A., Leardi, R., Micera, G., Panzanelli, A., Piu, P.C., Sanna, G., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons assessment in the sediments of the Porto Torres Harbor (Northen Sardinia, Italy). *Marine Chemistry*, 86, 15-32.
- De Niro, M.J., Epstein, S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42, 495-506.
- De Niro, M.J., Epstein, S., 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 45, 341-351.
- Del Razo, L.M., Quintanilla-Vega, B., Brambila-Colombres, E., Calderón-Aranda, E.S., Manno, M., Albores, A., 2001. Stress Proteins Induced by Arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 177, n.o. 2, pp. 132-148.
- Dellali, M., Gnassia Barelli, M., Roméo, M., Aissa, P., 2001. The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. *Comp. Biochem. Physiol.*, 130C, 227-235.
- Deniges, M.G., (1920). Reaction de coloration extremement sensible des phosphate et des arseniates. Ses applications. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 171, 802-804.
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Ecotoxicology*, 3, 161-172.
- Devillers, J., Bintein, S., Domine, D., 1996. Comparison of BCF models based on log P. *Chemosphere*, 33, 1047-1065.
- Di Leonardo, R., Bellanca, A., Capotondi, L., Cundy, A., Neri, R., 2007. Possible impacts of Hg and PAH contamination on benthic foraminiferal assemblages: An example from the Sicilian coast, central Mediterranean. *Science of the Total Environment*, 388, 168-183.
- Di Toro, D.M., Mahony, J.D., Hansen, D.J., Scott, K.J., Carlson, A.R., Ankley, G.T., 1992. Acid-volatile sulfide predicts the acute toxicity of cadmium and nickel in sediments. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 96-101.

- Dickhut, R.M., Gustafson, K.E., 1995. Atmospheric washout of polycyclic aromatic hydrocarbons in the southern Chesapeake Bay region. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 1518–1525.
- Dickhut, R.M., Canuel, E.A., Gustafson, K.E., Liu, K., Arzayus, K.M., Walker, S.E., Edgecombe, G., Gaylor, M.O., MacDonald, E.H., 2000. Automotive sources of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particulate matter in the Chesapeake Bay Region. *Environmental Science and Technology*, 34, 4635–4640.
- Díez, G., Soto, M., Cantón, L., Vaquero, M.C., Marigómez, I., 2000. *Hediste (Nereis) diversicolor* as bioindicator of metal and organic chemical bioavailability: a field study. *Ecotoxicol. Environ. Res.*, 3, 7-15.
- Doering, P.H., Oviatt, C.A., 1986. Application of filtration rate models to field populations of bivalves: an assessment using experimental mesocosms. *Marine Ecology Progress Series*, 31, 265–275.
- Donazzolo, R., Merlin, O.H., Menegazzo Vitturi, L., Orio, A., Pavoni, B., Perin, G., Rabitti, S., 1981. Heavy metal contamination in surface sediments from the Gulf of Venice, Italy. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 12, no. 12, pp. 417-425.
- Driscoll, S.K., McElroy, A.E., 1996. Bioaccumulation and metabolism of benzo[a]pyrene in three species of polychaete worms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 1401–1410.
- Dubois, S., Orvain, F., Marin-Léal, J.C., Ropert, M., Lefebvre, S., 2007. Small-scale spatial variability of food partitioning between cultivated oysters and associated suspension feeding species, as revealed by stable isotopes. *Marine ecology progress*, 336, 151–160.
- Durante, M., 1956. Cholinesterase in the development of *Ciona intestinalis* (Ascidia). *Experientia*, 12, 307-308.
- Durou, C., Poirier, L., Amiard, J.C., Budzinski, H., Gnassia-Barelli, M., Lemenach, K., 2007. Biomonitoring in a clean and multi-contaminated estuary based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environ. Pollut.*, 148, 445–58.
- Durou, C., Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C., 2008. Environmental quality assessment in estuarine ecosystems: use of biometric measurements and fecundity of the ragworm *Nereis diversicolor* (Polychaeta, Nereididae). *Water Res*, 42, 2157–65.
- Duzzin, B., Turchetto, M., Tallandini, L., 1986. Il ciclo biologico dei PCB. Ambiente Risorse Salute *Tossicologia Ambientale*, 24: 24-27.
- Eadie, B.J., Landrum, P.F., Faust, W., 1982. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments, porewater and the amphipod *Pontoporeia hoyi* from Lake Michigan. *Chemosphere*, 11 (9), 847–858.
- Eckman, J. E., (1983). Hydrodynamic processes affecting benthic recruitment. *Limnology and Oceanography*, 28, 241–257.
- Eggleton, J., Thomas, K.V., 2004. A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environ. Int.*, 30, 973–980.
- Eisler, R., 1987. Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wild life, and invertebrates: a synoptic review. *Biological Report*, 85 (1.11). US Fish and Wildlife Service, Washington, DC.
- El Nemr, A., Abd-Allah, A.M.A., 2003. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in microlayer and subsurface waters along Alexandria coast, Egypt. *Chemosphere*, 52, 1711–1716.

- Elberling, B., Knudsen, K.L., Kristensen, P.H., Asmund, G., 2003. Applying foraminiferal stratigraphy as a biomarker for heavy metal contamination and mining impact in a fiord in West Greenland. *Marine Environmental Research*, vol.55, no. 3, pp. 235-256.
- Elia, A.C., Dörr, L.A. J.M., Taticchi, M.I., 2005. Evaluation of biomarkers of oxidative stress in liver of two autochthonous fish species from the Tiber River. *Ittiopatologia*, 2, 231-240.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, J.R.V., Featherstone, R.M., 1961. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7,88-95.
- Ergin, M., Saydam, C., Baştürk, O., Erdem, E., Yörük, R., 1991. Heavy metal concentrations in surface sediments from the two coastal inlets (Golden Horn Estuary and Izmit Bay) of the northeastern Sea of Marmara. *Chemical Geology*, vol. 91, no. 3, pp. 269-285.
- Eriksen, K.D.H., Daae, H.L., Andersen, R.A., 1988. Evidence of presence of heavy metal-binding proteins in polychaete species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91, 377-384.
- Escartin, E., Porte, C., 1997. The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 2090-2095.
- Farag, A.M., Stansbury, M.A., Hogstrand, C., et al., 1995. The Physiological Impairment of Free-Ranging Brown Trout Exposed to Metals in the Clark Fork River, Montana, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 52, no. 9, pp. 2038-2050.
- Fargasova, A., 1997. Sensitivity of *Chironomus plumosus* larvae to V⁵⁺, Mo⁶⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, and Cu⁺ Metal Ions and their Combinations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 59, no. 6, pp. 956-962.
- Farkas, A., Salanki, J., and Specziar, A., 2003. Age- and Size- Specific Patterns of Heavy Metals in the Organs of Freshwater Fish *Abramis brama* L. Populating a Low- Contaminated Site. *Water Res.*, vol. 37, no. 5, pp. 959-964.
- Fatoki, O.S., Mathabatha, S., 2001. An assessment of heavy metal pollution in the East London and Port Elizabeth harbours. *Water SA*, 27, 233-240.
- Fitzsimons, G., 1965. Feeding and tube-building in *Sabellastarte magnifica* (Shaw) (Sabellidae: Polychaeta). *Bull. Mar. Sci.*, 15, 642-671.
- Flammarion, P., Migeon, B., Garric, J., 1996. Joint effect of copper sulfate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). EROD and AChE activities.
- Fletcher, C.A., Bubb, J.M., Lester, J.N., 1994. Magnitude and distribution of anthropogenic contaminants in salt marsh sediments of the Essex coast, UK. II. Selected metals and metalloids. *Science of The Total Environment*, Volume 155, Issue 1, Pages 47-59.
- Forbes, V.E., Andreassen, M.S.H., Christensen, L., 2001. Metabolism of the polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene by the polychaete *Capitella capitata* species I. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20:1012-1021.
- Fourcy, D., Jumel, A., Heydorff, M., Lagadic, L., 2002. Esterases as biomarkers in *Nereis* (Hediste) *diversicolor* exposed to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. israelensis used for mosquito control in coastal wetlands of Morbihan (Brittany, France). *Mar. Environ. Res.*, 54:755-9.
- Francesconi, K. A., Goessler, W., Panutrakul, S. & Irgolic, K. J., 1998. *The Science of Total Environment*, 221, 139-148.

- Franke, C., 1996. How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment. *Chemosphere*, 32, 1897-1905.
- Fritzpatrick, P. J. & Sheenan, D., 1993. Separation of multiple forms of glutathione S-transferase from the Blue Mussel, *Mytilus Edulis*. *Xenobiotica*, 23, 851 – 861.
- Fuhrman, J.A., Lee, S.H., Masuchi, Y., Davis, A.A., Wilcox, R.M., 1994. Characterization of marine prokaryotic communities via DNA and RNA. *Microbial.*, 28, 133–145.
- Fulton, M., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 37–45.
- Gailer, J., Francesconi, K.A., Edmonds, A.D. & Irgolic, K.J., 1994. *Applied Organometallic Chemistry*, 9, 341–355.
- Galgani, F. and Bocquenè, G., 1990. In vitro inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 45, 243-249.
- Galgani, F., Bocquene, G. & Cadiou, Y., 1992. Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 13(1-3),77-82.
- Garret, R.H., Grisham, M., 1998. Biochimica con aspetti molecolari della biologia cellulare. *Ed. Zanichelli*. 38, 1286-1291.
- GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA (G.U.R.I.). Decreto Ministeriale 06 Novembre 2003, n° 367. Regolamento concernente la fissazione di standard di qualità nell'ambiente acquatico per le sostanze pericolose, ai sensi dell'articolo 3, comma 4, del Decreto Legislativo 11 Maggio 1999, n° 152, vol. 5. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Roma, 08 Gennaio 2004, 17-29.
- Gearing, P.J., Gearing, J.N., Pruell, R.J., Wade, T.L., Quin, J.G., 1980. Partitioning of No. 2 fuel oil in controlled estuarine ecosystems. Sediments and suspended particulate matter. *Environ. Sci. Technol.*, 14 (9), 1129–1136.
- Gebel, T.W., (2001). *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203, 249–262.
- Geracitano, L.A., Monserrat, J.M., Bianchini, A., 2002. Physiological and antioxidant enzyme response to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 277:145–156
- Gerhard, A., Review of Impact of Heavy Metals on Stream Invertebrates with Special Emphasis on Acid Conditions, *Water, Air, and Soil Pollut.*, 1993, vol. 66, no. 3–4, pp. 289–314.
- Giacobbe, M.G., Vadrucchi, M.R., Puglisi, A., Mailmone, G., Magazzù, G., 1996. Ciclo annuale del fitoplancton nello stagno di Acquatina in relazione alle condizioni ambientali. *S.It.E. Atti*, 17: 451-454.
- Giangrande, A., Petraroli, A., 1994. Reproduction and growth of *Sabella spallanzanii* (Polychaeta, Sabellidae) in the Mediterranean Sea. In: Dauvin J-C, Laubier L, Reish DJ, eds. Actes de la 4 ème Conférence internationale des Polychètes. *Memoires du Museum national d'Histoire naturelle*, 162, 51–56.
- Giangrande, A., 1997. Polychaete reproductive patterns, life cycles and life histories: an overview. *Oceanogr. Mar. Biol. Annual Review*, 35, 323-386.

