



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE BIOLOGICHE, CHIMICHE E FARMACEUTICHE

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE XXIV CICLO
(S.S.D.: BIO/07)

Gestione sostenibile delle risorse marine: i Poriferi per la valutazione dello stato ambientale e per la depurazione delle acque. Studio di organismi marini ad alto potere filtrante per azioni di biomonitoraggio e di bioremediation.



DOTTORE

Dr.ssa *Marilisa Vassallo*

TUTOR

Ch.^{mo} Prof. *Antonio Mazzola*

COORDINATORE

Ch.^{mo} Prof. *Marco Arculeo*

CO TUTOR

Ch.^{ma} Prof.ssa *Margherita Ferrante*

CICLO XXIV

Anno conseguimento titolo 2015

PREMESSA

L'interesse per i poriferi è diventato sempre maggiore nell'ambito della ricerca scientifica. Oltre al più antico e conosciuto uso delle spugne nella cosmesi, il valore terapeutico e la capacità filtrante-assorbente hanno reso questi animali importanti in molti campi.

Dalle spugne si estraggono sostanze chimiche altamente efficaci, usate dagli organismi come veleni anti predazione o anti batterici. Oggi si sa che queste sostanze bioattive sono di grande valore terapeutico. Alcuni di questi veleni, infatti, si sono dimostrati utili anche per l'uomo.

Ma la Medicina, la Farmacologia e la Cosmesi non sono gli unici settori. Recentemente una maggiore attenzione ai poriferi si è sviluppata nell'ambito dell'Ecologia, per il monitoraggio ambientale e la ricostruzione di ecosistemi danneggiati dall'inquinamento.

L'ambiente marino rappresenta un'importantissima fonte di nuove risorse dal potenziale impiego biotecnologico. Nel settore delle biotecnologie marine le spugne sono organismi ideali per la ricerca applicata nell'ottica dello sfruttamento sostenibile delle risorse naturali.

In particolare alcune specie, molto comuni nel Mar Mediterraneo, si prestano per questi scopi.

Un esempio è dato da *Chondrilla nucula*, la spugna oggetto del presente studio.

Le caratteristiche di questi animali consentono di affermare che le spugne possono portare benefici direttamente all'ambiente marino, con la ricostruzione degli ecosistemi originari, e, indirettamente, alla comunità locale del territorio interessato.

Le spugne sono organismi filtratori attivi che si nutrono trattenendo la frazione organica particolata o disciolta presente nell'acqua. Inoltre, la capacità rigenerativa dei poriferi, in grado di produrre organismi perfettamente funzionali a partire da piccoli frammenti, li rende gli

organismi ideali per la coltura in mare destinata a diverse applicazioni tra cui la depurazione delle acque degradate dalle attività antropiche e il monitoraggio ambientale. La coltura dei poriferi ha un doppio scopo, in quanto attraverso impianti di spongicoltura, finalizzati al bioremediation, è possibile produrre su larga scala biomassa utilizzabile di alto interesse applicativo nei campi farmaceutico, biomedico e industriale, tramite l'estrazione di composti bioattivi prodotti naturalmente dalle spugne (Gifford *et al.*, 2007).

La capacità filtrante dei poriferi è l'aspetto più importante ai fini del biomonitoraggio, del restauro ambientale e della depurazione delle acque. I processi che avvengono all'interno dell'animale sono estremamente efficienti e permettono una filtrazione completa dell'acqua, oltre che un accumulo di sostanze, inquinanti e non. Questa caratteristica permette di affermare che allevamenti di spugne sono in grado di abbattere in maniera notevole il tasso di inquinamento organico favorendo il mantenimento di ecosistemi in aree sensibili ad elevato rischio di degrado. In particolare la specie di spugna *Chondrilla nucula*, volgarmente chiamata Spugna cervello, può trattenere quantità elevate del batterio *Escherichia coli*, con una capacità di pompaggio dell'acqua di 14 litri per ora ed una capacità di ritenzione di 7×1.010 batteri/h per 1 m^2 di copertura, risultando perciò utile per l'impiego nel recupero dell'ecosistema marino (Milanese *et al.*, 2003).

Recenti sperimentazioni hanno prodotto risultati significativi sulla spongicoltura in situ, con una potenzialità di biofiltrazione stimata nella capacità di rimozione di quasi il 50% della carica batterica e organica presente nella colonna d'acqua (Zhang X. *et al.*, 2009).

Le spugne sono anche conosciute come bioaccumulatori di metalli pesanti (Bargagli *et al.*, 1996; Cebrian *et al.*, 2003).

L'utilizzo delle spugne per applicazioni di rilevanza per la cura dell'ambiente ha un importantissimo risvolto in quanto gli organismi sfruttati e "contaminati" possono essere fonte di metaboliti di interesse nel settore industriale (Gifford *et al.*, 2007).

E' noto che le spugne producono composti che agiscono nei meccanismi di difesa chimica, contro la predazione, o nelle strategie di competizione per lo spazio, inibendo l'insediamento del microfouling, del macrofouling e dei parassiti. Pertanto la produzione di biomassa nell'ambito di impianti di spongicoltura può essere oltretutto finalizzata all'estrazione di composti utili per la produzione dei prodotti antivegetativi (antifoulant).

Inoltre, recentemente, i Poriferi sono stati rivalutati come organismi sentinella per lo stato di salute delle acque, in quanto animali in grado di accumulare alte concentrazioni di metalli pesanti e altri inquinanti con maggiore efficienza rispetto ad altri organismi storicamente utilizzati come bioindicatori (Batista *et al.*, 2014; Mahaut *et al.*, 2013).

Le spugne, pertanto, risultano essere organismi impiegabili per azioni di monitoraggio ambientale, di bioremediation e di restauro ambientale.

Proprio per questo motivo, supportati da lavori recenti, questa ricerca ha previsto lo studio di *Chondrilla nucula* al fine di eleggere la specie come bioindicatore e *bioremediator* di aree estremamente degradate da elevati livelli di inquinamento organico e inorganico.

1 INTRODUZIONE

Una corretta gestione del mare significa proteggere il confine con la terra emersa e pianificare razionalmente la distribuzione e lo sviluppo delle attività umane.

Per parlare di protezione è necessario considerare in primo luogo il ruolo della fascia costiera e la sua condizione subordinata rispetto all'entroterra.

Molte delle attività più inquinanti si svolgono lungo la costa. Per le sue caratteristiche privilegiate, queste aree marine “di confine” sono state da sempre sfruttate per usi altamente produttivi e, allo stesso modo, dannosi e inquinanti. La fascia costiera è per definizione l'interfaccia al limite fra terra, acqua ed atmosfera e, nel sistema terra-mare, è il luogo critico.

La crescente urbanizzazione, i rifiuti delle attività agricole e industriali hanno introdotto nella fascia marina costiera, a lungo andare, un enorme quantitativo di sostanze tossiche che hanno compromesso l'integrità dell'ecosistema marino, causando uno stravolgimento delle condizioni ambientali con conseguenze in molti casi irrimediabili sulle specie vegetali e animali.

L'ONU definisce l'inquinamento marino come *“l'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”*.

Le specie che vivono in acqua sono le prime vittime che subiscono gli effetti dell'inquinamento.

Ciò avviene a differenti livelli dell'organizzazione biologica, a partire dai cambiamenti a livello subcellulare fino a comportare trasformazioni a livello delle comunità.

1.1 NORMATIVA NAZIONALE ED EUROPEA SULLA TUTELA DELLE ACQUE

Le problematiche riguardanti l'acqua e la gestione delle risorse idriche hanno, da sempre, rappresentato un fattore decisivo per lo sviluppo della società. Infatti, non soltanto la nostra esistenza sulla Terra, ma anche tutte le attività antropiche, comprese quelle produttive ed economiche, dipendono completamente da questa risorsa.

Proprio per questo la comunità è sempre più impegnata ad affrontare il problema attraverso norme e regole di tutela degli ambienti acquatici.

1.1.1 GLI OBIETTIVI DELL'UNIONE EUROPEA

La tutela delle acque rappresenta un argomento della massima importanza nella legislazione ambientale europea. A partire dagli anni '70, infatti, si è avuta una proliferazione frenetica di direttive e decisioni fino ad arrivare ad un totale di 22 interventi. Le direttive del Consiglio europeo adottate tra il 1975 e il 1980 si sono occupate di stabilire i requisiti qualitativi delle acque in ragione dell'uso della risorsa idrica.

La prima Direttiva 76/160/CEE del Consiglio, dell'8 dicembre 1975, riguardava la qualità delle acque di balneazione, mentre la Direttiva 79/923/CEE del Consiglio, del 30 ottobre 1979, era relativa ai requisiti di qualità delle acque destinate alla molluschicoltura.

Le normative avevano dunque come obiettivo primario la riduzione e, successivamente, l'eliminazione dell'inquinamento delle risorse idriche, possibilmente alla fonte.

Gli obiettivi di qualità erano basati su parametri espressi in termini di concentrazione delle sostanze inquinanti o di intensità degli incidenti ambientali. Ogni direttiva, poi, definiva i parametri qualitativi differenziati in rapporto alla categoria delle acque superficiali, indicava la

frequenza dei campionamenti, i metodi per il campionamento e l'analisi dei campioni sui quali effettuare il controllo di qualità.

L'insieme degli atti legislativi comunitari in materia di acque, però, andava a costituire un sistema intricato all'interno del quale era difficile orientarsi. Con l'emergere dell'esigenza di dare alla materia una disciplina unitaria, coerente e in grado di affrontare tutte le criticità che si andavano presentando nella gestione delle risorse idriche, è stata avviata un'opera di razionalizzazione e di unificazione a partire proprio dal quadro normativo.

La Commissione si è, così, adoperata per cambiare i fondamenti della legislazione sulle acque e, a partire dal 1994, sono state elaborate proposte alternative per un nuovo approccio alle politiche idriche proponendo, alla fine del 1997, l'adozione di una direttiva quadro, sulla base della procedura di cooperazione.

Il procedimento legislativo, difficoltoso, si è concluso solo il 29 luglio 2000, con la definitiva adozione della direttiva quadro sulle acque nel settembre dello stesso anno.

La direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio istituisce il quadro per un'azione comunitaria in materia di acque basata su un approccio integrato ed ecosistemico alla pianificazione e gestione della risorsa idrica. La direttiva sostituisce ed unifica tutte le precedenti normative di settore, ed indica una nuova linea di interventi al fine di assicurare la protezione dell'ambiente idrico, inteso nella sua totalità, nell'ambito del territorio comunitario.

La direttiva quadro propone, dunque, un vero e proprio salto di qualità. Essa abbandona la prospettiva settoriale e adotta piuttosto un approccio unitario e circolare, che guarda al ciclo dell'acqua in modo integrato, al fine di assicurarne un uso sostenibile, equilibrato ed equo.

Secondo alcuni osservatori, la direttiva ha dato vita ad un vero e proprio “diritto europeo dell’acqua”, che impone regole generali agli ordinamenti interni, alle autorità pubbliche, ai distributori ed agli utilizzatori.

Con la nuova prospettiva integrata, infatti, l’acqua diviene un bene pubblico suscettibile di incidere trasversalmente su tutte le attività antropiche (a partire dal governo del territorio, fino alle attività produttive, all’agricoltura, al turismo, etc.), e diventa quindi una vera e propria variabile indipendente da prendere in considerazione in tutti i settori, tanto da poterla definire un’invariante del sistema economico e sociale.

Per la prima volta in una normativa comunitaria le esigenze ambientali si integrano costruttivamente con le esigenze economiche e sociali. Più in particolare, la direttiva si fonda sui principi di precauzione, prevenzione e di “chi inquina paga” (polluter-pays principle); obbliga alla protezione delle acque assoluta non deve servire da pretesto per differire l’adozione di misure adeguate ed efficaci, anche in rapporto ai costi, dirette a prevenire il degrado ambientale; il principio “chi inquina paga”, che sancisce l’internalizzazione dei costi per la tutela ambientale e l’uso di strumenti economici, considerando che è l’inquinatore a dover sostenere il costo dell’inquinamento.

Il nuovo orientamento finisce col valorizzare tutte le varie funzioni del bene acqua, riconoscendo, così, la coesistenza di diverse esigenze: si tutela l’aspetto sociale, legato alla protezione delle persone dai rischi per la sicurezza e per la salute; l’aspetto economico, poiché si prevede l’accesso efficiente della popolazione e delle attività produttive alle risorse; l’aspetto ambientale, o di sostenibilità intergenerazionale, che prevede la conservazione delle risorse e la difesa delle loro funzioni ecologiche.

In questo senso non è più sufficiente, come accadeva in passato, soffermarsi sulla composizione chimico-fisica del corpo idrico, o sul rispetto di determinati limiti di concentrazione di sostanze, ma è necessario tener conto anche della funzionalità ecologica dei corpi idrici che deve essere mantenuta e migliorata.

L'obiettivo globale, da raggiungere entro il 2015, è quello di ottenere un "buono stato" di tutte le acque dell'Unione europea, attraverso piani di gestione attuati a livello di singoli bacini idrografici.

A complemento della tutela delle acque in generale nasce l'esigenza di puntare l'attenzione sul mare, predisponendo, così, la nuova strategia marina.

Nel corso di questi ultimi decenni è emersa la consapevolezza che "le pressioni sulle risorse marine naturali e la domanda di servizi ecosistemici marini sono spesso troppo elevate" e che quindi si manifesta "l'esigenza di ridurre il loro impatto sulle acque marine, indipendentemente da dove si manifestino i loro effetti". D'altra parte, "l'ambiente marino costituisce un patrimonio prezioso che deve essere protetto, salvaguardato e, ove possibile, ripristinato al fine ultimo di mantenere la biodiversità e preservare la diversità e la vitalità di mari ed oceani che siano puliti, sani e produttivi".

Per far fronte a tali esigenze il 17 giugno 2008 il Parlamento Europeo ed il Consiglio dell'Unione Europea hanno emanato la Direttiva quadro 2008/56/CE sulla strategia per l'ambiente marino, successivamente recepita in Italia con il d.lgs. n. 190 del 13 ottobre 2010.

La Direttiva si basa su un approccio integrato e si propone di diventare il pilastro ambientale della futura politica marittima dell'Unione Europea.

La Direttiva pone come obiettivo agli Stati membri di raggiungere entro il 2020 il buono stato ambientale (GES, “Good Environmental Status”) per le proprie acque marine. Ogni Stato deve quindi, mettere in atto, per ogni regione o sottoregione marina, una strategia che consta di una “fase di preparazione” e di un “programma di misure”.

La Direttiva ha suddiviso le acque marine europee in 4 regioni: Mar Baltico, Oceano Atlantico nordorientale, Mar Mediterraneo e Mar Nero, e per alcune di queste ha provveduto ad un’ulteriore suddivisione individuando delle sotto-regioni. Nel Mediterraneo sono state individuate tre sub-regioni:

- a) il Mediterraneo occidentale;
- b) il mar Adriatico;
- c) il mar Ionio e Mediterraneo centrale.

Le acque italiane appartengono a tutte e tre le sottoregioni. Data la natura transfrontaliera dell’ambiente marino, gli Stati membri sono chiamati a cooperare per garantire che le relative strategie siano elaborate in modo coordinato per ogni regione o sottoregione marina. Inoltre per assicurare acque marine pulite sane e produttive è indispensabile che tali strategie siano coordinate, coerenti e ben integrate con quelle previste da atti normativi comunitari già esistenti (quali ad esempio trasporti, pesca, turismo, infrastrutture, ricerca) e accordi internazionali.

La Direttiva quadro stabilisce che gli Stati membri elaborino una strategia marina che si basi su una valutazione iniziale, sulla definizione del buono stato ambientale, sull’individuazione dei traguardi ambientali e sull’istituzione di programmi di monitoraggio.

Per buono stato ambientale delle acque marine si intende la capacità di preservare la diversità ecologica, la vitalità dei mari e degli oceani affinché siano puliti, sani e produttivi mantenendo

l'utilizzo dell'ambiente marino ad un livello sostenibile e salvaguardando il potenziale per gli usi e le attività delle generazioni presenti e future.

1.1.2 LA TUTELA AMBIENTALE IN ITALIA

L'Italia si caratterizza per un vasto quadro normativo in tema di tutela e protezione dell'ambiente naturale per quanto riguarda: la depurazione delle acque, il riutilizzo di acque reflue depurate, la potabilizzazione delle acque, il monitoraggio delle acque di balneazione, la bonifica di siti contaminati.