- Giangrande, A., Licciano, M., Pagliara, P. and Gambi, M.C., 2000. Gametogenesis and larval development in *Sabella spallanzanii*. (Polychaeta: Sabellidae) from the Mediterranean Sea. *Marine Biology*, 136, 847–861.
- Giangrande, A., Cavallo, A., Licciano, M., Mola, E., Pierri, C. & Trianni, L., 2005. Utilization of the filter feeder *Sabella spallanzanii* as bioremediator in aquaculture. *Aquaculture International*, 13, 129–136.
- Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., et al., 2003. Influence of Lake Chemistry and Fish Age of Cadmium, Copper and Zinc Concentrations in Various Organs of Indigenous Yellow Perch (*Perca flavescens*), *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 61, no. 9, pp. 1702–1716.
- Gili, J.M., Coma, R., 1998. Benthic suspension feeders: their paramount role in littoral marine food webs. *Trend Ecol. Evol.*, 13 (8), 316–321.
- Gill, T.S., Pande, J., Tewari, H., 1990a. Enzyme modulation by sublethal concentrations of aldicarb, phosphamidon and endosulfan in fish tissue. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 38, 231–244.
- Gill, T.S., Tewari, H., Pande, J., 1990b. Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97C, 287–292.
- Gill, T.S., Tewari, H., Pande, J., 1990. Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 97C, 287–292.
- Gmelin, JF., 1791. *Caroli a Linne' Systema Naturae per Regna Tria Naturae, Editio Decima Tertia, Aucta, Reformata. Lipsiae*, 1(6), 3021–3910.
- Gobas, F.A.P.C., Muir, D.C.G., Mackay, D., 1988. Dynamics of dietary bioaccumulation and fecal elimination of hydrophobic organic chemicals in fish. *Chemosphere*, 17, 943–962.
- Gobas, F.A.P.C., Zhang, X., Wells, R., 1993. Gastrointestinal magnification: the mechanism of biomagnification and food chain accumulation of organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.*, 27, 2855–2863.
- Golovanova, L., 2008. Effects of Heavy Metals on the Physiological and Biochemical Status of Fishes and Aquatic Invertebrates. *Inland Water Biology*, vol. 1, no. 1, pp. 93–101.
- Gonzales, J.M., Moran, M.A., 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4237–4242.
- Gorbit, S., Virno Lamberti C., Notti, A., Benedetti, M., Fattorini, D., Moltedo, G., Regoli, F., 2007. 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.
- Gowland, B.T.G., McIntosh, A.D., Davies, I.M., Moffat, C.F., Webster, L., 2002. Implication from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferases activity in mussels. *Marine Environmental Research*, 54, 231–235.
- Gowland, B.T.G., Moffata, C.F., Stagg, R.M., Houlihan, D.F., Davies, I.M., 2002. Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Marine Environmental Research*, 54, 169–177.
- Graham, D.R. and Sebens, K.P., 1996. The distribution of marine invertebrate larvae near vertical surfaces in the rocky subtidal zone. *Ecology*, 77, 933–949.
- Grandini, S., 1993. Rame e cadmio in tessuti di teleostei. *Il Pesce*, 4/93.

- Grasshoff, K., 1983. Determination of nitrate. In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling Eds, K., Verlag Chemie, Weinheim, 143-150.
- Greenwood, N.N. and Earnshaw, A., 1985. *Chemistry of the Elements*, Pergamon Press.
- Gremyachikh, V.A., Grebenyuk, L.P., Komov, V.T. and Stepanova, I.K., 2006. Accumulation of Mercury and its Teratogenic Effect upon Larvae of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae), *Biologia Vnutrennih*, vod, no. 1, pp. 99–107.
- Grisar, D., Lev-Lehman, E., Shapira, M., Chaikin, E., Lessing, J.B., Eldor, A., Eckstein, F., Soreq, H., 1999. Human osteogenesis involves differentiation-dependent increases in the morphogenetically active 3_′ alternative splicing variant of acetylcholinesterase. *Mol. Cell. Biol.* 19,788–795.
- Grosell, M. and Wood, C.M., 2002. Copper Uptake Across Rainbow Trout Gills: Mechanisms of Apical Entry. *J. Exp. Biol.*, vol. 205, no. 8, pp. 1179–1188.
- Gschwend, P.M., Hites, R.A., 1981. Fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine and lacustrine sediments in the northeastern United States. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45, 2359-2367.
- Guerra-García, J.M., García-Gómez, J.C., 2005. Assessing pollution levels in sediments of a harbour with two opposing entrances: Environmental implications. *Journal of Environmental Management*, 77, 1–11.
- Guevara-Riba, A., Sahuquillo, A., Rubio, R., Rauret, G., 2004. Assessment of metal mobility in dredged harbour sediments from Barcelona, Spain. *Science of the Total Environment*, 321, 241–255.
- Guilhermino, L., Barros, P., Silva, M.C. and Soares, A.M.V.M., 1998. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers*, 3/2, 157-163.
- Guilhermino, L., Lacerda, M.N., Nogueira, A.J.A., Soares, A., 2000. In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *Sci. Total. Environ.*, 247, 137– 141.
- Guitart, C., García-Flor, N., Miquel, J.C., Fowler, S.W., Albaigés, J., 2010. Effect of the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sea surface microlayer on their coastal air–sea exchanges, *Journal of Marine Systems*, 79, 210–217.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S–transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130 – 7139.
- Hagopian-Schlekat, T., Chandler, G.T., Shaw, T.J., 2001. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Mar. Environ. Res.*, 51, 247– 264.
- Haitzer, M., Höss, S., Traunspurger, W., Steinberg, C., 1999. Relationship between concentration of dissolved organic matter (DOM) and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo[a]pyrene. *Aquat. Toxicol.*, 45, 147-158.
- Hamza-Chaffai, A., Romeo, M., Gnassia-Barelli, M., El Abed, A., 1998. Effect on copper and lindane on some biomarkers measured in the clam *Ruditapes decussatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61, 397-404.

- Hardy, J.T., Crecelius, E.A., Antrim, L.D., Broadhurst, V.L., Apts, C.W., Gurtisen, J.M., Fortman, T.J., 1987. The seasurface microlayer puget sound: Part II. Concentrations of contaminants and relation to toxicity. *Mar. Environ. Res.*, 23, 251–271.
- Hardy, J.T., Crecelius, E.A., Antrim, L.D., Kiesser, S.L., Broadhurst, V.L., 1990. Aquatic surface microlayer contamination in Chesapeake Bay. *Mar. Chem.*, 28, 333–351.
- Harvey R.G., 1998. “*Environmental Chemistry of PAHs*”, *PAHs and Related Compounds*, 1-54, vol.3-I, Springer (Berlino).
- Hayes, L.A., Nevin, K.P., Lovley, D.R., 1999. Role of prior exposure on anaerobic degradation of naphthalene and phenanthrene in marine harbor sediments. *Organic Geochemistry*, 30, 937–945.
- Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva. Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillitt, D.E., 2000. Ethoxyresorufin- O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.*, 30, 347-570.
- Hellou, J., Steller, S., Leonard, J., Langille, M.A., Tremblay, D., 2005. Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons between water and particles compared to bioaccumulation in mussels: a harbour cas. *Marine Environmental Research*, 59, 101–117.
- Hernandez, L., Probst, A., Probst, J.L., Ulrich, E., 2003. Heavy metal distribution in some French forest soils: evidence for atmospheric contamination. *The Science of The Total Environment*, vol. 312, no. 1-3, pp.195-219.
- Hinga, K.R., Pilson, M.E.Q., Lee, R.F., Farrington, J.W., Tjessem, K., Davis, A.C., 1980. Biogeochemistry of benzantracene in an enclosed marine ecosystem. *Environ. Sci. Technol.*, 14, 1136–1143.
- Hites, R.A., Laflamme, R.E., Windsor Jr., J.G., 1980. Polycyclic aromatic hydrocarbons in an anoxic sediment core from the Pettaquamscutt River (Rhode Island, USA). *Geochim. Cosmochim. Acta*, 44, 873–878.
- Hobson, K.A., Fisk, A., Karnovsky, N., Holst, M., Gagnon, J.M., Fortier, M.A., 2002. A stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) model for the North Water food web: Implications for evaluating trophodynamics and the flow of energy and contaminants. *Deep-Sea Res.*, Part II 49, 5131–5150.
- Hoffman, E.J., Mills, G.L., Latimer, J.S., Quinn, J.G., 1984. Urban runoff as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons to coastal waters. *Environ. Sci. Technol.*, 18, 580–587.
- Holloway, M.G. and Keough, M. J., 2002b. An introduced polychaete, *Sabella spallanzanii*, affects recruitment and larval abundance of sessile invertebrates. *Ecological Applications*, 12, 1803–1823.
- Hong, H., Xu, L., Zhang, L., Chert, J.C., Wong, Y.S., Wan, T.S.M., 1995. Environmental fate and chemistry of organic pollutants in the sediment of Xiamen harbour and Victoria harbour. *Marine pollution Bulletin*, 31,229-236.
- Hutchings, P., 1998. Biodiversity and functioning of polychaetes in benthic sediments. *Biodiversity and Conservation*, 7, 1133–1145.
- IARC, *Air Pollution, Part 1, Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Industrial Exposures*. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum., 92, 2008: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/allmonos90.php>.

- Ilosvay, L., 1889. Determination of nitrite in saliva and exhaled air. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2, 388-391.
- Ishii, T., Otake, T., Okoshi, K., Nakahara, M., Nakamura, R., 1994. Intracellular localization of vanadium in the fan worm *Pseudopotamilla ocellata*. *Mar. Biol.*, 121, 143–151.
- Jain-Rang, G., Rao, J.V., Gerald, E.W., Kun, Y.Z., 1998. Purification and kinetic analysis of acetylcholinesterase from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Arch Insect Biochem Physiol*, 39: 118–125.
- Jakoby, W.B., 1978. The glutathione S-transferase: a group of multifunctional detoxification proteins. *Advanced Enzymology*, 46, 383 – 411.
- James, R., Sampath, K., Sivakumar, V., et al., 1995. Toxic Effects of Copper and Mercury on Food Intake, Growth and Proximate Chemical Composition in *Heteropneustes fossilis*. *J. Environ. Biol.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–6.
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b* e *c*₁ e *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 167, 191-194.
- Jones, D.M., Rowland, S.J., Douglas, A.G., Howells, S., 1986. An examination of the fate of Nigerian crude oil in surface sediments of the Humber estuary by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 24, 227– 247.
- Kagley, A.N., Snider, R.G., Krishnakumar, P.K., Casillas, E., 2003. Assessment of seasonal variability of cytochemical responses to contaminant exposure in the blue mussel *Mytilus edulis* (complex). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 44, 43– 52.
- Kang, J.J. and Fang, H.W., 1997. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Inhibit the Activity of Acetylcholinesterase Purified from Electric Eel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 238, no. 2, pp. 367-369.
- Kapusta, K.S., Zakrzewska, M., Bajorek, K., Gdula-Argasińska, G., 2003. Input of heavy metals to the forest floor as a result of Cracow urban pollution. *Environment International*, vol. 28, no. 8, pp. 691-698.
- Karageorgis, A., Anagnostou, C., Sioulas, A., Chronis, G., Papathanassiou, E., 1998. Sediment geochemistry and mineralogy in Milos bay, SW Kyklades, Aegean Sea, Greece. *Journal of Marine Systems*, vol. 16, no. 3-4, pp. 269-281.
- Karcher, W., 1988. In: Spectral Atlas of Polycyclic Aromatic Compounds, vol. 2. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Karickhoff, S.W., Brown, D.S., Scott, T.A., 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Research*, 13, 241–248.
- Kaysner, C.A., Tamplin, M.L., Wekell, M.W., Stott, R.F. & Colburn, K.G., 1989. Survival of *Vibrio vulnificus* in shellstock and oyster (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*) and effects of isolation medium on recovery. *Applied and Environmental Microbiology*, 5, 3072–3079.
- Kennish, M.J., 1997. Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution. *CRC Press, USA*, p. 524.
- Kim, G.B., Maruja, K.A., Lee, R.F., Lee, J.H., Koh, C.H., Tanabe, S.S., 1999. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Kyeonggi Bay, Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 28, 166– 169.

- Kjoss, V.A., Grossel, M. and Wood, C.M., 2005. The Influence of Dietary Na on Cu Accumulation in Juvenile Rainbow Trout Exposed to Combined Dietary and Waterborne Cu in Soft Water, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 49, no. 4, pp. 520–527.
- Klaverkamp, J.F., Daungsawadsi, M., MacDonald, W.A., Majewski, H.S., 1977. A evaluation of fenitrothion toxicity in four life stages of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. In aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, ASTMSTO 643 (Mayer, F.L., Hamelink, J.L., editors). Pp. 231-240. American Society for Testing Materials, Pa.
- Kocan, R.M., Von Westernagagen, H., Landolt, M.L., Furstenberg, G., 1987. Toxicity of sea-surface microlayer: effects of hexane extracts on Baltic herring (*Clupea harengus*) and Atlantic cod (*Gadids morgud*) embryos. *Mar. Environ. Res.*, 23, 291–305.
- Komov, V.T. and Stepanova, I.K., 2001. Mercury Pollution, in: *Ecologicheskiye problemy Verhney Volgi* (Ecological Problems of the Upper Volga). Yaroslavl, Yaroslavl State Technological University, pp. 239–243.
- Komov, V.T., Stepanova, I.K. and Gremyachikh, V.A., 2004. Content of Mercury in Muscles of Fish from Waterbodies of Russia north-west: Reasons of Intensive Accumulation and Assessment of Negative Effect Upon Human Health, in: *Aktual'nye problemy vodnoy toxicologii* (Actual Problems of Aquatic Toxicology). Borok, Rybinskii Dom Pechaty, pp. 99–123.
- Kononen, K., Sivonen, K., Lehtimäki, J., 1993. Toxicity of phytoplankton blooms in the Gulf of Finland and Gulf of Bothnia, Baltic Sea. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, pp. 269– 273.
- Konovalov, Yu.D., 1999. Mercury in Fish Organism: Review. *Gidrobiologicheskii Zh.*, vol. 35, no. 2, pp. 74–89.
- Koroleff, F., 1983a. Determination of phosphorus. In: “Methods of seawater analysis”, Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 125-139.
- Koroleff, F., 1983b. Total and organic nitrogen. In: “Methods of seawater analysis”, Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K., Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 162-173.
- Kraemer, L.D., Campbell, G.C. and Hare, L., 2005. A Field Study Examining Metal Elimination Kinetics in Juvenile Yellow Perch (*Perca flavescens*). *Aquat. Toxicol.*, vol. 75, no. 2, pp. 108–126.
- Krahn, M.M., Rhodes, L.D., Myers, M.S., Moore, L.K., MacLeod, W.D., Malins, D.C., 1986. Association between metabolites of aromatic compounds in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15, 61–67.
- Kristensen, E., 2000. Organic matter diagenesis at the oxic/anoxic interface in coastal marine sediments, with emphasis on the role of burrowing animals. *Hydrobiologia*, 426, 1–24.
- Kristensen, P., Tyle, H., 1991. The assessment of bioaccumulation. In: Nagel, R., Loskill, R. (Eds.), *Bioaccumulation in Aquatic Systems. Contributions to the Assessment*. Varlag Chemie, Weinheim, pp. 187-227.

- Kuzubova, L.I., Shuvayeva, O.V. and Anoshin, G.N., 2000. Methylmercury in the Environment (Distribution, Formation in Nature, Methods of Detection): Analytical Review: *Novosibirsk, Gos. Publ. Nauch. Tech. Bibl. Sibir. Otd. RAN*, 82 p.
- La Breche, T.M.S., Dietrich, A.M., Galloghen, D.L. and Shepherd, N., 2002. Copper Toxicity to Larval *Mercenaria mercenaria* (Hard Clam). *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 21, no. 4, pp. 760–761.
- Labrot, F., Ribera, D., Sait Denis, M. and Narbonne, J.F., 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: Lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three nonmammalian species. *Biomarkers*, 1, 21-28.
- Laflamme, R.E., Hites, R.A., 1978. The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42, 289–304.
- Laflamme, R.E., Hites, R.A., 1979. Tetra and pentacyclic, naturally occurring aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochim. and Cosmochim. Acta*, 43, 1687– 1691.
- Landrum, P.F., 1989. Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Technol.*, 23, 588–595.
- Landrum, P.F., Faust, W.R., 1991. Effect of variation in sediment composition on the uptake rate coefficient for selected PCB and PAH congeners by the amphipod, *Diporeia* sp. In: Mayes, M.A., Baron, M.G. (Eds.), *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*, vol. 14, ASTM STP 1124, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 166-180.
- Leadly, T.A., Balch, G., Metcalfe, C.D., Lazar, R., Mazak, E., Habowsky, J., Haffner, D., 1998. Chemical accumulation and toxicological stress in three brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) populations of the Detroit river, Michigan, USA. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 1756-1766.
- Lee, R.F. & Rian, C., 1983. Microbial and photochemical of degradation polycyclic aromatic hydrocarbons in estuarine waters and sediments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, (40), 2, 86-94.
- Lee, R.F., 1998. Annelid cytochrome P-450. *Comp. Biochem. Physiol.*, 12C, 173–179
- Lee, Y.M., Park, T.J., Jung, S.O., Seo, J.S., Park, H.G., Hagiwara, A., Yoon, Y.D., Lee, J.S., 2006. Cloning and characterization of glutathione S-transferase gene in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* and its expression after exposure to endocrine-disrupting chemicals. *Marine Environmental Research*, 62, S219–S223.
- Lehtonen, K.K., Kankaanpää, H., Leiniö, S., Sipiä, V.O., Pflugmacher, S., Sandberg-Kilpi, E., 2003. Accumulation of nodularin-like compounds from the cyanobacterium *Nodularia spumigena* and changes in acetylcholinesterase activity in the clam *Macoma balthica* during short-term laboratory exposure. *Aquat. Toxicol.*, 64, 461–476.
- Lemmens, J.W.T.J., Clapin, G., Lavery, P. & Cary, J., 1996. Filtering capacity of seagrass meadows and other habitats of Cockburn Sound, Western Australia. *Marine Ecology Progress Series*, 143, 187–200.
- Lenártová V., Holovská K., Pedrajas J.R., Martínez-Lara E., Peinado J., López-Barea J., Rosival I. & Kosuth P., 1997. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution. *Biomarkers*, 2, 247-252.