La legislazione nazionale sulle acque nasce con le "Istruzioni ministeriali" del 20 giugno del 1896: "Compilazione dei regolamenti locali sull'igiene del suolo e dell'abitato". La prima fonte normativa sulla tutela delle acque tratta di regole basilari ancora oggi riconoscibili nei regolamenti edilizi comunali. Le norme emanate in materia "acque" riguardano :

- il naturale deflusso delle acque per evitare il formarsi di ristagni o paludi
- la pulizia igienica delle acque superficiali
- l'approvvigionamento e la distribuzione dell'acqua per uso potabile e domestico
- smaltimento delle acque immonde

Si tratta di un complesso di norme, chiare e ben strutturate e soltanto una piccola parte può considerarsi superata, mentre l'ossatura è quanto mai attuale e chiara.

L'evoluzione normativa italiana è caratterizzata dalla presenza di importanti leggi di settore che hanno influito molto sulla disciplina della materia.

La prima Legge, del 10 maggio 1976, n.319, anche conosciuta come Legge Merli, sulle Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento, è stata definita dallo stesso autore una legge di

"polizia" delle acque, cioè atta a fronteggiare il dilagare delle occasioni di inquinamento delle stesse, attraverso un insieme di limiti e di controlli applicabili a tutti gli scarichi di acque reflue nei corpi idrici.

Questa legge segna in questo senso una svolta fondamentale per la sua esplicita aspirazione a considerare in maniera pianificata le risorse idriche in quanto scarse e già pregiudicate dall'inquinamento. La legge indica anche la necessità di perseguire un governo delle acque coordinato tra i diversi piani istituzionali, concentrandosi soprattutto sul problema degli scarichi e aprendo la strada ad una vera e propria messe di interventi normativi in materia di inquinamento.

In seguito è intervenuta la legge 183 del 1989, che dispone l'individuazione nel territorio nazionale di bacini idrografici; la costituzione di apposite Autorità di bacino e l'adozione di piani di bacino, qualificati come strumento conoscitivo, normativo e tecnico operativo mediante il quale sono pianificate e programmate le azioni e le norme d'uso finalizzate alla conservazione, alla difesa e alla valorizzazione del suolo e la corretta utilizzazione delle acque, sulla base delle caratteristiche fisiche ed ambientali del territorio interessato. Successivamente, la legge 36 del 1994, la legge Galli, scaturisce dalla necessità di introdurre una disciplina organica della gestione delle acque improntata al principio dell'equilibrio del bilancio idrico con l'obiettivo di stabilire un rapporto sostenibile fra disponibilità delle risorse e fabbisogni delle stesse. Viene enfatizzata l'importanza del risparmio della risorsa e la priorità dell'uso per il consumo umano rispetto agli altri usi. Altri elementi innovativi sono riscontrabili nell'obiettivo di riformulare il sistema tariffario al fine di finanziare gli investimenti necessari a migliorare le infrastrutture ad a fornire più elevati livelli di servizio e nell'intenzione di attuare una netta

separazione dei compiti di indirizzo e controllo rispetto a quelli di gestione. Un altro intervento di indubbia rilevanza è costituito dal decreto legislativo n.152 del 1999, nato con lo scopo di compiere un vero e proprio riordino in materia di tutela delle acque dall'inquinamento. Il decreto ha preso spunto dalla legge 36/1994, e ne rafforza gli strumenti e le azioni. Ha ridotto la durata temporale delle concessioni e le ha ricondotte alla pianificazione del bilancio idrico e alla tutela quantitativa delle acque. Più di recente, il decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152 recante "norme in materia ambientale", si propone di recepire la direttiva 2000/60/CE e ne descrive gli obiettivi e gli strumenti da utilizzare, in primis la suddivisione del territorio nazionale in distretti idrografici, per ognuno dei quali dev'essere istituita un'Autorità di bacino distrettuale.

Con il decreto legislativo del 13 ottobre 2010, n. 190, l'Italia recepisce la direttiva 2008/56/CE che istituisce un quadro per l'azione comunitaria nel campo della politica per l'ambiente marino.

Il decreto, in attuazione della direttiva 2008/56/CE, istituisce un quadro diretto all'elaborazione di strategie per l'ambiente marino e all'adozione delle misure necessarie a conseguire e a mantenere un buono stato ambientale entro il 2020, e, dispone che nell'ambiente marino debba essere garantito un uso sostenibile delle risorse, in considerazione dell'interesse generale. A tal fine le strategie per l'ambiente marino:

a) applicano un approccio ecosistemico alla gestione delle attività umane per assicurare che la pressione complessiva di tali attività sia mantenuta entro livelli compatibili con il conseguimento di un buon stato ambientale;

b) salvaguardano la capacità degli ecosistemi marini di reagire ai cambiamenti indotti dall'uomo;

c) considerano gli effetti transfrontalieri sulla qualita' dell'ambiente marino degli Stati terzi situati nella stessa regione o sottoregione marina;

d) rafforzano la conservazione della biodiversita' dell'ambiente marino, attraverso l'ampliamento e l'integrazione della rete delle aree marine protette previste dalla vigente normativa e di tutte le altre misure di protezione;

e) perseguono la progressiva eliminazione dell'inquinamento dell'ambiente marino;

f) assicurano che le azioni di monitoraggio e la ricerca scientifica sul mare siano orientate all'acquisizione delle conoscenze necessarie per la razionale utilizzazione delle sue risorse e potenzialita'.

Inoltre il decreto contribuisce alla coerenza tra le diverse politiche settoriali, gli accordi, le misure legislative, gli strumenti di conoscenza e monitoraggio, gli strumenti di pianificazione e programmazione che hanno un impatto sull'ambiente marino e mira a garantire l'integrazione delle implicazioni ambientali nelle stesse politiche settoriali.

1.2 CONTAMINAZIONE DEL BIOTA

La "contaminazione ambientale" è frutto dell'immissione di sostanze xenobiotiche, il cui rilascio è dovuto principalmente ad attività antropiche, e, può essere definita come la conseguenza di un'azione umana capace di modificare le proprietà o la qualità delle risorse in un determinato intervallo di spazio e di tempo.

Il bersaglio ultimo per la maggior parte degli xenobiotici risulta spesso essere l'ambiente acquatico ed in particolare la fascia marina costiera, sia perché essi vengono direttamente scaricati in mare o indirettamente nei corsi d'acqua, sia perché vi giungono in seguito a processi idrologici o atmosferici.

Nello studio della contaminazione del biota è importante valutare la possibilità di immissione degli inquinanti in un dato ambiente e considerare le interconnessioni tra i vari comparti ambientali.

Oltre alla più nota definizione dell'O.N.U. sull'inquinamento marino, una definizione più rilevante di "inquinamento idrico" ci è fornita dal D.lgs. 15 Maggio 1999 n. 152 che lo definisce come *"Lo scarico effettuato, direttamente o indirettamente, dall'uomo nell'ambiente idrico di sostanze o di energia le cui conseguenze siano tali da mettere in pericolo la salute umana, nuocere alle risorse viventi e al sistema ecologico idrico, compromettere le attrattive o ostacolare altri usi legittimi delle acque"*. Tale concetto appare estremamente rilevante perché fornisce una definizione giuridica ufficiale di quel fenomeno complesso che è rappresentato dall'inquinamento in senso stretto.

Per molto tempo si è ritenuto che il mare, data la sua vastità, fosse in grado di sopportare qualsiasi carico inquinante senza conseguenze. Solo i continui progressi delle scienze

ambientali, della tossicologia e dell'epidemiologia hanno risvegliato la nostra attenzione sui danni che minacciano non solo il mezzo marino ma anche per via indiretta l'uomo. La preoccupazione che questo possa accadere in modo irreparabile ha portato alla condivisione di un obiettivo comune mirato alla salvaguardia della biosfera in un nuovo modello sociale di "sviluppo sostenibile", per un miglioramento della qualità della vita, senza eccedere la capacità di carico degli ecosistemi di supporto, dai quali essa dipende.

Negli ultimi anni lo sviluppo di nuove tecnologie ha permesso di migliorare i piani di monitoraggio ambientale attraverso l'utilizzo di specie bioindicatrici superando i limiti dello studio di biomonitoraggio classico, mirato alla semplice valutazione delle concentrazioni di contaminanti nel comparto abiotico e che escludeva l'individuazione dei meccanismi attraverso i quali i contaminanti perturbano le comunità biologiche. L'utilizzo dei biomarkers supera tale limite ponendosi all'interno di un approccio indirizzato allo studio dello "stato di salute" di un ecosistema e delle sue componenti, valutando gli "early adverse effects" provocati dai contaminanti direttamente sugli organismi nel loro ambiente naturale. La sola presenza di contaminanti chimici in un segmento di ecosistema acquatico non indica di per se stessa gli effetti dannosi, in quanto per stabilire i reali danni risulta necessario fissare delle connessioni tra i livelli di background, ovvero i livelli presenti nel comparto abiotico, i livelli interni di contaminazione tissutale degli organismi, e gli "early adverse effects". Negli ultimi decenni, tra i bioindicatori di nuova generazione, i poriferi hanno assunto un crescente interesse come indicatori per la valutazione della qualità ambientale in differenti sistemi acquatici.

1.2.1 BIOACCUMULO

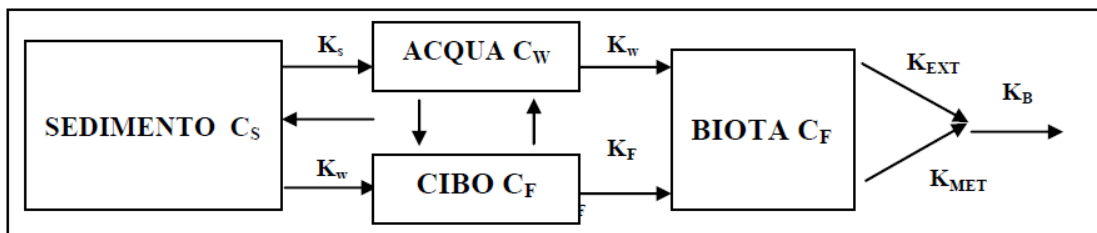
Una corretta gestione e tutela dell'ambiente deve necessariamente prevedere la valutazione della presenza di eventuali composti inquinanti e la conoscenza completa della condizione ecologica dell'ecosistema.

Il bioaccumulo di sostanze chimiche nel biota può essere un prerequisito per valutare gli effetti negativi di queste sugli ecosistemi.

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.

Un modello che illustra i processi che governano il bioaccumulo negli organismi acquatici è rappresentato in figura 1 (Van der Oost *et al.*, 1996a).

Fig. 1 Modello dei processi di bioaccumulo



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 , EXT 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 la concentrazione nell'acqua durante lo stato stazionario o di equilibrio. 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. Il tasso di assorbimento dipende dalle concentrazioni delle sostanze nell'acqua e sarà generalmente più elevato per i composti idrofobici.

Il destino delle sostanze chimiche è in gran parte determinato dall'assorbimento di queste nel particolato in sospensione e nei sedimenti. L'assorbimento dipende quindi dalle caratteristiche dei sedimenti e delle sostanze chimiche coinvolte. Se i composti chimici 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 (KOC) può essere espresso come:

$$KOC = K_w/K_s = C_s/C_w$$

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:

$$BSAF = C_b/C_s = BCF/KOC$$

Sia BCF che KOC dipendono dall'idrofobicità dei composti chimici.

1.2.2 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. Per valutare il bioaccumulo, la misura della biodisponibilità della sostanza considerata è un fondamentale parametro per ottenere risultati validi.

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 del fattore di bioaccumulo (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.

Alcuni studi dimostrano come le dimensioni delle particelle possano influenzare la biodisponibilità; secondo Belfroid *et al.*, (1996), gli organismi ingeriscono, preferenzialmente, le particelle più piccole del sedimento (arricchite in OM), traducendosi in un aumento dell'assorbimento del contaminante presente. La OM è la principale determinante dell'assorbimento dei 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).

1.2.3 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). 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.

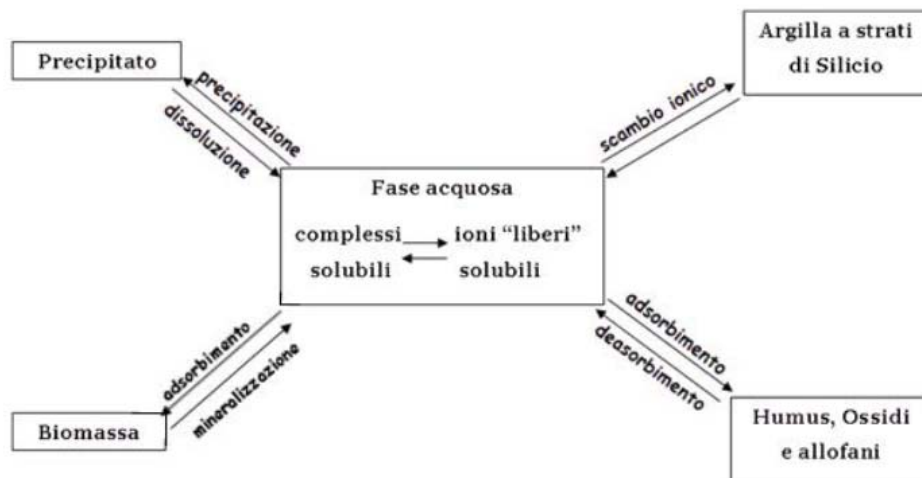
1.3 METALLI PESANTI

Generalmente il termine metalli pesanti è adoperato per indicare quegli elementi che hanno densità maggiore di 5 g/cm^3 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 $\mu\text{g/Kg}$ (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 2).

Fig. 2 - Equilibri chimici degli ioni metallici nei sedimenti



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.

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 chimicofisiche 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; Persoone *et al.*, 1989; Allen e Hansen, 1996; Batley *et al.*, 1999; Lorenzo *et al.*, 2002).

1.3.1 BIOACCUMULO ED ASPETTI ECOTOSSICOLOGICI NEGLI ORGANISMI MARINI

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 serie 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. 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: ossidrili (-OH), carbossili (COO-), fosforili (OPO₃H-), carbonili (=CO), sulfidrili (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. 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).

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.*, 2004).

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). E' 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.*, 1995; 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* i metalli si legano prevalentemente alle proteine citoplasmatiche, mentre, nella vongola *Modiolus kurilensis* si legano alle proteine di membrana (Podgurskaya *et al.*, 2004).

Negli invertebrati acquatici Cu, Zn, Hg, Cd determinano 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; Mason, 2000; Taylor *et al.*, 2000; Straus, 2003; Pourang *et al.*, 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).

1.3.1a 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.

1.3.1b 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).

1.3.1c 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 Pb^{2+} 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 $\mu\text{g/l}$ mentre nei fiumi e laghi a concentrazione di 1 -2 $\mu\text{g/l}$.

1.3.2 BIOMARKERS

Alle indagini di biomonitoraggio è stato recentemente affiancato un altro approccio metodologico basato sulla analisi delle risposte che un organismo, una popolazione o una comunità naturale può dare se sottoposto a stress chimico ambientale.

La National Academy of Science statunitense definisce biomarker “l'alterazione, indotta da un contaminante, a livello delle componenti biochimiche o cellulari, che può essere evidenziata e quantificata in un sistema biologico”.

Oggi il concetto si è evoluto e si definisce biomarkers o indice di stress “la variazione di una risposta biologica (biochimica, molecolare, cellulare, fisiologica o comportamentale) che può essere correlata all’esposizione e/o all’effetto tossico di composti inquinanti” (Peakal *et al.*, 1994). Le risposte che l’organismo realizza quando si trova a contatto con una sostanza chimica rappresentano “potenziali biomarkers” (Shugart *et al.*, 1992) utilizzabili per il monitoraggio ambientale (Bayne *et al.*, 1979).

Mediante lo studio delle risposte immediate il biomarker permette di prevedere con notevole anticipo l’insorgenza di effetti nocivi come cancerogenesi, alterazioni patologiche, diminuzione delle capacità riproduttive, e mortalità.

Quando un composto tossico entra in un ecosistema (marino, terrestre o d’acqua dolce) determina una serie d’alterazioni o danni di differente entità che vanno dal danno molecolare e citologico, fino a giungere ad alterazioni strutturali degli organismi e quindi delle popolazioni o della comunità (Olsson *et al.*, 2005).

La tossicità primaria di un contaminante, molto pericolosa perché non evidenziabile ad un’analisi generica, agisce, in linea generale, a livello molecolare, determinando modificazioni delle attività enzimatiche, alterazioni del DNA, RNA, proteine etc.; successivamente gli effetti si possono rilevare, con un meccanismo a cascata, a livello citologico, tissutale, di organo ed organismo fino ad interessare l’intera popolazione.