- Lesser, M.P., Shumway, S.E., Cucci, T., Smith, J., 1992. Impact of fouling organisms on mussel rope culture: interspecific competition for food among suspension-feeding invertebrates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 165, 91–102.
- Lewis, D., 1968. Feeding and tube-building in the Fabriciinae (Annelida, Polychaeta). *Proc. Linnean Soc. London*, 179 (1), 37–49.
- Licciano, M., Stabili, L., Cavallo, R. A. & Giangrande, A., 2003. Prove di stabulazione per la valutazione della capacità di accumulo microbiologico con il sabellide filtratore *Sabella spallanzanii* (Annelida: Polychaeta). *Biologia Marina Mediterranea*, 10 (2), 1105–1107.
- Licciano, M., Stabili, L., Giangrande, A., 2005. Clearance rates of *Sabella spallanzanii* and *Branchiomma luctuosum* (Annelida: Polychaeta) on a pure culture of *Vibrio alginolyticus*. *Water Research*, 39 (18), 4375–4384.
- Ligeró, R.A., Barbera, M., Casas-Ruiz, M., Sales, D., Lopez-Aguayo, F., 2002. Dating of marine sediments and time evolution of heavy metal concentration in the Bay of Cadiz, Spain. *Environ. Pollut.*, 118, 97–108.
- Linke-Gamenick, I., Forbes, V.E., Mendez, N., 2000. Effects of chronic fluoranthene exposure on sibling species of *Capitella* with different development modes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 203:191–203.
- Lippiatou, E., Marty, J.C., Saliot, A., 1993. Sediment trap fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*, 44, 43–54.
- Lippiatou, E., Saliot, A., 1991. Hydrocarbons contamination of the Rhone Delta and western Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin*, 22, 297–304.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 42, 656–666.
- Long, E.R., Morgan, L.G., 1991. The potential for biological effects of sediment-sorbed contaminants tested in the National Status and Trend Program. Seattle, Washington, NOAA, pp. 87–134.
- Long, E.R., MacDonald, D.D., Smith, S.L., Calder, F.D., 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ. Manage.*, 19, 81–97.
- Loo, L.O., Rosenberg, R., 1989. Bivalve suspension-feeding dynamics and benthic pelagic coupling in an eutrophicated marine bay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 130, 253–276.
- Loonen, H., Parsons, J.R., Govers, H.A.J., 1994a. Effect of sediment on the bioaccumulation of a complex mixture of polychlorinated dibenzo-p -dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) by fish. *Chemosphere*, 28, 1433-1446.
- Lopez, M.P., Novoa Valinas, M.C., Melgar Riol, M.J., 2002. Induction of cytosolic Glutathione S-transferases from Atlantic eel (*Anguilla anguilla*) after intraperitoneal treatment with polychlorinated biphenyls. *The Science of the Total Environment*, 297, 141–151.
- Lorenzen, C.J., 1967. Determination of chlorophyll and phaeopigments spectrophotometric equation. *Limnol. Ocean.*, 12, 343-346.
- Lorenzen, C.J., Jeffrey, S.W., 1980. Determination of chlorophyll in sea water. *Unesco Tech. Pap. Mar. Sc.*, 35, 1-20.

- Lorenzo, J.L., Nieto, O., Beira, R., 2002. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. *Aquat. Toxicol.*, 58, 27–41.
- Lukkari, T., Taavitsainen, M., Soimasuo, M., Oikari, A., Haimi, J., 2004. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure. *Environmental Pollution*, vol. 129, no. 3, pp. 377-386.
- Lundebye, A.K., Berntssen, M.H.G., Wendelaar Bonga, S.E., Maage, A., 1999. Biochemical and Physiological Responses in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Following Dietary Exposure to Copper and Cadmium. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 39, no. 1-12, pp. 137-144.
- Madsen, S.D., Forbes, T.L., Forbes, V.E., 1997. Particle mixing by the polychaete *Capitella* species 1: coupling fate and effect of a particle-bound organic contaminant (fluoranthene) in a marine sediment. *Marine Ecology Progress Series*, 147, 129–142.
- Magi, E., Bianco, R., Ianni, C., Di Carro, M., 2002. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the Adriatic Sea. *Environmental Pollution*, 119, 91-98.
- Malik, D.S., Sastry, K.V. & Hamilton, D.P., 1998. Effects of zinc toxicity on biochemical composition of muscle and liver of murrel (*Channa punctatus*). *Env. Intern.*, 24 (4), 433-438.
- Mannervik, B., Danielson, U.H., 1988. Glutathione transferases – structure and catalytic activity. *CRC Critical reviews in Biochemistry*, 23, 283,-337.
- Mannino, M.R., Tesi di Dottorato di ricerca in Scienze Chimiche - XIX Ciclo, Tutor Prof. S. Orecchio, Metodi analitici per lo studio della distribuzione di inquinanti organici tossici e metalli pesanti nelle frazioni organiche e inorganiche dei sedimenti, A.A. 2005, Università degli Studi di Palermo.
- Manodori, L., Gambaro, A., Piazza, R., Ferrari, S., Stortini, A.M., Moret, I., Capodaglio, G., 2006. PCBs and PAHs in sea-surface microlayer and sub-surface water samples of the Venice Lagoon (Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 52, 184–192.
- Marcano, L., Nusetti, O., Rodriguez-Grau, J., Vilas, J., 1996. Uptake and depuration of copper and zinc in relation to metal-binding protein in the polychaete *Eurythoe complanata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 114C, 179–184.
- Martella, L., Nelli, L., Bargagli, R., 1997. La diffusione degli elementi in tracce lungo le coste del Salento. Vai preliminari mediante *Mytilus galloprovincialis*. *Lam. Acqua Aria*, (3), 111-117.
- Martinez-Tabche, L., Ramirez, B.M., Germàn, F.C., Galar, C.I, Madrigal, C.I., Madrigal, O.M., Ulloa, G.V., Orozco, F.M., 1997. Toxic effect of sodium dodecylbenzenesulfonate, lead, petroleum, and their mixtures on the activity of acetylcholinesterase of *Moina macrocopa* in vitro. *Environ Toxicol Water Qual*, 12, 211–215.
- Marty, J.C., Saliot, A., 1976. Hydrocarbons (normal alkanes) in the surface microlayer of sea water. *Deep-Sea Res.*, 23, 863–873.
- Maruya, K.A., Risebrough, R.W., Horne, A.J., 1996. Partitioning of polynuclear aromatic hydrocarbons between sediments from San Francisco Bay and their porewaters. *Environmental Science and Technology*, 30, 2942– 2947.

- Mason, A.Z., Storm, S.D., 1993. Applications of directly coupled SEHPLC/ICP-MS in environmental toxicology studies: A study of metal-ligand interactions in cytoplasmic samples. *Mar. Environ. Res.*, 35:19–23.
- Mason, R.P., Laporte, J.M. and Andress, S., 2000. Factors Controlling the Bioaccumulation of Mercury, Methylmercury, Arsenic, Selenium, and Cadmium by Freshwater Invertebrates and Fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 38, no. 3, pp. 283–297.
- Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. & Vallette, F. M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterase. *Progress in Neurobiology*, 41, 31-91.
- Matton, R., Lattam, Q.N., 1969. Effects of organophosphate Dylox on rainbow trout larvae. *J. Fish. Res. Board. Can.* 26, 2193-2200.
- Mazeas, L., Budzinski, H., 2000. Stable carbon isotopic study ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$) of the fate of petrogenic PAHs (methylphenantrene) during an in-situ oil spill simulation experiment. *Organic Geochemistry*, 33, 1253-1258.
- Mazeas, L., Budzinski, H., 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbon $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio measurement in petroleum and marine sediments. Application to standard reference materials and a sediment suspected of contamination from the Erika oil spill. *Journal of Chromatography*, 923, 165– 176.
- McCutchan, J.H., Lewis, W.M., Kendall, C., Mc Grath, C.C., 2003. Variation in trophic shift for stable isotopes ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos*, 102, 378–390.
- McCarthy, J.F., 1990. Implementation of a biomarker-based environmental monitoring program. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 429-440.
- McCarthy, J.F., Halbrook, R.S., Shugart, L.R., 1991. Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarkerbased biomonitoring capability. Publication no. 3072, ORNL/TM- 11783. Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.
- McCarthy, J.F., Shugart, L.R., 1990. Biological markers of environmental contamination. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 3-16.
- McElroy, A.E., Means, J.C., 1988. Uptake, metabolism, and depuration of PCBs by the polychaete *Nereis virens*. *Aquat. Toxicol.*; 11, 416–7.
- McElroy, A.E., Farrington, J.W., Teal, J.M., 1989. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: Varanasi, U. (Ed.), *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press Inc., FL, pp. 1–39.
- McElroy, A.E., 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in the polychaete *Nereis virens*. *Aquat. Toxicol.*, 18, 35–50.
- McKim, J.M., Bradbury, S.P. and Niemi, G.J., 1987. Fish acute toxicity syndromes and their use in the QSAR approach to hazard assessment. *Environ. Health. Perspectives*, 71, 171-186.
- McLusky, D.S., Bryant, V., Campbell, R., 1986. The effects of temperature and salinity on the toxicity of heavy metals to marine and estuarine invertebrates. *Oceanogr. Mar. Biol., Annu. Rev.*, 24, 481–520.

- McNally, D.L., Mihelcic, J.R., Lueking, D.R., 1998. Biodegradation of three- and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions. *Environmental Science and Technology*, 32, 2633–2639.
- Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L., Varanasi, U., 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 143, 79–165.
- Men, B., He, M., Tan, L., Lin, C., Quan, X., 2009. Distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Daliao River Estuary of Liaodong Bay, Bohai Sea (China). *Marine Pollution Bulletin*, 58, 818–826.
- Méndez, N., Pàez-Osuna, F., 1998. Trace metals in two populations of the fireworm *Eurithoe complanata* from Mazatlán Bay: effect of body size on concentrations. *Environ. Poll.*, 102, 279–285.
- Merz, R.A., 1984. Self-generated versus environmentally produced feeding currents: a comparison for the sabellid polychaete *Eudistylia vanouveri*. *The Biological Bulletin*, 167, 200–209.
- Michener, R.H., Schell, D.M., 1994. Stable isotope ratios as tracers in marine aquatic food webs. In: Lajtha K, Michener RH, editors. *Stable isotopes in ecology and environmental science*, p. 138–57.
- Miganti, V., Capelli, R., De Pellegrini, R., Orsi Relini, L. & Relini, G., 1996. Total and organic mercury in offshore crustaceans of the Ligurian Sea and their relations to the trophic levels. *The Sc. of the Total Env.*, 184, 149-162.
- Mikryakov, V.R., Balabanova, L.V., Zobotkina, E.A., et al., 2001. *Reaktsiya Immunnoy Systemy Ryb n Zagryazneniye Vody Toxicantami i Zakisleniye Vody* (Response of Fish Immune System upon Water Pollution by Toxicants and Water Acidification), Moscow, Nauka, 126 p.
- Millward, R.N., Carman, K.R., Fleeger, J.W., Gambrell, R.P., Portier, R., 2004. Mixtures of metals and hydrocarbons elicit complex responses by a benthic invertebrate community. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 310, 115– 130.
- Minagawa, M., Wada, E., 1984. Stepwise enrichment of $\delta^{15}\text{N}$ along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 48, 1135–1140.
- Moore, D., Dillon, T.M., 1993. Chronic sublethal effects of San Francisco Bay sediments on *Nereis (Neanthes) arenaceodentata*. Bioaccumulation from bedded sediments. Final report. Army Engineer Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS (USA). *Environmental Lab Report WESMPELD933*, pp 38.
- Moore, B.C., Dasgupta, N., Martinez, E.A. and Schaumlöffel, J., 2002. The Potential Association Between Mentum Deformities and Trace Elements in Chironomidae (Diptera) Taken From a Heavy Metal Contaminated River, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 42, no. 3, pp. 286–291.
- Moralev, S.N. and Rosengart, E.V., 2000. “Substrate Inhibition” is one of the aspects of substrate specificity in vertebrate and invertebrate cholinesterases. *J. of Evol. Biochem. and Physiol.*, vol. 37, no.5, pp. 358-373.
- Moreau, C.J., Klerks, P.L., Haas, C.N., 1999. Interaction between phenanthrene and zinc in their toxicity to the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 37, 251– 257.
- Moreira, S.M. and Guilhermino, L., 2005. The use of *mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione s-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the northwest portuguese coast. *Environmental Monitoring and Assessment*, 105,309–325.

- Moreira, S.M., Lima, I., Ribeiro, R., Guilhermino, L., 2006. Effects of estuarine sediment contamination on feeding and on key physiological functions of the polychaete *Hediste diversicolor*: laboratory and in situ assays. *Aquat. Toxicol.*, 78, 186–201.
- Morris, A.W., Riley, J.P., 1963. The determination of nitrate in sea water. *Analytica chim. Acta*, 29, 272-279.
- Mostafa, A.R., Barakat, A.O., Qian, Y., Wade, T.L., 2003. Composition, Distribution and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments of the Western Harbour of Alexandria Egypt. *Journal of Soils & Sediments*, 3, 173-179.
- Muniz, P., Danula, E., Yannicelli, B., Garcia-Alonso, J., Medina, G., Bicego, M.C., 2004. Assessment of contamination by heavy metals and petroleum hydrocarbons in sediments of Montevideo Harbour (Uruguay). *Environment International*, 29, 1019–1028.
- Murphy J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chim. Acta*, 27, 31-36.
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S., 2007. Effects Of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. *Environmental Pollution*, vol.149, no. 1, pp. 44-58.
- Najimi, S., 1997. Evaluation de l'état de santé de la baie d'Agadir: Bioaccumulation métallique et réponses de deux biomarqueurs de pollution chez *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna*. Thèse, Université d'Agadir, Maroc.
- Neff, J.M., 1979. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. Sources, Fates and Biological Effects. *Applied Science Publishers*, London, pp. 1– 262.
- Nemova, N.N., 2005. Biohimicheskiye effecty nakopleniya rtuti u ryb (Biochemical Effects of Mercury Accumulation in Fish), Moscow: Nauka, 164 p.
- Nesterova, N.P., Den Gia, Y.M., Vorob Yev, V.A., 1982. Aromatic hydrocarbons in surface waters of the north Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Oceanology*, 22, 709–711.
- Nimis, P.L., 1994. Tecniche di biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico basato sull'utilizzo di licheni come bioindicatori e bioaccumulatori. In: Ecothema Trieste Eds. *Organismi come bioindicatori ambientali*, 97-110.
- NIMPIS, 2002. *Sabella spallanzanii* species summary. National Introduced Marine Pest Information System (Eds: Hewitt, C.L., Martin, R.B., Sliwa, C., McEnnulty, F.R., Murphy, N.E., Jones, T. & Cooper, S.). Web publication <<http://crimp.marine.csiro.au/nimpis>>.
- Nipper, M., Carr, R.S., 2003. Recent advances in the use of meiofaunal polychaetes for ecotoxicological assessments. *Hydrobiologia*, 496, 347–353.
- Norton, B.S., Cormier, S.M., Smith, M., Jones, R.C., 2000. Can biological assessments discriminate among types of stress? A case study from the eastern corn belt plains ecoregion. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 1113–1119.
- NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987. Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect.*, 74, 3-9.

- Nusetti, O., Esclapes, M., Salazar, G., Nusetti, S., Pulido, S., 2001. Biomarkers of oxidative stress in the polychaete *Eurythoe complanata* (Amphinomidae) under short term copper exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 66, 576–581.
- Nydhal, 1976. On the optimum conditions for the reduction of nitrate to nitrite by cadmium. *Talanta*, 23, 349-357.
- Orejas, C., Gili, J.M., Arntz, W.E., Ros, J.D., Lòpez, P.J., Teixidò, N., Filipe, P., 2000. Benthic suspension feeders, key players in Antarctic marine ecosystems? *Contributions to Science*, 1 (3), 299–311.
- Paetzel, M., Nes, G., Leifsen, L.O., Schrader, H., 2003. Sediment pollution in the Va°gen, Bergen harbour, Norway. *Environmental Geology*, 43, 476–483.
- Patti, F.P., Gambi, M.C., 2001. Phylogeography of the invasive polychaete *Sabella spallanzanii* (Gmelin) (Sabellidae) based on stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120B, 437– 448.
- Payne, J.F., Fancey, L.L., Rahimtula, A.D., Porter, E.L., 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86C, 233-245.
- Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W. and Fancey, L., 1996. Acetylcholinesterase, an Old Biomarkers with a New Future? Field Trials in Association with Two Urban Rivers and a Paper Mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 32, no.2, pp. 225-231.
- Pedlar, R.M., Klaverkamp, J.F., 2002. Accumulation and distribution of dietary arsenic in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology*, vol. 57, no. 3, pp. 153-166.
- Peeters, E.T.H.M., Dewitte, A., Koelmans, A.A., Van der Velden, J.A., Den Besten, P.J., 2001. Evaluation of bioassays versus contaminant concentrations in explaining the macroinvertebrate community structure in the Rhine–Meuse delta, the Netherlands. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 2883– 2891.
- Pellegrini, D., Ausili, A., Onorati, F., Ciuffa, G., Gabellini, M., Bigongiari, N., De Ranieri, S., 1999. Characterisation of harbour and coastal sediments: specific destinations of dredged material. *Aquat. Ecosyst. Health Manage.*, 2, 455 –464.
- Perevoznikov, M.A. and Bogdanov, E.A., 1999. *Tyazhelye metally v presnovodnyh ecosystemah* (Heavy Metals in Freshwater Ecosystems), St. Petersburg: GosNIORKh, 228 p.
- Persoone, G., Van de Vel, A., Steertegem, V., De Nayer, B., 1989. Predictive value of laboratory tests with aquatic invertebrates: influence of experimental conditions. *Aquat. Toxicol.*, 14, 149–166.
- Pesch, C.E., Hansen, D.J., Boothman, W.S., Berry, W.J., Mahony, J.D., 1995. The role of acid-volatile sulfide and interstitial water metal concentration sin determining bioavailability of cadmium and nickel from contaminated sediments to the marine polychaete *Neanthes arenaceodentata*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 129–141.
- Petersen, J.K., Riisgård, H.U., 1992. Filtration capacity of the ascidian *Ciona intestinalis* and its grazing impact in a shallow fjord. *Marine Ecology Progress Series*, 88, 9–17.
- Petrushok, N., Gabryelak, T., Palecz, D., Zavodnik, L., Varga, I. S., Deer, K.A., 2002. Comparative study of the xenobiotic metabolism system in the aquatic ecosystems and in acquaria experiments. *Acquatic Toxicology*, 61.

- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.E., Steinberg, C.E.W., 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacteria hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxification. *Biochim. Biophys. Acta*, 1425, 527-533.
- Phillips, D.J.H., 1990. *Aquatic Toxicology*, 16, 151–186.
- Phillips, T.M. and Lovell, C.R., 1999. Distributions of total and active bacteria in biofilms lining tubes of the onuphid polychaete *Diopatra cuprea*. *Marine Ecology Progress Series*, 183, 169–178.
- Pick, M., Flores-Flores, C., Grisaru, D., Shochat, S., Deutsch, V., Soreq, H., 2004. Blood-cell-specific acetylcholinesterase splice variations under changing stimuli. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 22, 523-531.
- Pinnegar, J.K., Polunin, N.V.C., 2000. Contributions of stable-isotope data to elucidating food webs of Mediterranean rocky littoral fishes. *Oecologia*, 122, 399–409.
- Plante-Cuny, M.R., 1974. Evaluation par spectrophotométrie des teneurs en chlorophylle-a fonctionnelle et en phaeopigments des substrats meubles marins. O.R.S.T.O.M. Nosy-Bé, 45 pp.
- Podgurskaya, O.V., Kavun, V.Ya. and Luk'yanova, O.N., 2004. Accumulation and Distribution of Heavy Metals in Organs of Mussel *Crenomytilus grajanus* and in *Modiolus modiolus* from upwelling regions of the Okhotsk Sea and Sea of Japan. *Biologia morya*, vol. 30, no. 3, pp. 219–226.
- Popov, P.A., Androsova, N.V. and Anoshin, G.N., 2002. Accumulation and Distribution of Heavy and Transient Metals in the Novosibirsk Reservoir Fish. *Voprosy Ikhtyologii*, vol. 42, no. 2, pp. 264–270.
- Porte, C. & Albaige S.J., 1993. Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustacean and fishes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26, 273-281.
- Porte, C., Biosca, X., Solé, M., Albaigés, J., 2001. The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). *Environ. Pollut.*, 112, 261–268.
- Post, D.M., 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83, 703-718.
- Pourang, N., Dennis, J.H. and Ghourchian, H., 2004. Tissue Distribution and Redistribution of Trace Elements in Shrimps Species with the Emphasis on the Roles of Metallothionein, *Ecotoxicology*, vol. 13, no. 6, pp. 519–533.
- Power, A., Sheehan, D., 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, C 114, 99-103.
- Prahl, F.G., Crecelius, E., Carpenter, R., 1984. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Washington coastal sediments: an evaluation of atmospheric and riverine routes of introduction. *Environmental Science and Technology*, 18, 687– 693.
- Prieur, D., Mével, G., Nicolas, J.L., Plusquellec, A., Vigneulle, M., 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 28, 277–352.
- Prins, T.C., Smaal, A.C., Dame, R.F., 1998. A review of feedbacks between bivalve grazing and ecosystem processes. *Aquat Ecol*, 31, 349–359.
- Pruell, R.J., Quinn, J.G., 1985. Geochemistry of organic contaminants in Narragansett Bay sediments. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 21, 295–312.

- Pruell, R.J., Quinn, J.G., Lake, J.L. & Davis, W.R., 1987. Availability of PCBs and PAHs to *Mytilus edulis* from artificially resuspended sediments. In Capuzzo, J.M. & Kester, D.R., (Eds.), *Oceanic processes in Marine pollution in biological processes and wastes in the ocean* (pp. 97-108). Malabar, FL: Krieger.
- Qiu, Y.W., Zhang, G., Liu, G.Q., Guo, L.L., Li, X.D., Wai, O., 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the water column and sediment core of Deep Bay, South China, *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 83, 60–66.
- Quaderni IRSA, 1985. Metodi analitici per i fanghi. Parametri chimico-fisici. Istituto di Ricerca Sulle Acque, Quaderno 64, vol. 3, cap. 9.
- Raganato, P., Piccioli Resta, G., Giangrande, A., 2001. Dati preliminari su *Sabella spallanzanii* (Polychaeta: Sabellidae) allevata in condizioni sperimentali. *Thalassia Salentina*, 25. Sito internet: <http://siba2.unile.it/ese/>.
- Rainbow, P.S., Phillips, D.J.H., 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Mar. Poll. Bull.* 26:593–601.
- Rainbow, P.S., 1998. Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans. In: Langston, W.J., Bebianno, M. (Eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman & Hall, London, pp. 285–319.
- Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution*, vol. 120, no. 3, pp. 497-507
- Rainbow, P.S., 2005. Trout Chronically Acclimated to Waterborne or Dietary Cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 48, no. 3, pp. 381–390.
- Rao, J.V., Swamy, A.N., Yamin, S., 1991. *In vitro* brain acetylcholinesterase response among three inbred strains of mice to monocrotophos. *J Environ Sci Health*, B26, 449–458.
- Readman, J.W., Mantoura, R.F.C. & Rhead, M.M., 1984. The physico-chemical speciation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in aquatic system. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 319, 126-131.
- Rees, T., Hammond, P., Soreq, H., Younkin, S. and Brimijoin, S., 2003. Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiol. Aging* in press.
- Regoli, F. and Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31,143-164.
- Regoli, F., Hummel, H., Amiard-Triquet, C., Larroux, C., Sukhotin, A., 1998. Trace metals and variations of antioxidant enzymes in Arctic bivalve populations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 35, 594–601.
- Regoli, F., Pellegrini, D., Winston, G.W., Gorbi, S., Giuliani, S., Virno–Lamberti, C., Bompadre, S., 2002. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Pollution Bulletin*, 44, 912 – 922.
- Rehnstam, A.S., Bäckman, S., Smith, D.C., Azam, F., Hagström, Ä., 1993. Blooms of sequence-specific culturable bacteria in the sea. *FEMS Microbiology Ecology*, 102, 161–166.
- Reilly, C., 1991. Metal contamination of food. 2nd ed., *Elsevier, Essex*, 152-175.

- Reish, D.J., Gerlinger, T.V., 1997. A review of the toxicological studies with polychaetous annelids. *Bulletin of Marine Science*, 60, 584-607.
- Ricciardi, F. Andrea Binelli, A., Provini, A., 2006. Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in zebra mussel for the biomonitoring of Lake Maggiore (northern Italy). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63, 406–412.
- Riedel, G.F., Sanders, J.G., Osman, R.W., 1997. Biogeochemical control on the flux of trace elements from estuarine sediments: Water column oxygen concentrations and benthic infauna. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 44, 23–38.
- Riera, P., Stal, L.J., Nieuwenhuize, J., Richard, P., Blanchard, G., Gentil, F., 1999. Determination of food sources for benthic invertebrates in a salt marsh (Aiguillon Bay, France) by carbon and nitrogen stable isotopes: Importance of locally produced sources. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 187, 301–307.
- Riisgård, H.U., Ivarsson, N.M., 1990. The crown-filament pump of the suspension-feeding polychaete *Sabella penicillus*: filtration, effects of temperature and energy cost. *Marine Ecology Progress Series*, 62, 249–257.
- Riisgård, H.U., Larsen, P.S., 2001b. Minireview: ciliary filterfeeding and bio-fluid mechanics present understanding and unsolved problems. *Limnol. Oceanogr.*, 46 (4), 882–891.
- Ringwood, A.H., Hoguet, J., Klepper, C.J., 2002. Seasonal variation in lysosomal destabilization in oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.*, 54, 793–797.
- Robillard, S., Beauchamp, G., Laulier, M., 2003. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 135, 49–59.
- Robinson, K.A., Baird, D.J. and Wrona, F.G., 2003. Surface Metal Adsorption on Zooplankton Carapaces: Implication for Exposure and Effects in Consumer Organisms. *Environ. Pollut.*, vol. 122, no. 2, pp. 159–167.
- Rogers, H.R., 2002. Assessment of PAH contamination in estuarine sediments using the equilibrium partitioning-toxic unit approach. *The Science of the Environment*, 290, 139-155.
- Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J.R., Elder, J., 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar. Pollut. Bull.*, 44, 671–679.
- Rouse, G., Fitzhugh K., 1994. Broadcasting fable: is external fertilization really primitive? Sex, size and larvae in sabellid polychaetes. *Zool. Sci.*, 23(3), 1-42.
- Roy, R. and Campbell, R.G.C., 1995. Survival Time Modeling of Exposure of Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*) to mixtures of aluminum and zinc in soft water at low pH. *Aquatic Toxicology*, vol. 33, no. 2, pp.155-176
- Ruiz Munoz, F., González-Regalado, M.L., Borrego Flores, J.J., Morales, A., 1997. The response of ostracod assemblages to recent pollution and sedimentary processes in the Huelva Estuary, SW Spain. *Science of The Total Environment*, vol. 207, no. 2-3, pp. 91-103.
- Saiz-Salinas, J.J., Francés-Zubillaga, G., 1997. *Nereis diversicolor*: An unreliable biomonitor of metal contamination in the “Ria de Bilbao” (Spain). *Mar. Ecol. PSZN*, 18:113–125.