Gli organismi che subiscono uno stress tossico per un inquinante rispondono in un primo momento attivando meccanismi adattativi tendenti a neutralizzare l’azione nociva e riequilibrare l’omeostasi nell’organismo.

Le risposte omeostatiche a livello primario più note sono l'attivazione di sistemi multienzimatici come le monoossigenasi, gli enzimi coniugati, o le metallotioneine che attualmente sono considerate un'ottima classe di biomarkers per l'analisi della contaminazione da metalli pesanti poiché è stato dimostrato che all'aumento della concentrazione dell'inquinante, nel caso specifico dei metalli pesanti, corrisponde l'aumento del livello di queste molecole nei tessuti.

Dal confronto tra le concentrazioni dei biomarkers presenti nei soggetti bioindicatori, campionati in aree da testare e quelli degli organismi provenienti da aree incontaminate possono derivare informazioni sui rischi a cui sono soggetti gli ecosistemi (Decaprio, 1997).

I biomarcatori possono essere divisi in tre classi:

1) *biomarkers d'esposizione*

2) *biomarkers d'effetto*

3) *biomarkers di suscettibilità*

I biomarkers d'esposizione sono quelle alterazioni che inducono una risposta di un organismo che indica l'esposizione ad un composto chimico o ad una classe di composti, ma che non fornisce nessuna indicazione dei reali effetti tossicologici sull'organismo. Questo tipo di biomarcatori, come le Metallotioneine (MT), rilevano la presenza di xenobiotici o dei loro metaboliti quindi possono essere utilizzati per confermare o stimare l'esposizione di individui o popolazioni ad una particolare sostanza, fornendo un legame tra esposizione esterna e dose interna.

I biomarkers d'effetto sono le modificazioni biochimiche o fisiologiche, misurabili in un tessuto o in un fluido corporeo, associate ad un possibile o effettivo stato di malattia. Questi biomarkers, quali le proteine da stress termico HSP, valutano la risposta dell'organismo e

possono essere usati per documentare effetti avversi dovuti all'esposizione e all'assorbimento di una sostanza chimica.

Generalmente i biomarkers d'effetto più sensibili sono rappresentati da alterazioni nei livelli e nell'attività degli enzimi di biotrasformazione che, ad esempio, nei pesci possono essere indotti o inibiti dall'esposizione a xenobiotici (Bucheli *et al.*, 1995). Infatti, parallelamente all'effetto negativo della sostanza tossica, nell'organismo esposto si sviluppano delle risposte adattative che tendono a riportare il sistema ad uno stato di omeostasi. In particolare, le risposte a livello molecolare tendono a diminuire l'effetto tossico del composto inquinante, grazie all'induzione di sistemi multienzimatici o di proteine di legame, come le metallotioneine.

I biomarkers di suscettibilità si riferiscono all'innata o all'acquisita capacità di un organismo a rispondere ad una specifica sostanza xenobiotica.

In base alla loro specificità di risposta nei confronti di composti inquinanti, i biomarkers possono essere specifici oppure generali.

I *biomarkers specifici* rappresentano l'insieme delle risposte molecolari e biochimiche che si realizzano in seguito all'esposizione ad una specifica classe di contaminanti (es. l'induzione delle metallotioneine da parte dei metalli e l'inibizione della colinesterasi dovuta all'azione specifica di alcuni pesticidi) permettendo di risalire al responsabile della contaminazione e in pochi casi ad uno specifico contaminante.

I *biomarkers generali* rappresentano le risposte dell'organismo a livello molecolare, cellulare e fisiologico che non possono essere ricondotte ad un inquinante in particolare, ma rappresentano uno stato generale di stress dell'organismo (es. danni al DNA).

1.3.2a Biomarkers di esposizione: Metallotioneina (MT)

Le metallotioneine (MT) sono proteine non enzimatiche, citosoliche o nucleari a basso peso molecolare, caratterizzate da un elevato contenuto di cisteina (20-30%) e dall'assenza di amminoacidi aromatici e istidina. Le MT sono “substrato inducibili” in presenza di ioni metallici, legandoli grazie all'elevatissima affinità che hanno per alcuni di essi, e di conseguenza costituiscono uno dei biomarkers di elezione per questa classe di contaminanti (Viarengo, 1985). Le MT sono prevalentemente proteine citoplasmatiche (Cherian, 1994), ma possono trovarsi anche in altri compartimenti cellulari: esse sono state rinvenute nella frazione lisosomiale e nei nuclei di cellule in attiva proliferazione (Cherian, 1994; Ogra e Suzuki, 2000). Le MT rappresentano un gruppo molto antico di proteine e possiedono infatti, una struttura conservata quasi immutata nel corso dell'evoluzione; pertanto tali proteine sono state ritenute, sin dalla loro scoperta, coinvolte in fondamentali processi fisiologici della cellula.

Il ruolo fisiologico più significativo che è stato, sin dall'inizio, loro attribuito, è quello dell'omeostasi dello zinco e del rame associato allo svolgimento di un'azione detossificante nei confronti dei metalli pesanti.

Le metallotioneine (MT) sono state per la prima volta identificate nel 1957 da ricercatori interessati allo studio dei costituenti cellulari responsabili dell'accumulo di cadmio nelle cellule renali equine (Margoshes e Vallee, 1957).

Il termine “metallotioneina” fu inizialmente coniato per designare la proteina, isolata dalla corteccia renale equina (Kägi e Vallee, 1960), ricca di zolfo, e legante cadmio e zinco. Dopo il 1° Congresso Internazionale sulle MT, tenutosi nel 1978, il termine MT è stato utilizzato per

individuare tutte le proteine di basso peso molecolare con requisiti simili alla metallotioneina equina.

Tali requisiti sono:

- basso peso molecolare (6-8 kDa);
- elevato contenuto di metalli pesanti;
- caratteristica composizione amminoacidica (elevato contenuto di cisteina e assenza o basso contenuto di amminoacidi aromatici);
- struttura primaria con una caratteristica distribuzione delle cisteine (es. Cys-X-Cys);
- caratteristiche spettroscopiche tipiche dei clusters metallotioici.

Successivamente, nel 1985, le MT sono state convenzionalmente suddivise in 3 classi sulla base della MT di mammifero: la classe I comprende tutte le MT con struttura primaria correlabile a quella delle MT dei mammiferi; la classe II, le MT la cui sequenza non presenta omologia con le MT dei mammiferi; la classe III, fitochelatine e metallo peptidi atipici, rinvenuti sempre nelle piante, costituiti da unità gamma-glutamyl-cisteiniche aventi alcune proprietà in comune con le MT e, pertanto, non rappresentano diretti prodotti genici (Fowler *et al.*, 1987; Kägi, 1993). Con il progredire delle conoscenze sulle MT, tale classificazione è risultata però ancora inadeguata e nel corso del 4° Meeting Internazionale sulle MT (Kansas City, USA, 1997), è stato proposto un nuovo sistema di classificazione basato sia sulla similarità di sequenza sia sulle relazioni filogenetiche. Questo sistema considera le MT come una superfamiglia (MTs) suddivisa in famiglie (es. MT dei vertebrati) e sottofamiglie (es. MT dei teleostei).

La presenza delle MTs è stata riscontrata in tutto il regno animale, dagli invertebrati (echinodermi, anellidi, molluschi, artropodi) ai vertebrati (pesci, anfibi, rettili, uccelli, mammiferi). Nei mammiferi sono state identificate più di dieci isoforme, nei pesci una o due.

La principale funzione biologica di tali proteine risiede nella regolazione della concentrazione intracellulare dei metalli essenziali Zn e Cu e nella detossificazione da questi o da altri metalli non essenziali. Le MTs sequestrano i metalli o li cedono, rendendoli disponibili per le reazioni biochimiche, a seconda delle necessità. L'effetto di detossificazione delle MTs negli organismi marini è stato descritto da molti autori che hanno individuato una correlazione tra la comparsa di MTs e l'aumentata tolleranza ai metalli potenzialmente tossici. E' da notare che esiste una soglia di concentrazione dei metalli nei tessuti a cui la MT è sintetizzata. Altra possibile funzione attribuita alle MTs è quella che le vede prendere parte ai processi di allontanamento dei radicali liberi. Nei pesci sembra che tali proteine possano essere diversamente espresse in relazione al contenuto tissutale di metalli. Alcuni pesci hanno livelli tissutali di metalli eccezionalmente alti, specialmente a livello epatico. In alcuni pesci tropicali livelli fisiologicamente alti di Zn sembrano essere associati con i processi riproduttivi mentre altre specie presentano un accumulo di Cu con andamento dipendente dall'età.

La capacità di induzione delle MTs è maggiore nei tessuti più attivamente responsabili dell'assunzione, immagazzinamento ed escrezione dei metalli e cioè, intestino, fegato e branchie. In alcuni pesci i livelli di MTs aumentano con andamento dipendente dalla dose e dal tempo di esposizione a metalli pesanti. La capacità di induzione dei diversi metalli varia con la specie ed il particolare tessuto. Alcuni metalli, come ad es. il Pb, non inducono sintesi di MTs. Generalmente le MTs hanno elevata affinità per il mercurio che, infatti, è in grado di allontanare

il rame o lo zinco dalla molecola. Ciò può portare ad una riduzione delle normali concentrazioni tissutali di questi metalli essenziali in condizioni di prolungata esposizione ai sali di mercurio. A differenza del mercurio inorganico, il metilmercurio non si lega alle MTs ma ad altre proteine cellulari (es. emoglobina) in grado di sequestrare tale sostanza. E' da sottolineare, tuttavia, che altre condizioni, oltre che l'esposizione ai metalli, possono indurre la produzione di MTs. E' stato infatti dimostrato che sia gli ormoni glucocorticoidi (progesterone e glucagone) che gli ormoni peptidici siano capaci di indurre la sintesi delle MTs. Pertanto, la produzione di MTs può essere indotta anche da fenomeni naturali quali: accrescimento, riproduzione o rigenerazione dei tessuti. E' stato dimostrato inoltre che, fattori come la temperatura e/o lo stato nutrizionale possano influenzare il legame MTs-metalli. E' stato inoltre proposto, che la sintesi di MTs possa essere ridotta in presenza di alti livelli di contaminanti organici a causa di un'aumentata richiesta di residui cisteinici per la sintesi di glutathione. Sebbene vi sia un equilibrio dinamico nel legame dei metalli con le MTs, una volta che l'accumulo dei primi eccede la produzione delle altre, il sistema di detossificazione si satura e i metalli in eccesso possono legarsi ad enzimi ad essi sensibili ed esercitare effetti tossici. Tale effetto è stato definito come "spill-over" (Campenhout *et al.*, 2004).

1.4 BIOMONITORAGGIO DELLE ACQUE MARINE

La Direttiva Quadro sulla Strategia per l'Ambiente Marino (2008/CE/56, MSFD) prevede che ogni Stato Membro sviluppi una strategia per il conseguimento o il mantenimento del Buono Stato Ambientale (“Good Environmental Status”, GES) dell’ambiente marino entro il 2020.

Per “buono stato ambientale” s’intende che:

- lo stato ambientale delle acque marine consenta di preservare la diversità ecologica e la vitalità di mari e oceani che siano puliti, sani e produttivi, e l’utilizzo dell’ambiente marino resti ad un livello sostenibile;
- la struttura, le funzioni e i processi degli ecosistemi che compongono l’ambiente marino funzionino completamente e siano in grado di mantenere la loro resilienza;
- le specie e gli habitat marini siano protetti e preservati, sia evitata la perdita di biodiversità dovuta all’attività umana e le diverse componenti biologiche funzionino in modo equilibrato;
- le proprietà idromorfologiche e fisico-chimiche sostengano gli ecosistemi in tale senso, e gli apporti antropogenici di sostanze ed energia non determinino rischi significativi alla biodiversità, gli ecosistemi e l’ambiente marino, nonché per la salute umana o gli usi legittimi del mare.

Tra gli elementi della strategia si evidenziano i programmi di monitoraggio che si basano sulla necessità di fornire informazioni che consentano di valutare lo stato ambientale e sulla necessità di garantire la produzione di informazioni che consentano di individuare gli indicatori più adeguati per i traguardi ambientali.

Gli obiettivi comunitari e nazionali, la crescente sensibilizzazione sui temi ambientali e la presa di coscienza del valore della conservazione degli habitat hanno fatto sì che venissero attuati vari

programmi di biomonitoraggio che si basano sull'utilizzazione dei "*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).

Con il termine di *Biomonitoraggio* si intende il monitoraggio dell'inquinamento mediante organismi viventi. Le principali tecniche di biomonitoraggio consistono nell'uso di organismi *Bioaccumulatori* (organismi in grado di sopravvivere in presenza di inquinanti che accumulano nei loro tessuti; con il loro uso è possibile ottenere dati sia di tipo qualitativo che quantitativo) e di organismi *Bioindicatori* (organismi che subiscono variazioni evidenti nella fisiologia, nella morfologia o nella distribuzione spaziale sotto l'influsso delle sostanze presenti nell'ambiente).

Spesso non si conosce nulla riguardo la presenza delle migliaia di molecole sintetiche veicolate in atmosfera, trasportate dall'acqua, deposte al suolo, delle quali sono ignote non solo la pericolosità e il grado di biodisponibilità (se una sostanza inquinante non è biodisponibile non risulta dannosa per l'organismo) ma, nella maggioranza dei casi, sono sconosciuti anche il nome, la formula chimica, l'origine. Tanto meno si conosce il comportamento di queste molecole nell'ambiente, nelle varie condizioni meteorologiche, le loro modalità di assunzione e i loro effetti sugli esseri viventi, le sinergie e le reazioni che esse provocano all'interno di questi. Le maggiori difficoltà nelle misurazioni dirette delle alterazioni ambientali si verificano in presenza di basse concentrazioni di inquinanti propagati da sorgenti puntiformi o diffuse, spesso discontinue, le cui sostanze immesse nell'ambiente subiscono trasformazioni ignote. Queste

difficoltà possono essere superate con l'uso degli organismi viventi bioindicatori che, seppure non in grado di definire le sostanze tossiche presenti nell'ambiente, sono senz'altro capaci di rilevare gli effetti tossici che queste sostanze hanno su di essi. Il biomonitoraggio, rispetto alle tecniche analitiche tradizionali, ha il vantaggio di fornire stime sugli effetti combinati di più inquinanti sugli esseri viventi, ha costi di gestione limitati e dà la possibilità di coprire con relativa facilità vaste zone e territori diversificati, consentendo una adeguata mappatura del territorio.

Nelle tecniche di biomonitoraggio della qualità dell'acqua vi sono:

- test di tossicità per misurazioni sulle risposte biomolecolari e fisiologiche di organismi nei confronti di tossici in situazioni sperimentali, compresi biosaggi e sistemi di controllo (tossicità acuta, tossicità cronica, genotossicità, bioaccumulazione e biomagnificazione);
- monitoraggio degli ecosistemi per misure sull'integrità di ecosistemi sottoposti a perturbazioni ambientali.

Tutti i metodi di monitoraggio per la valutazione della struttura di un ecosistema si traducono in campionamenti di specifici gruppi di biota. Avremo indici per specie indicatrici, indici di ricchezza, indici di abbondanza, indici di diversità, indici biotici.

Nell'ambito delle nuove biotecnologie, questo lavoro prevede lo studio di una specie di poriferi che, secondo recenti studi, si prestano come ottimi bioindicatori, per la loro fisiologia e per la loro distribuzione su vasti areali.

1.4.1 ORGANISMI BIOINDICATORI: I PORIFERI

Studi recenti hanno dimostrato come diverse specie di spugne siano ottimi indicatori della presenza in mare di metalli pesanti. La contaminazione da metalli pesanti è incrementata drasticamente nelle coste del Mediterraneo durante gli ultimi 20 anni.

I metalli pesanti sono i principali inquinanti delle nostre coste. Gli organismi che, come le spugne, sono filtratori, sessili, longevi e largamente distribuiti sono ottimi target per lo studio sui metalli.

Uno studio tossicologico, ad esempio ha evidenziato la variabilità della concentrazione di metallotioneina in *Spongia officinalis* come biomarker della contaminazione da metalli pesanti (Berthet *et al.*, 2005). La sintesi di questa proteina, localizzata nell'apparato del Golgi e caratterizzata da un ricco contenuto in cisteina e da un'alta affinità per i metalli pesanti, è spesso indotta quando gli organismi sono esposti ai metalli pesanti. L'accumulo di grandi quantità di metalli lascia ipotizzare l'esistenza di un sistema detossificante nell'organismo. *S. officinalis* presenta molte delle caratteristiche cercate nei bioindicatori di inquinamento.

Le spugne presentano molte caratteristiche che li rendono ottimi bioindicatori e proprio per questo è stato proposto il "Sponge Watch Program" (Patel *et al.*, 1985; Hansen *et al.*, 1995).

Un altro studio sottolinea gli effetti dell'inquinamento nella crescita, riproduzione, morfologia e la sopravvivenza di *Crambe crambe*, che trapiantata in un sito inquinato ha risposto con il rallentamento della crescita e l'aumento dell'irregolarità della forma. Lo studio ha dimostrato come *C. crambe* accumuli maggiormente i metalli in un sito più inquinato rispetto ad un sito meno inquinato (Cebrian *et al.*, 2003).

Uno studio comparato sull'accumulo dei metalli su quattro specie di spugne (*Crambe crambe*, *Chondrosia reniformis*, *Phorbastenacior* e *Dysidea avara*) ha permesso di identificare la specie più idonea per il monitoraggio dei metalli. *C. crambe* ha dimostrato di essere la sola in grado di accumulare metalli, in particolare Pb e Cu, in funzione della loro disponibilità. Ciò permette di avere precise informazioni sul livello di metalli nell'area studiata in una scala temporale (Cebrian *et al.*, 2007).

Un altro studio più antico dimostra come un'altra spugna *Halichondria panicea* riesca ad accumulare in modo direttamente proporzionale alla concentrazione di metalli nelle acque senza apparente perdita in seguito al trasferimento dell'organismo in acque pulite (Patel *et al.*, 1985).

1.5 BIOREMEDIATION DELLE ACQUE MARINE

L'utilizzo delle spugne come bioindicatori si può affiancare all'uso delle stesse specie per azioni di risanamento ambientale e depurazione delle acque.

Esistono varie tecnologie per il risanamento di ambienti inquinati, efficaci, ma con costi di realizzazione molto alti e spesso anche caratterizzate da interventi poco compatibili con l'ambiente. A questi si contrappongono alcuni metodi di risanamento innovativi che sfruttano processi chimici e biologici e che suscitano un crescente interesse in quanto sostenibili e a bassi costi.

Queste tecnologie "biologiche" permettono di eliminare gli inquinanti a costi contenuti attraverso l'utilizzo di organismi depuratori, quali piante (*Phytoremediation*) o di organismi animali, quali mitili e policheti (*Bioremediation*).

L'abilità degli animali nel rimedio ambientale, ancora, non è totalmente conosciuta, tuttavia sono molte le sperimentazioni sul campo del bioremediation, come l'ideazione e la messa in posa di strutture in mare contenenti organismi che presentano le caratteristiche ambite.

Un esempio è dato dal MUDS, un sistema biologico di depurazione delle acque marine inquinate, una sorta di reef artificiale abitato da una comunità microbentonica (Cattaneo-Vietti, 2003).

Azioni di *bioremediation* possono essere svolte anche con altri organismi come le spugne, che presentano elevata capacità di filtrazione.

Le caratteristiche di questi animali consentono di affermare che le spugne possono portare benefici direttamente all'ambiente marino, con la ricostruzione degli ecosistemi originari, e, indirettamente, alla comunità locale del territorio interessato.

La capacità filtrante delle spugne è l'aspetto più importante ai fini del restauro ambientale e della depurazione delle acque. I processi che avvengono all'interno dell'animale sono estremamente efficienti e permettono una filtrazione completa dell'acqua. Le grandi spugne filtrano diversi litri al giorno, estraendo le sostanze in sospensione per nutrirsi. Esse, infatti, si cibano di particelle in sospensione presenti nell'acqua che fanno confluire all'interno del loro corpo, determinando un'azione di depurazione naturale sull'acqua in cui vivono.

Per questo motivo la loro presenza in uno specchio d'acqua (e nel nostro caso all'interno di un allevamento) porta benefici dal punto di vista ambientale. Basti pensare che una comunità di spugne è in grado di filtrare l'intera colonna d'acqua che la sovrasta in un giorno (circa 1000 volte il loro volume in un giorno), trattenendo il 70-80% del particolato organico sospeso e del carico batterico. Questa caratteristica permette di affermare che gli allevamenti di spugne sono in grado di abbattere in maniera notevole il tasso di inquinamento organico favorendo il mantenimento di ecosistemi in aree sensibili ad elevato rischio di degrado. In particolare la specie di spugna *Chondrilla nucula*, volgarmente chiamata Spugna cervello, può trattenere quantità elevate del batterio *Escherichia coli*, risultando perciò utile per l'impiego nel recupero dell'ecosistema marino (Milanese *et al.*, 2003).

Le spugne, pertanto, risultano essere organismi utilizzabili per azioni di *bioremediation* e di restauro ambientale.

1.5.1 ORGANISMI BIOREMEDIATOR: I PORIFERI

Parallelamente agli studi sul biomonitoraggio esistono studi sul biorimediao marino e in particolare in uno scenario di acquacoltura integrato.

L'abilità degli animali nel rimedio ambientale non è totalmente conosciuta. Alcuni animali sono considerati bioremediatori di metalli pesanti, contaminanti microbici, idrocarburi, nutrienti e inquinanti organici (Gifford *et al.*, 2007).

Uno dei lavori realizzati in questo campo ha dimostrato la possibilità di utilizzare *Chondrilla nucula* in un sistema di acquacoltura integrata. L'esperimento ha evidenziato la capacità di *C. nucula* di abbattere il carico batterico di *Escherichia coli*, rendendola una specie idonea per il risanamento ambientale (Milanese *et al.*, 2003).

Un altro studio ha dimostrato la capacità di *Hymeniacidon perlevis* nel rimuovere *Escherichia coli* e *Vibrio anguillarum* (Fu *et al.*, 2006).

Inoltre, da parecchi anni si sperimentano tecnologie di spongicoltura per la messa a punto di biofiltri per il biorimedio delle masse d'acqua della fascia costiera, progettando soluzioni ecologicamente ed economicamente sostenibili.

I dati ottenuti sulle potenzialità di allevamento di numerose specie di spugne con interesse commerciale hanno consentito la messa a punto di diversi protocolli di allevamento con la produzione di due brevetti USAMA ® e SAFEQUAPLAN ®.

Recentemente, inoltre, le attività di spongicoltura sono state svolte presso aree portuali, per definire la capacità di reazione delle spugne ed al fine di sperimentare la loro capacità di biofiltrazione in queste aree degradate.

Ledda *et al.* (2014) hanno dimostrato come impianti di maricoltura con i poriferi *Ircinia variabilis* e *Agelas oroides* possano abbattere il carico organico e batterico di ambienti portuali.

1.6 CARATTERISTICHE BIOLOGICHE DEI PORIFERI

Le **spugne** sono i metazoi (animali pluricellulari) più antichi della storia evolutiva. Sebbene rappresentino nell'evoluzione il passaggio dagli organismi uni ai pluricellulari, non sono affatto organismi primitivi, ma sono costituiti da cellule altamente specializzate ed organizzate.

Appartengono al *phylum* Porifera e i loro corpi si caratterizzano per la presenza di migliaia di pori e canali che costituiscono un sistema di nutrizione filtrante adatto alla loro vita sessile. La loro nutrizione dipende esclusivamente dalle correnti d'acqua che, attraversando i canali, portano il cibo e l'ossigeno e scaricano i rifiuti.

Dagli osti (sottili pori) entra nei canali l'acqua carica di nutrienti che vengono immediatamente intrappolati e fagocitati dai coanociti (cellule flagellate che rivestono i canali). All'interno della spugna l'acqua circola tramite gli stessi coanociti che con i loro flagelli mantengono una corrente d'acqua attraverso i canali. Durante questo passaggio non avviene soltanto la nutrizione, ma anche il rilascio dei rifiuti che vengono ceduti e trasportati dal flusso dell'acqua sino all'uscita dei canali tramite gli osculi (larghi pori).

Le spugne si riproducono sia sessualmente che asexualmente. La riproduzione asessuata permette un adattamento particolarmente elevato delle spugne nell'ambiente in cui crescono. La capacità di formare propaguli e di rigenerarsi aumenta la possibilità di sopravvivenza di questi animali anche in condizioni sfavorevoli; hanno, inoltre, un'enorme capacità di riparare danni e di ripristinare parti perdute.

Le spugne producono una serie di sostanze chimiche altamente efficaci, usate dagli organismi come veleni anti predazione o anti batterici. Oggi si sa che queste sostanze bioattive sono di grande valore terapeutico. Alcuni di questi veleni, infatti, si sono dimostrati utili anche per

l'uomo. Il valore terapeutico e la capacità filtrante-assorbente delle spugne hanno reso questi animali importanti in molti campi.

1.7 IL CASO STUDIO: *CHONDRILLA NUCULA* BIOINDICATORE E “BIOREMEDIATOR”

Chondrilla nucula è la specie eletta per entrambi gli aspetti della ricerca. Si tratta di una specie estremamente abbondante e frequente, distribuita su un vasto areale.

Chondrilla nucula, dell’Ordine Chondrosida (Boury-Esnault & Lopès, 1985) e della Famiglia Chondrillidae (Gray, 1872), appartiene alla Classe delle Demosponge ed è una specie incrostante, dotata di cortex evidente contenente fibrille di collagene. L’animale, oviparo, presenta aperture inalanti localizzate in pore-sieves o coni cribrosi. Lo scheletro è spesso assente e composto, quando presente, di fibre nodulari di spongina o microsclere (aster) e non sono mai presenti megasclere.

Fig. 3 *Chontrilla nucula* in ambiente marino



Le dimensioni medie osservate sono nell’ordine di 2-4 cm di lunghezza. La consistenza è cartilaginea, ferma e robusta. La superficie è liscia ed omogenea, talvolta leggermente viscida, ricoperta di placche cribrose. La colorazione è variabile fra verde e marrone violaceo ed è attribuita alla presenza di cianobatteri simbiotici. Gli elementi scheletrici di *C. nucula* sono

esclusivamente sferaster di diametro compreso fra 20 e 27 μ m (Bavestrello *et al.*, 1993a) dotati di 20-25 raggi con estremità spesso rugosa o leggermente spinosa e manca un'impalcatura di spongina. Il cortex è spesso e ricco di fibrille di collagene, ricoperto da una cuticola di circa 5 μ m e diviso in uno strato superiore ricco di cellule sferulose e sferaster e uno inferiore nel quale questi elementi sono più radi.

Le camere coanocitarie hanno un diametro di circa 40-50 μ m. Il coanosoma mostra cellule sferulose e sferaster sparsi nel mesoilo, mentre gli elementi scheletrici si dispongono in uno strato unispicolare intorno ai canali. Sono presenti cianobatteri più concentrati nello strato corticale superiore, mentre nel mesoilo si osservano batteri simbiotici extracellulari o raccolti in batteriociti (Boury-Esnault, 2002). La specie è dioica e descritta come ovipara: oogenesi e spermatogenesi avvengono fra luglio e ottobre e sono probabilmente regolati dalla temperatura dell'acqua. Gli oociti sono circondati da un tappeto di cellule follicolari (Scalera-Liaci *et al.*, 1971; Gaino, 1980). *C. nucula* predilige fondali bene illuminati a profondità comprese fra la superficie e 30 m circa.

La specie descritta in base alla specie tipo proveniente dal bacino adriatico, è nominalmente considerata cosmopolita, ma allo stato attuale si ritiene più opportuno considerare *C. nucula* come distribuita nel solo bacino mediterraneo e lungo le coste atlantiche immediatamente adiacenti.

Uno studio recente ha dimostrato come gli effetti dell'acidificazione dei mari possano influenzare le comunità delle spugne e come *C. nucula* sia una specie particolarmente sensibile alle variazioni del pH, determinando una distribuzione selettiva (Goodwin *et al.*, 2014).

A differenza di altre specie quali ad esempio *Petrosia ficiformis*, *C. nucula* non appare in grado di vivere in ambienti semioscuri o oscuri e quindi in condizioni di aposimbiosi, come dimostrato dai lavori di Gaino *et al.* (1977) nei quali si osservano la progressiva riduzione di volume e la scomparsa finale degli esemplari trapiantati all'interno di una grotta.

Chonrilla nucula è stata anche definita “Climber sponge” per la sua capacità di crescita e locomotoria in verticale (Pronzato, 2002).

1.7.1 CHONDRILLA NUCULA ED IL SUO RUOLO SULL'ECOSISTEMA MARINO

Il genere *Chondrilla* comprende attualmente una ventina di specie presenti in acque tropicali, subtropicali e temperate e generalmente limitate a profondità inferiori a 50 m (Boury-Esnault, 2002).

Ove presente, *C. nucula* è in grado di caratterizzare vere e proprie facies, sviluppandosi non solo come moduli distinti ma anche in forma di ampie *patches*. In generale, essa si accresce su una larga varietà di substrati viventi e non viventi compresi roccia, detriti grossolani, alghe coralline, conchiglie e altre spugne ed è la sola specie sessile cospicua in grado di svilupparsi con successo su substrati superficiali distrutti dalla pesca abusiva del dattero di mare e sottoposti al sovrapascolo di *Arbacia lixula* e/o *Paracentrotus lividus* (Fanelli *et al.*, 2003).

Il genere *Chondrilla* comprende specie spesso molto competitive nella lotta per la colonizzazione del substrato grazie alla strategia riproduttiva (che sfrutta largamente la riproduzione asessuale per frammentazione) e alla generale efficacia nelle interazioni allelopatiche con gli organismi sessili circostanti. La possibilità che la competitività espressa dalle specie raccolte nel genere *Chondrilla* sia mediata dalla presenza di metaboliti secondari

dotati di attività biologica è attualmente argomento di studio da parte di diversi gruppi di ricerca. Fra i composti isolati da questa specie si annoverano acidi grassi complessi (Carballeira *et al.* 1986, 1987) e lecitine utilizzabili in diagnostica (Opric *et al.*, 1996) o attive contro virus umani (Schröder *et al.*, 1990), mentre estratti grezzi di *C. nucula* hanno mostrato una discreta attività citotossica (Sepcic *et al.*, 1997).

2. OBIETTIVI

La ricerca ha perseguito lo scopo di studiare la specie *Chondrilla nucula*, porifero comune nel Mar Mediterraneo ed ottimo filtratore, al fine di potere eleggere l'animale come bioaccumulatore/bioindicatore di metalli pesanti e bioremediator di acque marine contaminate da alte concentrazioni di HM, nell'ambito dello sviluppo di nuove tecnologie ecocompatibili per il risanamento ambientale e per il monitoraggio ambientale, sfruttando oltre la capacità filtrante, anche l'eccezionale capacità rigenerativa e la biologia riproduttiva della specie oggetto della ricerca.

Gli obiettivi principali della ricerca sono stati

- Valutare la capacità di accumulo della specie oggetto di studio di metalli pesanti, in condizioni di laboratorio, per ipotizzare un possibile utilizzo dell'organismo in piani di biomonitoraggio ("Sponge Watch Programs") ed in programmi di risanamento ambientale;
- Valutare le risposte dell'organismo contaminato attraverso l'analisi delle Metallothioneine (biomarker di esposizione), con l'uso di diverse metodiche;
- Valutare le possibili variazioni morfostrutturali negli organismi sottoposti ad inquinamento da metalli pesanti.

Il presente lavoro, inoltre, è stato affiancato da una serie di attività sperimentali pilota nell'ambito delle tecnologie di Bioremediation, che hanno avuto come scopo principale:

- Valutare la fattibilità degli studi svolti in laboratorio, attraverso la realizzazione di strutture *open-sea* sommerse per la crescita di *C. nucula*, ritenuta maggiormente adatta per il risanamento ambientale di siti inquinati, come aree portuali a differente grado di contaminazione da metalli pesanti.

Questa fase della ricerca, realizzata sulla scia di esperimenti di spongicoltura già testati e brevettati su altre specie di poriferi, ha avuto come obiettivo specifico:

- Elaborare linee guida per l'attuazione di un programma di bioremediation attraverso l'uso della specie studiata.

3. MATERIALI E METODI

Per provare la validità delle ipotesi e raggiungere gli obiettivi prefissati, lo studio è stato suddiviso in fasi differenti.

La prima fase ha previsto l'attività di survey per l'individuazione delle aree di prelievo degli esemplari di spugne da utilizzare, sia per le successive attività di laboratorio, al fine di testare l'accumulo dei metalli pesanti e la risposta gli organismi, sia per il trapianto dei campioni in aree fortemente degradate, come i porti, attraverso esperimenti pilota.