- Saiz-Salinas, J.J., Ruiz, J.M., Francés-Zubillaga, G., 1996. Heavy metal levels in intertidal sediments and biota from the Bidasoa Estuary. *Mar. Pollut. Bull.*, 32, 69–71.
- Samson, J.S. and Shenker, J., 2000. The Teratogenic Effects of Methyl Mercury on Early Development of the Zebrafish *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.*, vol. 48, no. 2–3, pp. 343–354.
- Sanchez-Hernandez, J.C., Fossi, M.C., Loenzio, C., Focardi, S., Barra, R., Gavilan, J.F., Parra, O., 1998. Use of biochemical biomarkers as a screening tool to focus the chemical monitoring of organic pollutants in the Bio river basin (Chile). *Chemosphere*. vol. 37, no. 4, pp. 669–710.
- Santos, M.A., Pacheco, M., Ahmad, I., 2003. *Anguilla anguilla* antioxidants responses to in situ bleached kraft pulp mill effluent outlet exposure. *Environment International*, 30, 301–308.
- Sarnowski, P., 2003. The effects of Metals on Yolk Sac Resorption and Growth of Starved and Fed Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Acta sci. pol. Pisc.*, no. 2, pp. 227–235.
- Scaps, P., Demuyne, S., Descamps, M., Dhainaut, A., 1997. Effects of organophosphate and carbamate pesticides on acetylcholinesterase and choline acetyltransferase of the polychaete *Nereis diversicolor*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 33, 208–230.
- Schloesser, D.W., 1988. Zonation of mayfly nymphs and caddisfly larvae in the St. Marys River. *J. Great Lakes. Res.*, 14, 227–233.
- Selck, H., Decho, A.W., Forbes, V.E., 1999. Effects of chronic metal exposure and sediment organic matter on digestive absorption efficiency of cadmium by the deposit-feeding polychaete *Capitella* species I. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 1289–1297.
- Serra, R., Carpena, E., Marcantonio, A.C. and Isani, G., 1995. Cadmium Accumulation and Cd-Binding Proteins in the Bivalve *Scapharca inaequivalvis*, *Comp. Biochem. and Physiol. C.*, vol. 111, no. 2, pp. 165–174.
- Shabad, L.M., Il'nitskii, A.P., 1979. Carcinogens in the Human Environment. SzabvanykidoÂ Budapest.
- Shailaja, M.S., D'Silva, C., 2003. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere*, 53, 835–841.
- Shanks, A.L., 1983. Surface slicks associated with tidally forced internal waves may transport pelagic larvae of benthic invertebrates and fishes shoreward. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 13, 311–315.
- Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem., Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxicol.*, 123, 193–199.
- Shinn M.B., 1941. A colorimetric method for the determination of nitrite. *Ind. Eng. Chem Anal. Ed.*, 13, 33–35.
- Shpigel, M., Neori, A., Popper, D.M. and Gordin, H., 1993. A proposed model for “environmental clean” land-based culture of fish, bivalves and seaweeds. *Aquaculture*, 117, 115–128
- Shumway, S.E., Bogdanowicz, C., Dean, D., 1988. Oxygen consumption and feeding rates of the sabellid polychaete, *Myxicola infundibulum* (Renier). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90A (3), 425–428.
- Simcik, M.F., Eisenreich, S.J., Golden, K.A., Liu, S., Lipiatou, E., Swackhamer, D.L., Long, D.T., 1996. Atmospheric loading of polycyclic aromatic hydrocarbons to Lake Michigan as recorded in the sediments. *Environmental Science and Technology*, 30, 3039–3046.

- Simkiss, K., 1995. The application of controlled release and QSAR technology to sediment toxicity. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 31, no. 1-3, pp. 28-31.
- Simpson, S.L., Pryor, I.D., Mewburn, B.R., Batley, G.E., Jolley, D.F., 2002. Considerations for capping metal contaminated sediments in dynamic estuarine environments. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 3772–3778.
- Simpson, S.L., Batley, G.E., 2003. Disturbances to metal partitioning during toxicity testing iron(II)-rich estuarine pore waters and whole sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22, 424–432.
- Simpson, S.L., Angel, B.M., Jolley, D.F., 2004. Metal equilibration in laboratory-contaminated (spiked) sediments used for the development of whole-sediment toxicity tests. *Chemosphere*, 54, 597–609.
- Simpson, S.L., 2005. An exposure-effect model for calculating copper effects concentrations in sediments with varying copper binding properties: a synthesis. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 7089–7096.
- Sivonen, K., Kononen, K., Carmichael, W.W., Dahlem, A.M., Rinehart, K.L., Kiviranta, J., Niemelä, S.I., 1989. Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and the structure of toxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1990–1995.
- Smolders, R., Bervoets, L., De Boeck, G., Burst, R., 2002. Integrated condition indices a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 21, 87–93.
- Sobolev, K.D., 2005. Toxicological Peculiarities of Accumulation of Heavy Metal Ions in Natural and Artificial Fish Food under Conditions of Electric Power Stations' Warm Waste Waters. *Sbornik trudov Federal'nogo gosudarstvennogo nauchno-issledovatel'skogo institute ozernogo i rechnogo rybnogo hozyaistva* (Collection of Papers of Federal State Scientific institute GOSNIORKh), no. 333, pp. 362–373.
- Soclo, H.H., Garrigus, P., Ewald, M., 2000. Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in costal marine sediments – case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Marine Pollution Bulletin*, 40, 387-396.
- Soreq, H., Lapidot-Lifson, Y., Zakut, H., 1991. A role for cholinesterases in tumorigenesis? *Cancer Cells*, 3, 511–516.
- Soreq, H. and Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase-New roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 294-302.
- Sportsol, S., Gros, N., Lichtenthaler, R.G., Gustavsen, K.O, Urdel, K., Ordell, F., Skel, J., 1983. Source identification of aromatic hydrocarbons in sediments using GC/MS. *Environmental Science and Technology*, 17, 282–286.
- Sprovieri, M., Feo, M.L., Prevedello, L., Salvagio Manta, D., Sammartino, S., Tamburrino, S., Marsella, E., 2007. Heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in surface sediments of the Naples harbour (southern Italy). *Chemosphere*, 67 (2007) 998–1009.
- Spry, D.J. and Wiener, T.G., 1991. Metal Bioavailability and Toxicity to Fish From Low-Alkalinity Lakes: a Critical Review, *Environ. Pollut.*, vol. 71, no. 2–4, pp. 243–304.
- Stabili, L., Licciano, M., Giangrande, A., Fanelli, G., Cavallo, R.A., 2005. *Sabella spallanzanii* filter-feeding on bacterial community: Ecological implications and applications. Istituto per l'Ambiente Marino Costiero- Sezione di Taranto – CNR 3.

- Stabili, L., Licciano, M., Giangrande, A., Fanelli, G., Cavallo, R.S., 2006. *Sabella spallanzanii* filter-feeding on bacterial community: Ecological implications and applications. *Marine Environmental Research*, vol. 61, no. 1, pp. 74-92.
- Stabili, L., Schirosi, R., Licciano, M., Giangrande, A., 2009. The mucus of *Sabella spallanzanii* (Annelida, Polychaeta): Its involvement in chemical defence and fertilization success. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 374, no. 2, pp. 144-149.
- Stebbing, A.R.D., 1985. Organotins and water quality some lessons to be learned. *Marine Pollution Bulletin*, 16, 383-390.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Richard, T.D.G., Foörlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 235-335.
- Stegeman, J.J., Hahn, M.E., 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, CRC press, Boca Raton, pp. 87-/206.
- Stepanova, I.K. and Komov, V.T., 1997. Accumulation of Mercury in Fish from Vologodskaya oblast waterbodies, *Ecologia*, no. 4, pp. 295–299.
- Stien, X., Percic, P., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., Lafaurie M., 1998. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution*, 99, 339 – 345.
- Straus, D.L., 2003. The Acute Toxicity of Copper to Blue Tilapia in Dilutions of Settled Pond Water. *Aquaculture*, vol. 219, no. 1–4, pp. 233–240.
- Strickland, J.D., Parsons, T.R., 1968. A practical handbook of sea water-analysis. *Bull. Fish. Res. Board Can*, 167, 1-312.
- Sturm, A., Silva de Assis, Hansen, P.D., 1999. Cholinesterase of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Mar. Environ. Res.*, 47, 389-398.
- Suedel, B.C., Rodgers, J.H., Clifford, P.A., 1993. Bioavailability of fluoranthene in freshwater toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 155–165.
- Suess, M.J., 1976. The environmental load and cycle of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Science of the Total Environment*, 6, 239-250.
- Sumpter, J.P., Jobling, S., Tyler, C.R., 1996. Oestrogenic substances in the aquatic environment and their potential impacts on animals, particularly fish. In: Taylor E.W. Ed. *Toxicology aquatic pollution: physiological, molecular and cellular approaches*, Cambridge University Press, 205-223.
- Sun, F.H., Zhou, Q.X., 2008. Oxidative stress biomarkers of the polychaete *Nereis diversicolor* exposed to cadmium and petroleum hydrocarbons. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 70, 106–14.

- Swartz, R.C., Schults, D.W., Ozretich, R.J., Lamberson, J.O., Cole, F.A., DeWitt, T.H., Redmond, M.S., Ferraro, S.P., 1995. APAH: a model to predict the toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures in field collected sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 1977-1987.
- Taylor, L.N., McGeer, J.C., Wood, C.M., and McDonald, D.G., 2000. Physiological Effects of Chronic Copper Exposure to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Hard and Soft Water: Evaluation of Chronic Indicators. *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 19, pp. 2298–2308.
- Thiele, S., Brümmer, G.W., 2002. Bioformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil under oxygen deficient conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 733-735.
- Thomann, R.V., 1989. Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.*, 23, 699-707.
- Thomann, R.V., Connolly, J.P., 1984. Model of PCB in the Lake Michigan lake trout food chain. *Environ. Sci. Technol.*, 18, 65-71.
- Tietjen, J.H., Lee, J.J., 1984. The use of free-living marine nematodes as a bioassay for estuarine sediments. *Mar. Environ. Res.*, 11, 233– 251.
- Tranchina, L., Basile, S., Brai, M., Caruso, A., Cosentino, C., Miccichè, S., 2008. Distribution of Heavy Metals in Marine Sediments of Palermo Gulf (Sicily, Italy). *Water Air Soil Pollut.*, 191, 245–256.
- Tsai, P., Hoenicke, R., Yee, D., Bamford, H.A., Baker, J.E., 2002. Atmospheric concentrations and fluxes of organic compounds in the northern San Francisco Estuary. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 4741–4747.
- Tsai, P.J., Shih, T.S., Chen, H.L., Lee, W.J. Lai, C.H., Lion, S.H., 2004. Assessing and predicting the exposures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their carcinogenic potencies from vehicle engine exhausts to highway toll station workers. *Atmospheric Environment*, 38, 333-343.
- Turekian, K.K. & Wedepohl, K.H., 1961. *Distribution of the elements in some major units of the earth's crust. Bulletin of the Geological Society of America*, 72, 175–192.
- U.S. EPA United States Environmental Protection Agency, 1985. *Health Assessment Document for Nickel. EPA/600/8-83/012F. Natl Environ Res Centre, Cincinnati.*
- US EPA United States Environmental Protection Agency, 1986. *Guidelines for the health risk assessment of chemical mixtures, US environmental protection agency. Fed. Regist.* 51, 34014–34025.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, Th., Triantafyllaki, S., Dassenakis, M., Androustos, F., Scoullas, M., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface seawater and in indigenous mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from coastal areas of the Saronikos Gulf (Greece). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 79, 733–739.
- Valderrama, J.C., 1881. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Mar. Chem.*, 10, 109-122.
- Valerio, F., Bottino, P., Ugolini, D., Cimberle, M.R., Tozzi, G.A., Frigerio, A., 1984. Chemical and photochemical degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere. *The Science of The Total Environment*, vol. 40, no. 1, pp. 169-188.
- Van der Oost, R., Opperhuizen, A., Satumalay, K., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1996a. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquat. Toxicol.*, 35, 21-46.