Pertanto la scelta dei siti di prelievo è avvenuta in funzione della vicinanza con i luoghi di svolgimento delle sperimentazioni di laboratorio e di campo.

Inoltre, la definizione dei siti di campionamento è avvenuta tenendo in considerazione lo stato ambientale dell'area e l'abbondanza della specie ricercata.

Le attività di laboratorio sono state finalizzate a verificare, in condizioni controllate, l'effettiva efficienza della specie scelta come bioaccumulatore/bioindicatore e bioremediator.

Ciò è stato realizzato attraverso una serie di test di esposizione degli esemplari a metalli pesanti presenti nell'acqua con diverse concentrazioni, partendo dal minimo livello di concentrazione, equivalente alla concentrazione di metallo nelle acque, regolamentata dalla Tabella 3 "Valori limiti di emissione in acque superficiali e in fognatura" dell'Allegato 5 nella Parte terza - Limiti di emissione degli scarichi idrici del Decreto legislativo 03.04.2006, n. 152, di cui di seguito si evidenzia un estratto relativo ai metalli scelti per lo studio.

Estratto Tabella 3 del Decreto legislativo 03.04.2006, n. 152

Numero parametro	PARAMETRI	Unità di misura	Scarico in acque superficiali	Scarico in rete fognaria [*]
13	Cadmio	mg/L	0,02	0,02
20	Piombo	mg/L	0,2	0,3
21	Rame	mg/L	0,1	0,4

Al fine di eleggere *C. nucula* come bioaccumulatore in programmi di monitoraggio ambientale, è stata svolta, oltre all'analisi della concentrazione dei metalli accumulati negli organismi esposti, anche l'analisi dei biomarkers per valutare la risposta dei campioni in seguito al trattamento di contaminazione. Per l'analisi delle Metallotioneine sono state seguite due differenti tecniche con lo scopo di confrontare i risultati conseguiti.

Tramite la tecnica del Western blotting è stato possibile evidenziare sia qualitativamente sia quantitativamente, mediante l'analisi densitometrica, la presenza delle proteine espresse in funzione dei diversi livelli di contaminazione.

Mediante l'analisi immunostochimica è stata verificata l'espressione delle proteine, sotto l'aspetto qualitativo, ottenendo ulteriori informazioni sulla posizione delle MT negli stessi campioni trattati.

Inoltre, sono state analizzate le differenze morfostrutturali tra gli organismi controllo e quelli esposti a contaminanti.

Dopo avere appurato l'effettiva capacità di bioaccumulo della specie studiata in condizioni di laboratorio è stato possibile avviare un protocollo sperimentale finalizzato alla realizzazione di trapianti in aree particolarmente degradate, come quelle portuali, per il risanamento ambientale.

La scelta delle aree è stata effettuata sulla base di un diverso livello di contaminazione da metalli pesanti, selezionando tre siti portuali siciliani.

Pur essendo a conoscenza di sistemi brevettati per la coltura delle spugne in mare, sono stati effettuati esperimenti pilota per testare la fattibilità delle prove, partendo dal prelievo, seguendo le fasi di trasporto, trapianto, gestione e monitoraggio, al fine di definire al meglio un protocollo per la realizzazione di impianti di depurazione sfruttando *C. nucula* e con l'obiettivo di redigere le linee guida sulla metodologia più idonea per sviluppi applicativi nel campo del risanamento ambientale con l'uso dei poriferi.

Lo studio volto a testare la capacità di accumulare metalli pesanti in *Chondrilla nucula* è stato realizzato in laboratorio accreditato per la realizzazione di test ecotossicologici, presso il LIAA (Laboratorio di Igiene Ambientale e degli Alimenti) del Dipartimento di Anatomia, Patologia Diagnostica, Medicina Legale, Igiene e Sanità Pubblica G.F. Ingrassia) dell'Università degli Studi di Catania.

Gli studi di immunocitochimica e morfostrutturali dei campioni esposti sono stati svolti grazie alla collaborazione con la Prof.ssa Violetta Brundo, Ricercatrice del Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali del Settore scientifico di Anatomia Comparata e Citologia dell'Università di Catania.

3.1 ESPERIMENTI DI ESPOSIZIONE A METALLI PESANTI

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare, utilizzando un protocollo sperimentale basato sulla contaminazione dell'acqua con diverse concentrazioni di metalli pesanti, la capacità di bioaccumulo di *Chondrilla nucula* e le conseguenti risposte biologiche fornite dalla specie, al fine di verificare il suo possibile impiego in futuri programmi di biomonitoraggio e di bioremediation.

Sono stati oggetto di indagine l'accumulo dei metalli, mediante impiego di spettrometria di emissione atomica mediante plasma induttivamente accoppiato (ICP-MS Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry), l'espressione di molecole indicatrici dello stress conseguente al bioaccumulo dei metalli, quali metallotioneine (MT) e l'organizzazione morfostrutturale degli esemplari testati. I metalli investigati sono stati il cadmio (Cd), il rame (Cu) ed il piombo (Pb), considerando tre diversi livelli di concentrazione per ciascun elemento.

Tab. 1 Livelli di concentrazione di Cd immessi nelle acque dei test

Livelli di concentrazione Cd	
1° Livello	0.02 mg/L
2° Livello	0.04 mg/L
3° Livello	0.08 mg/L

Tab. 2 Livelli di concentrazione di Cu immessi nelle acque dei test

Livelli di concentrazione Cu	
1° Livello	0.1 mg/L
2° Livello	0.2 mg/L
3° Livello	0.4 mg/L

Tab. 3 Livelli di concentrazione di Pb immessi nelle acque dei test

Livelli di concentrazione Pb	
1° Livello	0.2 mg/L
2° Livello	0.4 mg/L
3° Livello	0.8 mg/L

Tab. 1/2/3 - Il 1° Livello corrisponde alla concentrazione massima di metallo nell'acqua consentita dal D.L. 152/2006; il 2° Livello equivale al doppio del 1°; il 3° Livello è pari a quattro volte il 1° Livello.

Lo studio è stato realizzato in acquario, dove sono stati effettuati esperimenti di immissione di metalli pesanti allo scopo di misurare la capacità di accumulo in *C. nucula*, valutando la risposta del singolo individuo sottoposto alle prove sperimentali.

Gli esemplari di *C. nucula* da esporre a metalli pesanti, sono stati prelevati dall'AMP Plemmirio, al fine di sperimentare i test su organismi non contaminati ed insediati in un ambiente in uno stato di salute vicino all'optimum.

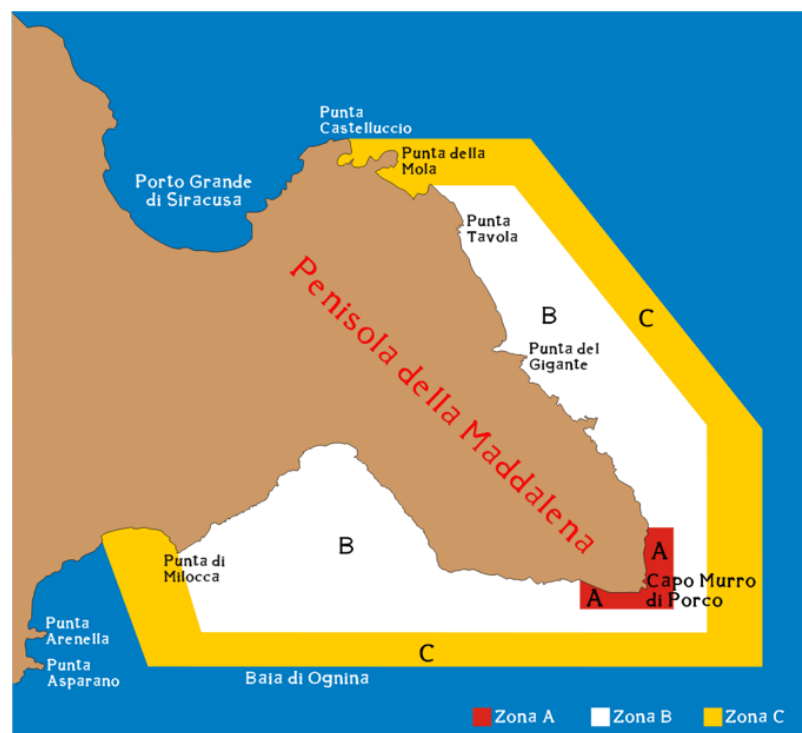
3.1.1 AREA DI STUDIO

L'AMP Plemmirio ricade nella fascia costiera della Penisola Maddalena, tra Punta Castelluccio e Punta di Milocca. La "Penisola Maddalena" è un piccolo altopiano che dalla quota massima di 54 m s.l.m. degrada verso mare sia ad oriente che ad occidente in parte in maniera blanda attraverso dei terrazzi marini, in parte attraverso scarpate marine.

Questo tipo di situazione si ripropone anche nell'aspetto della costa che si alterna tra bassa, con piccole linee di spiaggia, o alta e frastagliata.

Da capo Castelluccio a Punta Tavernara, nel versante nord-est dell'AMP e da Punta di Milocca al Capo, il fondale si mantiene basso ed uniforme per diverse centinaia di metri, poi scende improvvisamente a quote più elevate. Da Punta Tavernara a Capo Murro di Porco, invece, già sottocosta si incontrano fondali di oltre 30-40 metri.

Fig. 4 Mappa dei confini dell'AMP Plemmirio



3.1.2 CARATTERIZZAZIONE AREA DI PRELIEVO

Per caratterizzare il sito di prelievo ed al fine di ottenere le informazioni su parametri chimico-fisici per ricreare in laboratorio le stesse condizioni, sono stati campionati ed analizzati sedimenti ed acque.

E' stato, dunque, effettuato un campionamento dei sedimenti nell'area scelta per il prelievo degli organismi, per caratterizzare l'ambiente in funzione della concentrazione dei metalli

pesanti presenti. I campioni di sedimento, raccolti tra il mese di settembre e novembre, tramite uno strumento in PVC e un contenitore da un operatore in immersione con autorespiratore (A.R.A.).

I campioni di sedimento prelevati sono stati posti all'interno di contenitori di vetro scuro e conservati a -20°C per le successive analisi di laboratorio.

Da ciascun campione di sedimento sono stati eliminati i corpi grossolani presenti per poi essere 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.

Su ciascun campione di sedimento è stata condotta la determinazione dei metalli, 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: cadmio (Cd), rame (Cu), zinco (Zn), piombo (Pb), arsenico (As), cromo (Cr) e nichel (Ni).

Sono stati inoltre misurati alcuni dei parametri chimico-fisici dell'acqua del tratto di mare dove è avvenuto il prelievo degli esemplari, al fine di ricreare in laboratorio le stesse condizioni, ideali per la sopravvivenza della spugna.

Tutte le misure di campo, ovvero salinità, pH, T, DO, NO_2 e NO_3 , sono state eseguite con strumenti e kit utilizzati nell'acquariofilia, rispettivamente con il rifrattometro, il pHmetro, il termometro, il Kit per l'analisi di campo dell'Ossigeno disciolto ed il Kit per l'analisi di campo dei Nitriti e dei Nitrati.

3.1.3 SITING/SURVEY

Durante la fase di siting sono state svolte indagini sulla presenza/assenza della specie oggetto di studio.

Dopo aver individuato le aree in base alle conoscenze acquisite, si è proseguito con i sopralluoghi dei siti, ritenuti idonei per il rinvenimento della specie.

Sono stati effettuati diversi sopralluoghi all'interno dell'Area Marina Protetta del Plemmirio.

Il lavoro è stato effettuato in immersione con autorespiratore ad aria (A.R.A.) dalla profondità di -2 m ai -15 m.

3.1.4 METODICHE DI PRELIEVO ESEMPLARI

I prelievi degli organismi, destinati al trattamento di esposizione ai metalli pesanti, sono avvenuti nel tratto di mare dell'Area Marina Protetta Plemmirio, in zona B a sud-ovest della Penisola Maddalena, nella Costa Bianca, in accordo con il regolamento dell'AMP e dietro autorizzazione dell'Ente Gestore.

Fig. 5 Sito di prelievo dei poriferi all'interno dell'AMP Plemmirio

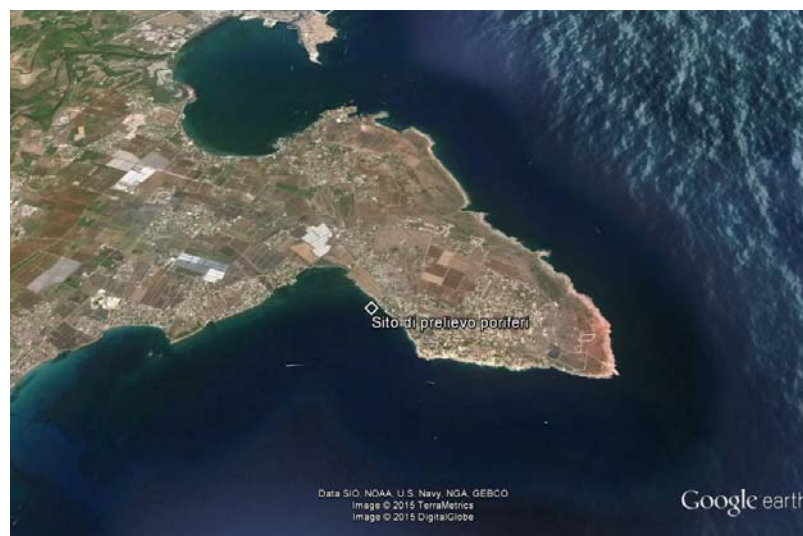


Fig. 6 Costa in prossimità del prelievo



Fig. 7 Sbocco n. 23 in prossimità del prelievo



Come da disegno sperimentale, la raccolta è avvenuta rimuovendo le spugne dal loro substrato, delicatamente, facendo attenzione a non danneggiare il corpo dell'animale.

Il prelievo è avvenuto in immersione con autorespiratore (ARA) e gli organismi sono stati raccolti alla profondità di c.a. -3 m, laddove erano più abbondanti.

Fig. 8 Prelievo campioni di poriferi



Il trasporto dal sito del prelievo al laboratorio ha avuto la durata di 1 h, mantenendo gli animali in una vasca colma d'acqua di mare, ossigenata e refrigerata, con del ghiaccio per mantenere la temperatura di 13 C°.

Fig. 9 *C. nucula* in contenitore per il trasporto



Sono stati prelevati un totale di 222 campioni di *C. nucula* di c.a. 5 grammi, nell' AMP Plemmirio nei mesi di Maggio, Luglio, Settembre, Ottobre e Novembre, che corrispondono rispettivamente al periodo pre riproduttivo della specie, all'inizio del periodo riproduttivo, al periodo riproduttivo più intenso, alla fine del periodo riproduttivo e al periodo post riproduttivo.

In un primo tempo sono stati prelevati 6 organismi per l'analisi in laboratorio dei campioni controllo, per verificare la concentrazione dei metalli pesanti presente negli esemplari originari dell'area di campionamento.

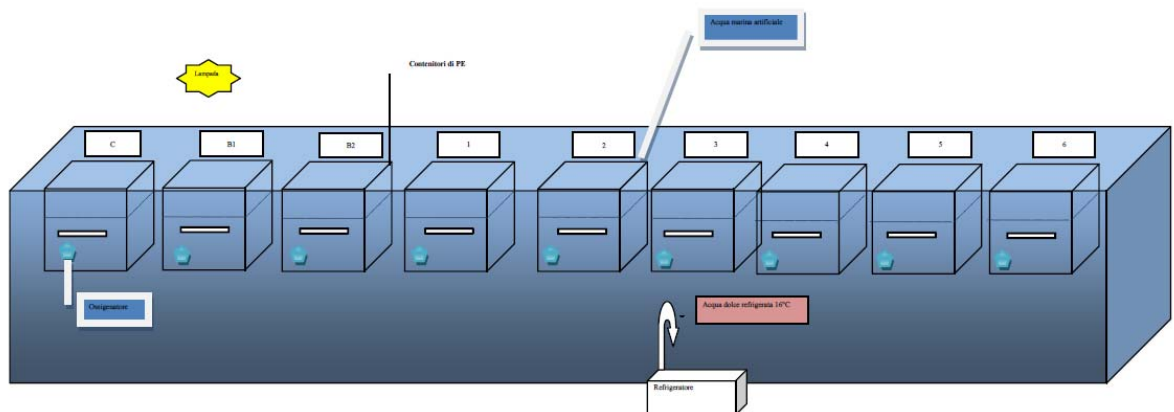
Gli esemplari, considerati come campioni controllo, sono stati suddivisi in tre parti, di cui 2 gr per l'analisi dei metalli, conservati a - 80 °C, 2 gr per l'analisi delle Metallotioneine, conservati a - 80 °C, 1 gr per le indagini al Microscopio Ottico, conservati in formaldeide.

In una seconda fase, sono stati raccolti i 216 organismi, per i successivi test con i metalli pesanti, trasportati ed impiantati nei contenitori del sistema sperimentale.

3.1.5 IDEAZIONE E ALLESTIMENTO DEL SISTEMA PER I TEST IN CONDIZIONI DI LABORATORIO

I test sono stati effettuati in acquario, prevedendo l'allestimento di un sistema suddiviso in più vasche contenenti acqua marina artificiale a T, DO, Ph, Salinità, Nitrati e Nitriti controllati.

Fig. 10 Sistema di vasche acquario ideato per i test di esposizione a HM



La preparazione dell'acqua marina artificiale è avvenuta sciogliendo il mix di Sali (REEF SALT MIX – KENT MARINE) in 9 L di acqua bidistillata contenuta in una tanica da 15 L, per ciascun esperimento.

Scheda tecnica	
REEF SALT MIX – KENT MARINE	
Nitrato	0,000
Fosfato	0,000
Calcio (ppm)	425 - 450
Magnesio (ppm)	1,150 – 1,250
pH	8,2 – 8,3
Specific gravity	1,021 – 1,023

Al fine di ottenere la densità di sale desiderata, presente nel sito di prelievo dei campioni, ovvero di 38 ‰, sono stati pesati c.a. 50 gr di mix di Sali per litro di acqua, disciolti in acqua mediante l'uso di una pompa di movimento per acquari, quindi la salinità è stata misurata con un rifrattometro. Il pH è stato misurato con un pHmetro per acquario, l'Ossigeno disciolto, i Nitrati e i Nitriti sono stati controllati e monitorati con Kit specifici per acquario.

Fig. 11



Fig. 12



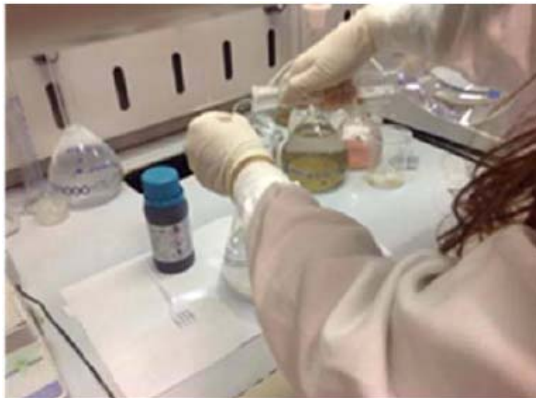
Al fine di contaminare l'acqua marina artificiale è stato pesato il sale del metallo (Cloruro nel caso di Cadmio e Rame e Nitrato nel caso del Piombo) (Fig. 13 e 14) per ottenere la concentrazione voluta (Livello 1, Livello 2, Livello 3) ed è stato disciolto nell'acqua preparata. Per realizzare il trattamento con il Cadmio è stato anche in questo caso utilizzato il Cloruro del metallo anidro (CdCl_2 – ACROS ORGANICS) , per realizzare il trattamento con il Rame è stato utilizzato il Cloruro di Rame diidrato ($\text{Cl}_2\text{Cu} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – FISHER CHEMICAL), mentre per il trattamento con il Piombo è stato utilizzato il Nitrato di Piombo ($\text{N}_2\text{O}_6\text{Pb}$ – CARLO ERBA).

L'acqua marina artificiale, contaminata, è stata dunque riversata nelle vaschette del sistema di acquario, versando 1 L in ciascun contenitore.

Fig. 13



Fig. 14

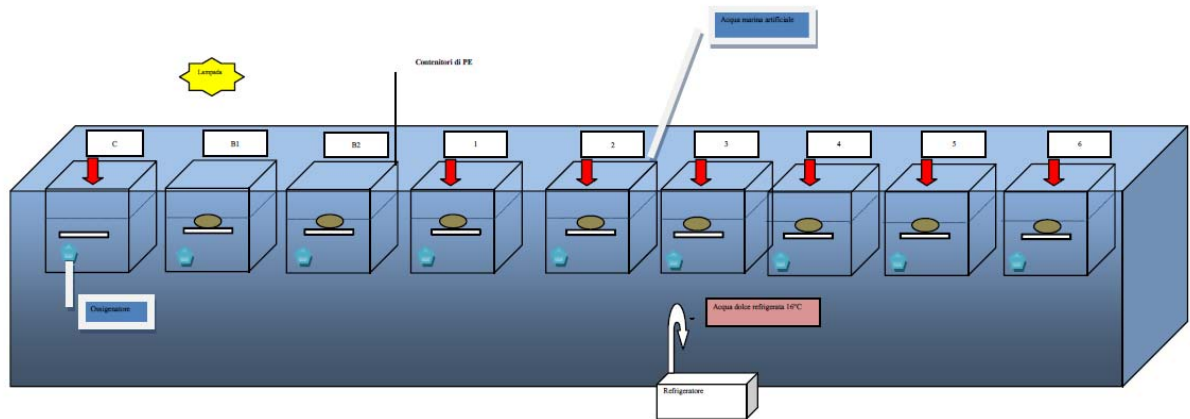


3.1.6 TEST DI ESPOSIZIONE A METALLI PESANTI

Lo stesso giorno della raccolta si è proceduto ad iniziare il test che ha avuto la durata di 48 h. Come precedentemente detto, gli organismi catturati sono stati inseriti in ciascuna vaschetta, tranne nella vaschetta C (controllo metallo). Le vaschette numerate da 1 a 6 hanno contenuto gli esemplari che hanno subito il trattamento di esposizione, mentre le vaschette B₁ e B₂ hanno contenuto gli esemplari controllo. La vaschetta C ha contenuto esclusivamente l'acqua marina

artificiale contaminata dal metallo scelto con uguale livello di concentrazione destinato alle altre 6 vaschette, per un ulteriore controllo.

Fig. 15 Sistema di vasche in fase di test di esposizione a HM



Ciascun esperimento è stato testato su 6 organismi differenti con uguale volume e peso, campionati nello stesso sito ed è stato replicato 3 volte, in periodi differenti, utilizzando individui dello stesso patch, nello stesso sito di prelievo.

Sono state svolte 3 repliche, in tempi differenti, di ogni test che ha previsto l'esposizione di 6 campioni di spugne (trattate separatamente ad uguali condizioni in 6 vasche diverse contenenti 1 l di acqua marina artificiale) allo stesso livello di concentrazione del metallo scelto. Sono stati così realizzati 9 test finalizzati al trattamento dei campioni per ciascun metallo (3 Test/Livello di concentrazione), per un totale di 27 test somministrati su 162 campioni.

Per ogni esperimento sono state inserite tre vaschette controllo: due vaschette contenenti 1 l MW (senza metallo) e il campione di spugna ed una vaschetta contenente 1 l MW con la concentrazione di metallo scelta per il test, senza organismo. In ogni vaschetta, debitamente areata, è stato inoltre immesso l'alimento per le spugne, per riprodurre quanto possibile le condizioni ideali per la sopravvivenza degli esemplari. Gli esperimenti sono stati programmati

procedendo inizialmente con il trattamento di contaminazione con il Cadmio, ai tre livelli di concentrazione stabiliti, successivamente con il trattamento di contaminazione con il Rame ed infine con la contaminazione del Piombo.

L'esperimento è stato condotto utilizzando un sistema refrigerato e ossigenato ed è stato monitorato, per controllare le eventuali alterazioni dei parametri chimico-fisici.

Tab. 4 Controllo parametri chimico-fisici per la durata dell'esperimento

Data	Parametri	Ora	Vasca B	Vasca C	Vasca 1	Vasca 2	Vasca 3	Vasca 4	Vasca 5	Vasca 6	
1° g	T°	8.30									
		14.30									
		19.00									
	PH	8.30									
		14.30									
		19.00									
	PSU	8.30									
		14.30									
		19.00									
	DO	8.30									
	Nitrati- Nitriti	19.00									
	2° g	T°	8.30								
14.30											
19.00											
PH		8.30									
		14.30									
		19.00									
PSU		8.30									
		14.30									
		19.00									

In ciascuna vaschetta sono stati monitorati 3 volte al giorno i parametri chimico-fisici dell'acqua. La salinità è stata controllata mediante rifrattometro; il pH, in un range da 8,2 a 8,3, è stato misurato e monitorato, come da tabella 4, con un pHmetro per acquario; la temperatura desiderata, di c.a. 16 C°, è stata monitorata con un termometro per acquario; l'Ossigeno disciolto ed i Nitrati e i Nitriti sono stati controllati e monitorati con Kit specifici per acquario.

Fig. 16 Sistema di vaschette per i test di esposizione



Al termine dell'esperimento, ciascun organismo sottoposto ad immissione metalli di 5 grammi, è stato diviso, al termine del test, per le successive analisi, ovvero 2 grammi per l'analisi dei metalli (conservati a -80°C) mediante impiego di spettrometria di emissione atomica, 2 grammi per l'analisi delle Metallotioneine (conservati a -80°C) ed 1 grammo per l'osservazione al Microscopio Ottico (conservati in formaldeide).

3.1.7 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DEI METALLI PESANTI

Determinazione nei campioni di acqua contaminata

Per ogni vaschetta controllo contenente acqua marina artificiale contaminata, sono state prelevate 3 repliche di 1 ml di campione, al fine di testare la concentrazione di metallo all'inizio e alla fine dell'esperimento, per escludere l'eventuale precipitazione del sale del metallo ed una potenziale variazione della concentrazione di metallo presente.

Il campione di acqua, versato in provette di plastica da 10 ml, è stato immediatamente acidificato con 50 μl di HNO_3 Suprapur e portato a volume di 10 ml con acqua bidistillata, effettuando una diluizione D10.

Ciascun campione è stato conservato in frigorifero, per le successive letture mediante l'ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry), previa aggiunta di standard interno (Y e Re).

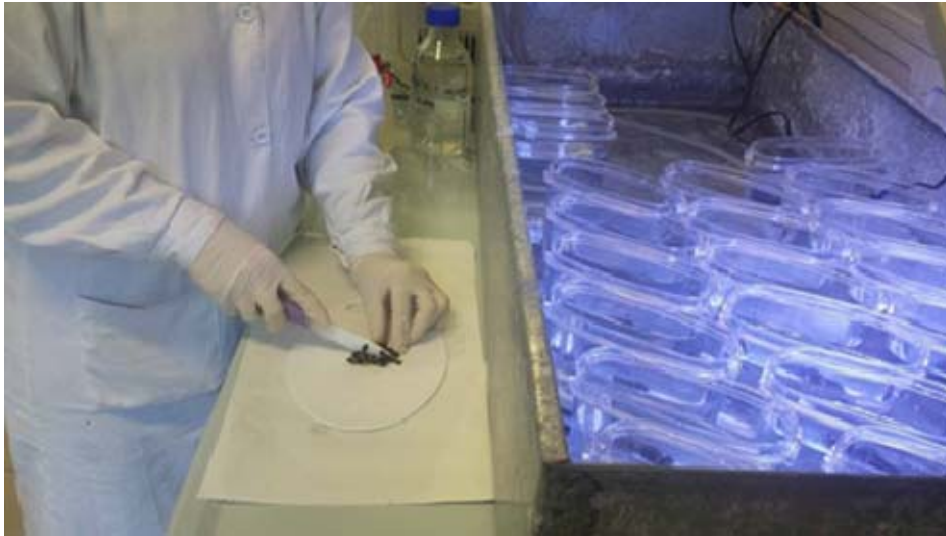
Trattamento preliminare dei campioni di spugne

Per il trattamento dei campioni in laboratorio è stato utilizzato materiale da dissezione (coltelli e pinzette) in ceramica e plastica per evitare possibili contaminazioni.

Fig. 17



Fig. 18



Per ogni esemplare, mediante l'utilizzo di una bilancia analitica, sono stati pesati c.a 2 g di spugna, immediatamente conservati in appositi contenitori, DigiTube, prima del successivo ciclo di mineralizzazione.

La mineralizzazione dei campioni è avvenuta in un sistema aperto con controllo termico tramite sonda utilizzando lo strumento DigiPREP con blocchi di digestione in grafite. Il metodo prevede la digestione totale dell'animale, con miscela di acidi forti, a 130°C, in DigiTube, per portare in soluzione tutti i metalli presenti.

Ai campioni presenti nei contenitori sono stati successivamente aggiunti 6 ml di HNO₃ al 65% e 2 ml di H₂O₂ al 30%; i contenitori sono stati chiusi, e, previo raggiungimento della temperatura nello strumento, inseriti negli appositi alloggi, procedendo con la mineralizzazione della durata di 60 minuti.

Terminato il ciclo di mineralizzazione, i contenitori sono stati aperti sotto cappa dopo averli lasciati raffreddare a temperatura ambiente per una notte; successivamente i campioni digeriti

sono stati trasferiti in provette di plastica sterile e portati ad un volume di 30 ml o 50ml con acqua bidistillata, rispettivamente per i campioni esposti a concentrazioni di metalli più basse e per i campioni esposti a concentrazioni di metalli più alte. Ciascun campione è stato conservato in frigorifero, per le successive letture mediante l'ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry), previa aggiunta di standard interno (Y e Re).

Analisi quali-quantitativa dei metalli mediante ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)

La tecnica ICP-MS è una tipologia di spettrometria di massa altamente sensibile e in grado di effettuare determinazioni di tipo quali-quantitativo su molteplici sostanze inorganiche, metalliche e non metalliche, presenti anche in concentrazioni inferiori a una parte per trilione. In ICP-MS, il plasma è utilizzato per atomizzare e ionizzare gli atomi del campione.

Fig. 19 ICP-MS Elan DRC-e



Gli ioni, ottenuti, vengono quindi fatti passare, attraverso un sistema di aperture (coni), nell'analizzatore di massa, nell'ambito di un sistema che lavora sotto vuoto. Gli isotopi degli elementi vengono identificati in base al rapporto massa/carica (m/z), tramite un analizzatore a

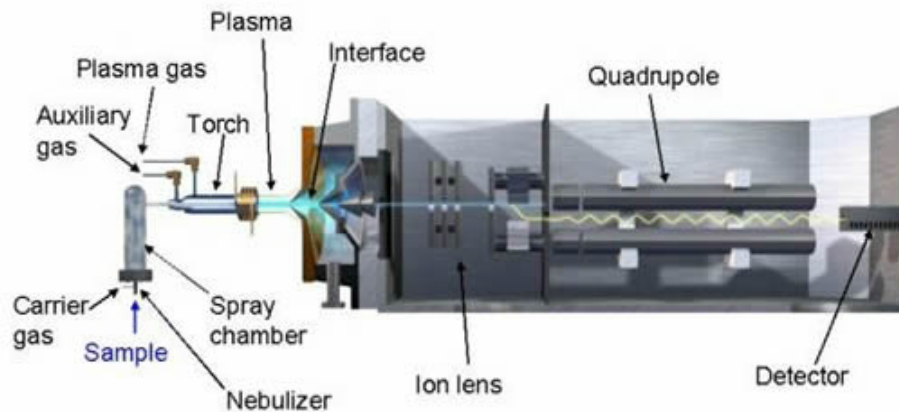
quadrupolo, e l'intensità di ogni picco è proporzionale alla quantità del particolare isotopo dell'elemento nel campione.

Una bobina di metallo, alimentata da un generatore di radiofrequenze (RF) genera un intenso campo magnetico. Nel centro di questo avvolgimento è posta la torcia che consiste di 3 tubi concentrici, in quarzo, che contengono 3 flussi separati di Ar. Il plasma è indotto dal flusso di Ar. Il campione, introdotto come fine aerosol o gas, viene trasportato attraverso il tubo più interno.

La torcia dell'ICP è costruita in modo tale da permettere l'iniezione del campione direttamente nel cuore del plasma, dove esso collide con elettroni liberi, atomi di Ar e ioni Ar^+ subendo i processi di atomizzazione e ionizzazione. Gli ioni che si formano sono prevalentemente monocarichi (M^+) anche se possono formarsi specie M^{++} . Inoltre nel plasma alcuni di questi ioni possono ricombinarsi con altre specie producendo specie molecolari stabili (es. MAr^+ , M^{2+} , MO^+ , ecc.), molte delle quali, essendo cariche positivamente, potrebbero essere trasmesse all'analizzatore di massa insieme agli ioni M^+ e M^{++} . Ai fini dell'analisi si preferisce avere la forma monocationica M^+ , pertanto si scelgono le condizioni sperimentali che ne aumentino la produzione a scapito delle altre.