- Van Gestel, C.A.M., Van Brummelen, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, 5, 217-225.
- Van Leeuwen, C.J., Hermens, J.L.M., 1995. *Risk Assessment of Chemicals: an Introduction*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Vandenhurk, P., Faisal, M., Roberts, M.H., 1998. Interaction of cadmium and benzo[a]pyrene in mummichog (*Fundulus heteroclitus*): effects on acute mortality. *Mar. Environ. Res.*, 46, 525–528.
- Vander Zanden, M.J., Rasmussen, J.B., 2001. Variation in $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ trophic fractionation: Implications for aquatic food web studies. *Limnology and Oceanography*, 46, 2061-2066.
- Vander Zanden, M.J., Vadeboncoeur, Y., 2002. Fishes as integrators of benthic and pelagic food webs in lakes. *Ecology*, 83 (8), 2152–2161.
- Vanderklift, M.A., Ponsard, S., 2003. Sources of variation in consumer diet $\delta^{15}\text{N}$ enrichment: A meta analysis. *Oecologia*, 136, 169–182.
- Venkatesan, M.I., 1988. Occurrence and possible sources of perilene in marine sediments a review. *Marine Chemistry*, 25, 1-27.
- Ventura, E.C., Gaelzer, L.R., Zanette, J., Marques, M.R.F., Bainy, A.C.D., 2002. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coasts. *Marine Environmental Research*, 54, 775-779.
- Vermeulen, N.P.E., 1996. Role of metabolism in chemical toxicity. In: Ioannides, C. (Ed.), *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 29-53.
- Viarengo, A., 1985. Biochemical effects of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 16, no. 4, pp. 153-158.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxicol.*, 100, 187–190.
- Vidal, M.L., Bassères, A., Narbonne, J.F., 2002. Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Muller). *Comp. Biochem. Physiol.*, 131C, 133– 151.
- Vidal, M.L., Rouimi, P., Debrauwer, L., Narbonne, J. F., 2002. Purification and characterisation of glutathione S-transferases from the freshwater clam *Corbicula fluminea* (muller). *Comparative Biochemistry and physiology C*, 131, 477 – 489.
- Vidal, M.L., Cecilio, J., 2005. Expression of cholinesterases in brain and non-brain tumours. *Chem. Biol. Inter.*, 157–158, 227–232.
- Vieira, L.R., Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L., 2008. Acute effects of benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Science of the total environment*, 395, 87-100.
- Vigano, L., Arillo, A., Melodia, F., Bagnasco, M., Bennicelli, C. & De Flora, S., 1995. Hepatic and biliary biomarkers in rainbow trout injected with sediment extracts from the river Po (Italy). *Chemosphere*, 30, 11: 2117-2128.

- Vizzini, S., Mazzola, A., 2006. The effects of anthropogenic organic matter inputs on stable carbon and nitrogen isotopes in organisms from different trophic levels in a southern Mediterranean coastal area. *Science of the Total Environment*, 368, 723–731.
- Voudrias, E.A., Smith, C.L., 1986. Hydrocarbon pollution from marinas in estuarine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 22, 271–284.
- Wakeham, S.G., Schaffner, C., Giger, W., 1980. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediment-II. Compounds derived from biogenic precursors during early diagenesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 44, 415–429.
- Wallace, W.G., Lee, B.G. and Luotta, S.N., 2003. Subcellular Compartmentalization of Cd and Zn in Two Bivalves. I. Significance of Metal-Sensitive Fractions (MSF) and Biologically Detoxified Metal (BDM). *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, vol. 249, pp. 183–197.
- Wells, G.P., 1952. The respiratory significance of the crown in the polychaete worms Sabella and Myxicola. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, vol. 140, no. 898, pp. 70-82.
- Wen-Xiong, W., Stupakoff, I., Fisher, N.S., 1999. Bioavailability of dissolved and sediment-bound metals to a marine deposit-feeding polychaete. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 178, 281– 293.
- Whittaker, J.R., 1973. Segregation during ascidian embryogenesis of egg cytoplasmic information for tissue-specific enzyme development. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, vol. 70, no.7, pp.2096-2100.
- Whittaker, J.R., 1977. Segregation during cleavage of a factor determining endodermal alkaline phosphatase development in ascidian embryos. *J. Exp. Zool.*, 202,139-154.
- WHO, World Health Organization, 1989. IARC Monographs, vol. 46. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 41–155.
- WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155.
- Widdows, J., Brinsley, M.D., Salkeld, P.N. & Elliott, M., 1998. Use of annular flumes to determine the influence of current velocity and bivalves on material flux at the sediment–water interface. *Estuaries*, 21, 552-559.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 19, 137–161.
- Withehouse, B.G., 1984. The effects of temperature and salinity on the aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Marine Chemistry*, vol. 14, no. 4, pp. 319-332.
- Witt, G., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediments of the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 31, 237– 248.
- Witt, G., 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediments of the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 36, 577–586.
- Witt, G., Matthäus, W., 2001. The impact of salt water inflows on the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the deep water of the Baltic Sea. *Marine Chemistry*, 74, 279–301.

- Wood, P.C., 1957. Factors affecting the pollution and self purification of molluscan shellfish. *Journal du Conseil permanent International pour l'Exploration de la Mer*, 22, 202–208.
- Woodin, S.A., 1981. Disturbance and community structure in a shallow water sand flat. *Ecology*, 62, 1052–1066.
- Woodin, S.A., 1983. Biotic interactions in recent marine sedimentary environments. In 'Biotic Interactions in Recent and Fossil Benthic Communities'. (Eds M. J. S. Tevesz and P. L. McCall.) pp. 837. (Plenum Press: New York).
- Word, J.Q., Hardy, J.T., Crecelius, E.A., Kiesser, S.L., 1987. A laboratory study of the accumulation and toxicity of contaminants at the sea-surface from sediments proposed for dredging. *Mar. Environ. Res.*, 23, 325–338.
- Wu, T.L., Lambert, L., Hastings, D., Banning, D., 1980. Enrichment of the agricultural herbicide atrazine in the microsurface water of an estuary. *Bull. Environ. Toxicol.*, 24, 411–414.
- Yadav, A., Singh, R.K., Sharma, B., (1998). Interaction of carbofuran with the acetylcholinesterase from the brain of the teleost, *Clarias batracus*. *Toxicol. Environ. Chem.*, 65, 245-254.
- Yam, W.C., Chan, C.Y., Ho Bella, S.W., Tam, T.Y., Kueh, C., Lee, T., 1999. Abundance of clinical enteric bacterial pathogens in coastal waters and shellfish. *Water Res.*, 34 (1), 51–56.
- Yang, N.F.Y., Ke, L., Wang, X.H. and Woog, Y.S., 2001. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of mangrove swamps. *Environmental Pollution*, 114, 255-263.
- Yang, G.P., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the South China Sea. *Environmental Pollution*, 108, 163-171.
- Ying, W., Batley, G.E., Ahsanullah, M., 1992. The ability of sediment extractants to measure the bioavailability of metals to three marine invertebrates. *Trace Metals Aquat. Environ.*, 125, 67–84.
- Yoshinaga, M., Ueki, T., Michibata, H., 2007. Metal binding ability of glutathione transferases conserved between two animal species, the vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis* samea and the schistosome *Schistosoma japonicum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770, 1413–1418.
- Youngblood, W.W., Blumer, M., 1975. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: homologous series in soils and recent marine sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 39, 1303–1314.
- Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Virgazan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., Sylvestre, S., 2000. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry*, 33, 489-515.
- Zhang Q., Zhou, Q., Wang, J., Sun, S., Hua, T., Ren, L., 2008. Influences of Cu or Cd on the neurotoxicity induced by petroleum hydrocarbons in ragworm *Perinereis aibuhitensis*. *Journal of Environmental*, 20, 364–371.
- Zhang, X.J., Yang, L., Zhao, Q., Caen, J.P., He, H.Y., Jin, Q.H., Guo, L.H., Alemany, M., Zhang, L.Y., 2002. Shi, Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ.* 9, 790–800.

TESTI CONSULTATI

Storer, U., Stebbins, N., 1982. Zoologia. Ed. Zanichelli.

RINGRAZIAMENTI

Alla fine di questo mio lavoro, desidero porgere i miei più sinceri ringraziamenti al Prof. Antonio Mazzola, per la sua professionalità e la sua preziosa disponibilità e soprattutto per avermi dato la possibilità di realizzare questo lavoro.

Ringrazio il Prof. Santino Orecchio che si è reso disponibile in ogni fase del mio lavoro, aiutandomi a superare ogni difficoltà e a chiarire ogni mio dubbio.

Inoltre, desidero ringraziare tutto il gruppo di lavoro del Prof. Antonio Mazzola, in particolare il Dott. Andrea Savona, il quale mi ha prontamente aiutato in tutti momenti più difficili, la Dr.ssa Cecilia Tramati per gli utili consigli e i suggerimenti, e la Dr.ssa Valeria Tumbarello per il valido sostegno morale durante tutto il tempo trascorso insieme.

Non posso dimenticare la preziosa collaborazione con il Dott. Nicola Tuzzolino, un carissimo collega con cui ho condiviso momenti difficili per la realizzazione di questa tesi.

Un grazie particolare lo dedico a mio padre e al resto della mia famiglia che mi è stata vicina nei momenti più difficili del mio percorso di studi e grazie alla quale sono arrivata alla fine.