La zona critica dello strumento è quella dell'interfaccia tra il plasma, che opera a pressione ambiente, e lo spettrometro di massa, che necessita di alto vuoto (circa 10^{-7} mBa). L'interfaccia consiste di due coni con la punta rivolta verso il plasma, il sampler cone (cono di campionamento) più prossimo al plasma e lo skimmer cone (cono di scrematura) localizzato qualche millimetro dietro il sampler.

Fig. 20 Illustrazione delle componenti interne di un ICP-MS



Subito dietro ai coni, il sistema di lenti focalizza gli ioni verso la regione del quadrupolo, attraverso il passaggio in un cilindro metallico carico che agisce da lente focalizzatrice; infatti dal momento che la carica della lente è la stessa degli ioni, essi sono respinti indietro andando a formare un fascio di ioni definito.

Lo spettrometro di massa separa i singoli ioni carichi in base alla massa, agendo come un filtro. Il quadrupolo consiste di quattro barre orizzontali parallele che vanno a delimitare uno spazio a sezione quadrata; alle coppie agli antipodi vengono applicate correnti continue di segno opposto. Questo campo elettrico fa muovere gli ioni, consentendo solo a quelli di una data massa di attraversare l'intero quadrupolo e giungere al rivelatore. Il quadrupolo, quindi, smista gli ioni sulla base del rapporto massa-carica.

Gli ioni provenienti dallo spettrometro di massa colpiscono la superficie attiva del detector, generando un segnale elettronico misurabile. Tale superficie attiva, costituita da un dinodo, emette un elettrone ogni volta che risulta colpita da uno ione dando così vita ad un segnale

amplificato; l'elettrone rilasciato dal primo dinodo colpisce il secondo che a sua volta emette più elettroni. La cascata di elettroni continua fin quando non si ottiene un impulso misurabile.

3.1.8 DETERMINAZIONE DI PROTEINE TRAMITE WESTERN BLOTTING

Il Western Blotting è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. Per facilitare il riconoscimento in genere le proteine vengono previamente separate in base alle loro dimensioni sfruttando una elettroforesi denaturante (SDS-Page). Successivamente esse vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa e quindi si procede alla rivelazione vera e propria mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico.

Preparazione dei campioni

Ogni aliquota di spugna è stata omogeneizzata con Potter in Tampone di lisi Ripa più Inibitori a 4°C.

L'omogenato è stato poi centrifugato a 9000 x g per 20 minuti a 4°C (Microfuge R, Beckman Coulter) previa sonicazione. Il sovrantante ottenuto è stato prelevato e congelato a -80°C fino al momento delle analisi.

Quantificazione delle proteine mediante BCA

Utilizzando albumina di plasma bovino (BSA), è stata preparata una curva standard di calibrazione a varie concentrazioni. Per la procedura di quantificazione è stato utilizzato il BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). La lettura delle soluzioni, preparate in doppio, è stata eseguita ad una lunghezza d'onda pari a 560 nm, allo spettrofotometro 1420 Multilabel Counter, Victor³, Perkin Elemer, previa incubazione a 37°C per 30 min; lo strumento fornisce un risultato

dato dalla media delle due letture. La concentrazione proteica, espressa in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, viene calcolata in rapporto alla curva standard di BSA.

[albumin] μg	OD		Media	OD-blank	SAMPLE	[sample] μl	Letture 1	Letture 2	OD		μg	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
0	0,134	0,131	0,133	0	1	3	0,760	0,730	0,745	0,611	41,84	13,95
4	0,208	0,203	0,206	0,073	2	3	0,688	0,687	0,6875	0,5535	38,51	12,84
10	0,311	0,306	0,309	0,176	3	3	0,424	0,428	0,426	0,292	19,70	6,57
15	0,368	0,368	0,368	0,2355	4	3	0,477	0,490	0,4835	0,3495	24,67	8,22
20	0,442	0,444	0,443	0,3105	5	3	0,879	0,956	0,9175	0,7835	55,31	18,44
30	0,575	0,580	0,578	0,445	6	3	0,638	0,679	0,6585	0,5245	37,02	12,34
40	0,701	0,711	0,706	0,5735	7	3	0,507	0,528	0,5175	0,3835	27,07	9,02
60	1,005	0,994	1	0,867	8	3	0,364	0,443	0,4035	0,2695	19,02	6,34
80	1,237	1,244	1,241	1,108	9	3	0,362	0,347	0,3545	0,2205	15,56	5,19
0,998033837												
y=mX+b		m		b		0,014		0,018				
Statistic Array		se(m)		se(b)		0,000		0,008				
		r^2		se(y)		0,997		0,013				

Risultati ottenuti dal processo di quantificazione. In giallo la concentrazione proteica espressa in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Preparazione e trattamento delle aliquote

I campioni sono stati aliquotati e diluiti in Simple Buffer 2x in modo da ottenere aliquote con concentrazione proteica di $50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, sulla base dei risultati ottenuti dal processo di quantificazione.

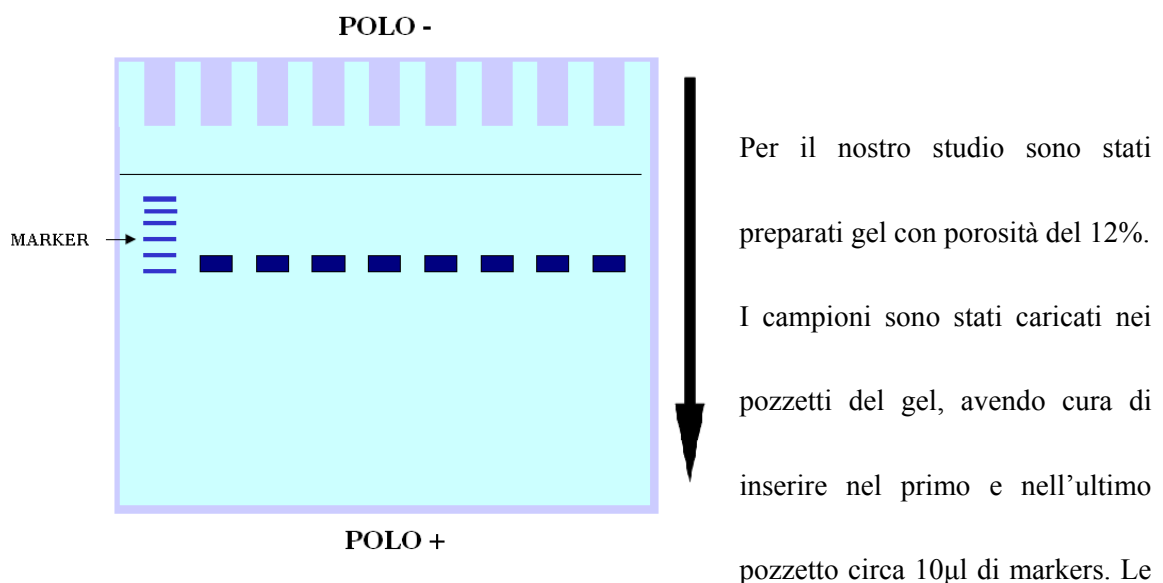
Le eppendorf contenenti i campioni sono state sottoposte a centrifugazione per 15 sec. a $+4^\circ\text{C}$, previo trattamento al vortex e infine, per ottenere la denaturazione delle proteine, sono state inserite per un minuto in un becker con acqua in ebollizione.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE)

Nell'ambito degli studi strutturali risulta particolarmente utile ricorrere ad una separazione delle catene polipeptidiche su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), utilizzando un detergente anionico, il sodio dodecil-solfato (SDS). Questo denaturante proteico

conferisce una carica netta negativa, praticamente uniforme, alle catene proteiche da separare, la cui migrazione nel gel dipenderà di conseguenza esclusivamente dal peso molecolare. Le proteine migrano così attraverso le maglie del polimero, sotto l'effetto di un campo elettrico solo in base alla massa.

Il gel è ottenuto dalla copolimerizzazione di acrilammide e N,N'-metilen-bis-acrilammide; quest'ultima utilizzata come reticolante della catene lineari. Catene polimeriche lineari sono legate trasversalmente da molecole di bis-acrilammide; le maglie formatesi in tal modo sono caratterizzate da una porosità dipendente dalla concentrazione del monomero, dal rapporto monomero-reticolante e dalle condizioni di reazione.



proteine sono state fatte migrare per tutta la lunghezza del gel, grazie al campo elettrico applicato e all'utilizzo di un apposito tampone di corsa (Running Buffer).

Trasferimento in nitrocellulosa

A questo punto si è proceduto al trasferimento delle proteine su un supporto costituito da una membrana di nitrocellulosa con porosità 0,45 µm (Hybond-ECL). Il trasferimento è avvenuto

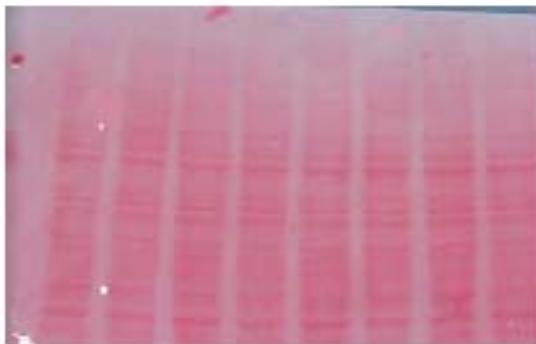
applicando una corrente di 300 mA per un'ora, in apposito tampone di trasferimento (Transfer Buffer). Particolare attenzione è stata data alla preparazione del “sandwich” di trasferimento nel quale i diversi elementi sono stati posti nel seguente ordine, partendo dal lato rivolto verso il polo negativo:

- Spugna;
- Carta;
- Gel;
- Membrana;
- Carta;
- Spugna.

Il trasferimento è avvenuto ponendo la cella in ghiaccio.

Colorazione

Al termine del trasferimento la membrana è stata immersa in circa 20 ml di soluzione di Rosso Ponceau al fine di valutare l'efficienza del trasferimento, la presenza di bolle ed evidenziare l'area di lavoro.



Colorazione delle bande proteiche con Rosso Ponceau

La membrana è stata successivamente decolorata mediante lavaggi in TBS.

Blocking in latte

I siti rimasti liberi a seguito del processo di trasferimento sono stati bloccati rivestendo la membrana con una miscela di proteine non specifiche. Il filtro di nitrocellulosa è stato quindi immerso in una soluzione al 5% di latte in polvere Nonfat Dry Milk (Premium Sanalac) in PBS per un'ora per evitare il legame non specifico dell'anticorpo su tali siti liberi.

Incubazione in Anticorpo Primario

Si è proceduto a questo punto con l'incubazione della membrana in anticorpo primario anti-metallotioneine monoclonale (Abcam, 1:500), over night, su supporto oscillante.

Una volta rimosso e recuperato l'anticorpo primario, sono stati eseguiti tre lavaggi, da 15 min. con PBS-T su agitatore per eliminare dalla membrana l'eventuale anticorpo in eccesso che non avesse aderito al proprio antigene.

Incubazione in Anticorpo Secondario

Lo step successivo ha visto l'incubazione in anticorpo secondario diluito in latte (1:3000), per un'ora su supporto oscillante a temperatura ambiente.

Dopo aver eliminato l'anticorpo secondario sono stati eseguiti tre lavaggi in PBS-T da 15 min. su agitatore, per eliminare dalla membrana l'anticorpo in eccesso che non ha aderito alle immunoglobuline dell'anticorpo primario.

Rivelazione

Successivamente, tramite software *Image Studio Lite*, è stato possibile quantificare le bande di interesse espresse sotto forma di Unità Densitometriche Arbitrarie (UDA). Le UDA delle bande di interesse sono state poi paragonate e normalizzate con le UDA delle bande di una proteina

strutturale, l'actina, che non deve variare tra i campioni analizzati. Questo assicura eventuali correzioni e valutazioni opportune al fine di non incorrere in possibili errori di lettura.

3.1.9 ANALISI ISTOLOGICA ED ISTOCHIMICA

La metodica tradizionale per l'analisi morfologica e strutturale dei tessuti prevede la processazione del campione e l'esame istologico dopo colorazione con ematossilina-eosina ed Alcian Blu.

I campioni fissati in formalina sono stati ridotti in cubetti e alloggiati in apposite biocassette e processati attraverso il processatore automatico che provvede alla disidratazione graduale dei campioni in una serie crescente di alcoli (35% - 50% - 70% - 95% - 100%), alla diafanizzazione in xilolo e all'infiltrazione in paraffina.

Successivamente, i campioni tissutali sono stati portati alla centralina di inclusione dove sono stati inclusi in paraffina. Le formelle di paraffina sono state poste in congelatore overnight per facilitare la polimerizzazione del mezzo di inclusione. Da ciascun campione tissutale incluso è stata ottenuta al microtomo una serie di sezioni di 3 µm montati in vetrini polilisinati.

Per quanto riguarda la colorazione con ematossilina-eosina è stata utilizzata la classica metodica di Mayer. I vetrini sono stati riposti in una vaschetta contenente xilolo per il tempo necessario alla rimozione dei residui di paraffina, successivamente sono stati gradualmente reidratati in una serie decrescente di alcoli (95% - 70% - 50% - 35%) e immersi in acqua distillata. I vetrini reidratati sono stati immersi nel colorante ematossilina per 10 minuti, sciacquati in acqua corrente e immersi nel colorante eosina per 3 minuti. Infine i vetrini sono stati nuovamente

disidratati nella serie crescente di alcoli (35% - 50% - 70% - 95% - 100%) e chiarificati in xilolo e montati, ciascuno con una goccia di montante(Entellan) e un vetrino coprioggetto.

Sulle sezioni sono state effettuate le seguenti colorazioni istochimiche volte alla caratterizzazione delle mucosostanze:

- Soluzione all'1% di Alcian blu 8GX a pH 1 in acido cloridrico 0,1N.
- Soluzione all'1% di Alcian blu 8GX a pH 2,5 in acido acetico al 3%.

I preparati sono stati osservati e fotografati mediante microscopio ottico Leica DFC500.

3.1.10 ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

Per prevenirne la decomposizione, i campioni appena prelevati, sono stati fissati per 7gg a 4°C mediante immersione in formalina. Il trattamento ha la funzione di bloccare le attività vitali della cellula, rendendo insolubili i componenti strutturali, stabilizzando le proteine e inattivando gli enzimi idrolitici.

I campioni fissati in formalina sono stati ridotti in cubetti e alloggiati in apposite biocassette e processati attraverso il processatore automatico che provvede alla disidratazione graduale dei campioni in una serie crescente di alcoli (35% - 50% - 70% - 95% - 100%), alla diafanizzazione in xilolo e all'infiltrazione in paraffina.

Successivamente, i campioni tissutali sono stati portati alla centralina di inclusione dove sono stati inclusi in paraffina. Le formelle di paraffina sono state poste in congelatore overnight per facilitare la polimerizzazione del mezzo di inclusione. Da ciascun campione tissutale incluso è stata ottenuta al microtomo una serie di sezioni di 3 µm montati in vetrini polilisinati.

I vetrini sono stati immersi in soluzioni decrescenti di alcool (Xilolo-Etanolo 100°- 90°-80°-70°-50°30°) e infine portati acqua distillata.

I vetrini sono stati incubati per 30' in H₂O₂ all'0,5% in PBS per bloccare la perossidasi endogena che avrebbe potuto dar luogo ad una colorazione aspecifica. Al termine sono stati eseguiti lavaggi in PBS per eliminare i residui di H₂O₂.

I pezzi sono stati incubati per 1h in NGS (Normal Goat Serum) al 20 % in PBS, in camera umida e a temperatura ambiente al fine di bloccare i siti aspecifici che avrebbero potuto dare dei falsi positivi.

I campioni sono stati incubati over night in anticorpo primario anti-metallotioneine monoclonale (Abcam, 1:500) diluito in PBS in camera umida a +4°C. Al termine sono stati eseguiti lavaggi in PBS.

I vetrini sono stati incubati in anticorpo secondario fluoresceinato diluito in PBS (anti mouse, TRITC/FITC, Sigma, 1:500), per 2h in camera umida e a temperatura ambiente. A seguire lavaggi in PBS.

Per ogni campione analizzato sono state effettuate delle sezioni di controllo per le quali è stato omissa il passaggio in siero immunospecifico.

I vetrini sono stati disidratati in alcool crescenti, fino all'assoluto e montati con soluzione antifade con DAPI.

I preparati sono così stati osservati e fotografati mediante microscopio ad epifluorescenza Olympus AX70.

3.1.11 ANALISI STATISTICA

I dati relativi alle variabili indagate (concentrazione dei metalli nelle spugne in relazione alla concentrazione dei metalli pesanti nell'acqua del trattamento) sono state analizzate sia attraverso un approccio univariato ANOVA (analisi della varianza), sia attraverso l'approccio della regressione lineare, mediante il software IBM SPSS 20.0.

Con Anova univariata è stata indagata la differenza delle concentrazioni accumulate dai singoli campioni in funzione del livello di esposizione, rappresentata in Box-Plot.

Inoltre mediante il Test di Pearson è stata analizzata la correlazione tra le concentrazioni di HM nelle spugne e l'espressione delle MTs all'aumentare dei livelli di esposizione.

3.2 ESPERIMENTI PILOTA DI BIOREMEDIATION

La sperimentazione finalizzata alla realizzazione di impianti con gli organismi “depuratori” si è svolta presso tre differenti aree portuali della Sicilia a diverso grado di contaminazione.

Essendo la specie, secondo alcune fonti bibliografiche, molto comune e abbondante lungo le coste del Mar Mediterraneo, e dunque, ideale per la ricerca progettata, il lavoro ha comportato uno studio preliminare di siting e survey per rinvenire la specie in prossimità delle aree scelte da monitorare e depurare, ovvero presso il golfo di Sferracavallo, lungo la costa catanese e lungo quella di Portopalo, al fine di impiantare gli organismi rinvenuti, rispettivamente, nel porto di Sferracavallo, nel porto di Ognina e nel porto di Portopalo di Capo Passero. A ciò è seguito il prelievo, laddove la specie è stata trovata, e, la realizzazione di esperimenti di transplanting, testando la sopravvivenza degli organismi e la fattibilità delle sperimentazioni.

Lo scopo del lavoro è stato quello di realizzare dei prototipi di strutture sommerse dove impiantare la specie scelta come bioremediator, valutando la fattibilità degli esperimenti pilota in aree particolarmente soggette ad inquinamento come i siti portuali.

A tal fine si è proceduto inizialmente all’ideazione della struttura, prendendo in considerazione esperimenti di allevamento di altre specie di spugne e, successivamente, alla realizzazione del sistema.

Al fine di mettere in pratica il programma, è stata svolta la caratterizzazione delle aree dove impiantare le strutture. La scelta delle aree è stata effettuata selezionando sia zone meno inquinate, sia aree più contaminate. Le aree scelte sono state il Porto di Sferracavallo, che ricade nella Zona C dell’AMP di Capo Gallo-Isola delle Femmine, il Porto di Ognina, nella periferia nord di Catania e il Porto di Portopalo, nella punta estrema sud della Sicilia.

Essendo la specie, secondo alcune fonti bibliografiche, molto comune e abbondante lungo le coste del Mar Mediterraneo, e dunque, ideale per la ricerca progettata, il lavoro ha comportato uno studio preliminare di siting e survey per rinvenire la specie in prossimità delle aree scelte da monitorare e depurare, ovvero presso il golfo di Sferracavallo, lungo la costa catanese e lungo quella di Porto Palo, al fine di impiantare gli organismi rinvenuti, rispettivamente, nel porto di Sferracavallo, nel porto di Ognina e nel porto di Portopalo di Capopassero. A ciò è seguito il prelievo, laddove la specie è stata trovata, e, la realizzazione di esperimenti di transplanting, testando la sopravvivenza degli organismi e la fattibilità delle sperimentazioni.

3.2.1 AREE DI STUDIO

Sono state scelte tre aree portuali, dove sono stati fatti dei sopralluoghi. Il Porto di Sferracavallo ricade nella Zona C dell'AMP di Capo Gallo-Isola delle Femmine, il Porto di Ognina, nella periferia nord di Catania e il Porto di Portopalo di Capo Passero, nella punta estrema sud della Sicilia.

Il porto di Sferracavallo (Fig. 21) si trova nell'omonima borgata a poche miglia dal porto di Palermo, tra il Monte Gallo e il Comune di Isola delle Femmine. Ricade nella Zona C dell'Area Marina Protetta di Capo Gallo – Isola delle Femmine ed è costruito su una piccola insenatura, con un molo a Nord. Presenta un fondo marino sabbioso e roccioso, con profondità da 0,5 a 3 m.

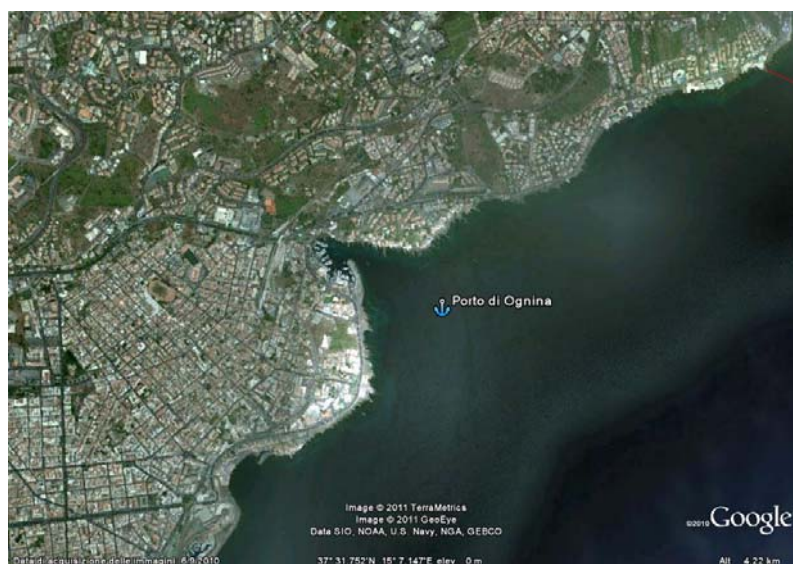
Il porto di Ognina (Fig. 22), anche chiamato porto Ulisse, si trova nell'omonima borgata nella periferia nord della città di Catania. Il porto ricavato da un'insenatura nella scogliera rocciosa si trova circa 3 miglia a nord-est del Porto di Catania ed è protetto da un molo foraneo di oltre 150

m e un molo interno più piccolo e vari pontili galleggianti. I fondali vanno da 1,5 a 12 metri di profondità e sono fangosi nella parte più interna e rocciosi verso l'esterno.

Fig. 21 Foto satellitare con vista del Porto di Sferracavallo



Fig. 22 Foto satellitare con vista del Porto di Ognina



Il porto di Porto Palo di Capo Passero (Fig. 23) si trova nell'omonimo comune all'estrema punta a sud est della provincia di Siracusa. E' racchiuso tra due moli, il Molo di sopraflutto, in parte banchinato con due bracci orientati rispettivamente a SE e a ENE e il Molo di sottoflutto, orientato per SSE che termina con una scogliera per SE.

Fig. 23 Foto satellitare con vista del Porto di Portopalo di Capo Passero



3.2.2 CARATTERIZZAZIONE DELLE AREE DI STUDIO

Inizialmente è stato effettuato un campionamento dei sedimenti nei tre porti scelti al fine di caratterizzare l'ambiente in funzione della concentrazione dei metalli pesanti presenti. I campioni di sedimento, raccolti tra il mese di settembre e novembre tramite la *benna Van Veen*, sono stati analizzati successivamente.

Il campionamento è avvenuto in tre siti, ovvero nel porto di Sferracavallo (in due zone diverse), nel porto di Ognina e nel porto di Portopalo.

I campioni di sedimento prelevati con la benna sono stati posti all'interno di contenitori di vetro scuro e conservati a -20°C per le successive analisi di laboratorio.

Da ciascun campione di sedimento sono stati eliminati i corpi grossolani presenti per poi essere 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.

Su ciascun campione di sedimento è stata condotta la determinazione dei metalli, 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: cadmio (Cd), rame (Cu), zinco (Zn), piombo (Pb), arsenico (As), cromo (Cr) e nichel (Ni).

3.2.3 SITING/SURVEY

Durante la fase di siting sono state svolte indagini sulla presenza/assenza della specie oggetto di studio in aree vicine a quelle scelte per l'impianto.

Dopo aver individuato le aree in base alle conoscenze acquisite, si è proseguito con i sopralluoghi dei siti, ritenuti idonei per il rinvenimento della specie.

Sono stati effettuati diversi sopralluoghi all'interno dell'Area Marina Protetta di Capo Gallo-Isola delle Femmine, nell'Area Marina Protetta Isole Ciclopi e lungo la costa tra la Riserva Naturale Orientata di Vendicari e Porto Palo di CapoPassero.

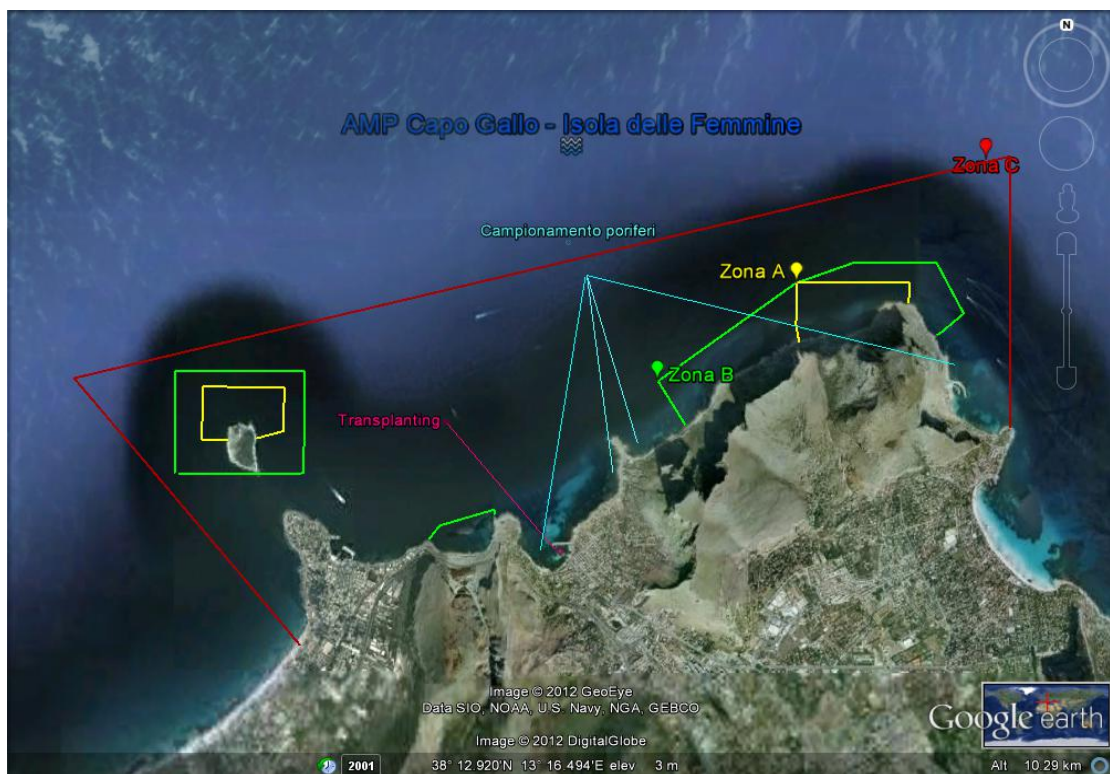
Il lavoro è stato effettuato in immersione con autorespiratore ad aria (A.R.A.) da -2 m a 10 m seguendo una direzione parallela alla costa.

AMP Capo Gallo – Isola delle Femmine

Sono state effettuate immersioni con gruppo A.R.A. nella zona "C" della Riserva.

Le immersioni sono state effettuate nel tratto di mare dell'area portuale di Sferracavallo, dalla profondità di - 3m a - 15m, lungo la costa ad est e a ovest di punta Barcarello, dalla profondità di -2m a -10m e nel tratto di mare nel margine est dell'Area Marina Protetta, dalla profondità di -2m a -15 m, in prossimità del porticciolo della Motomar.

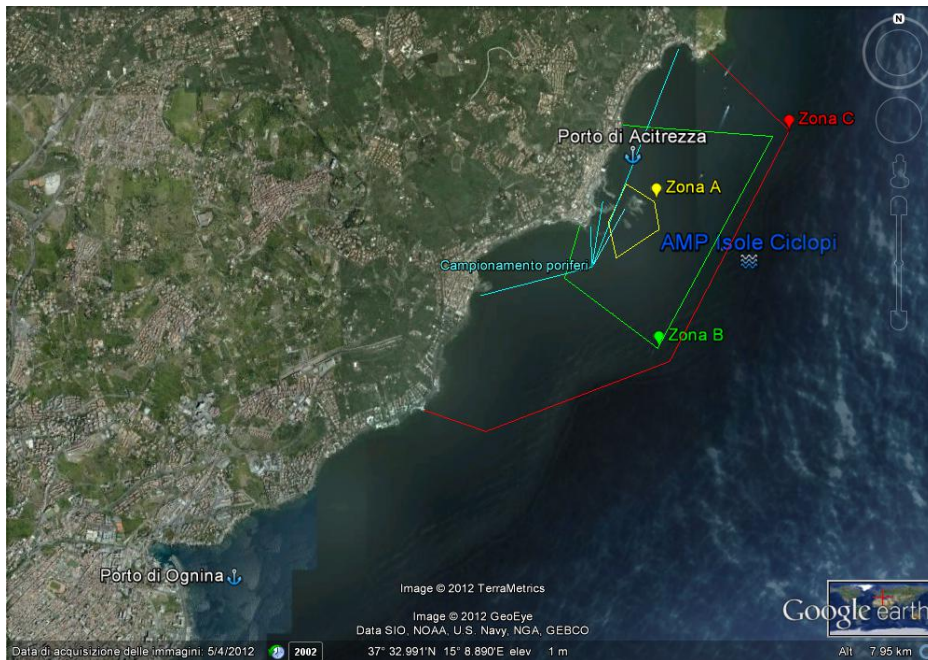
Fig. 24 Foto satellitare con vista dell'AMP Capo Gallo-Isola delle Femmine



AMP Ciclopi e costa catanese

Anche in questo caso l'attività è stata svolta in immersione con gruppo A.R.A. in varie zone dell'AMP.

Fig. 25 Foto satellitare con vista dell'AMP Capo Gallo-Isola delle Femmine

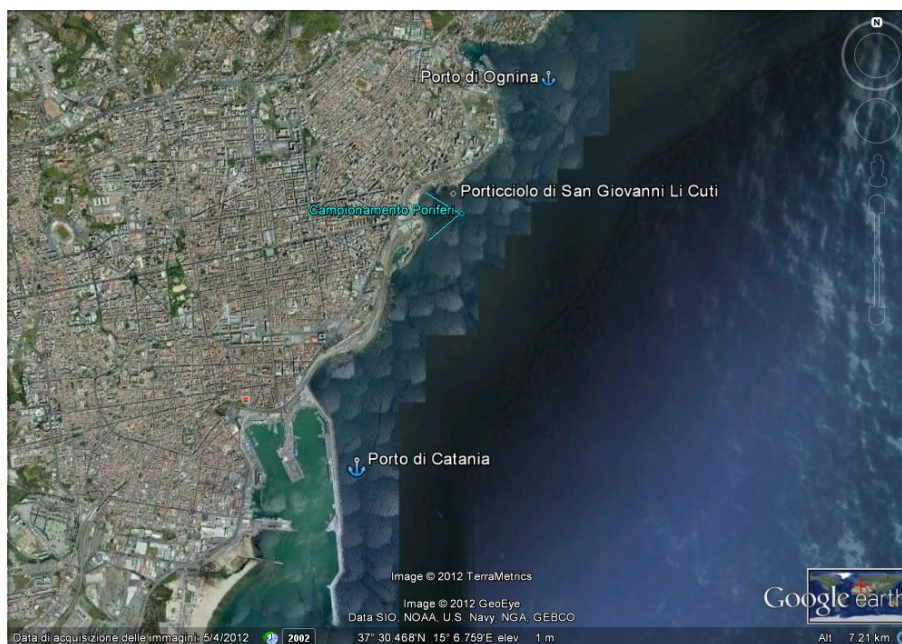


Un primo sopralluogo è stato svolto lungo la parete dell'Isola Lachea (Zona A), coprendo tutti i lati, dai -2m ai -10m di profondità.

Altre immersioni sono state effettuate in zona B, all'interno del porto di Acitrezza e lungo la costa prospiciente i faraglioni, mentre in zona C, lungo la parete sud del promontorio di Acicastello ed in prossimità del porticciolo di Capo Mulini.

A sud dell'AMP è stata verificata la presenza/assenza della specie anche in prossimità del porto di Ognina, ovvero a sud, tra la borgata di San Giovanni Li Cuti e il porto Catania.

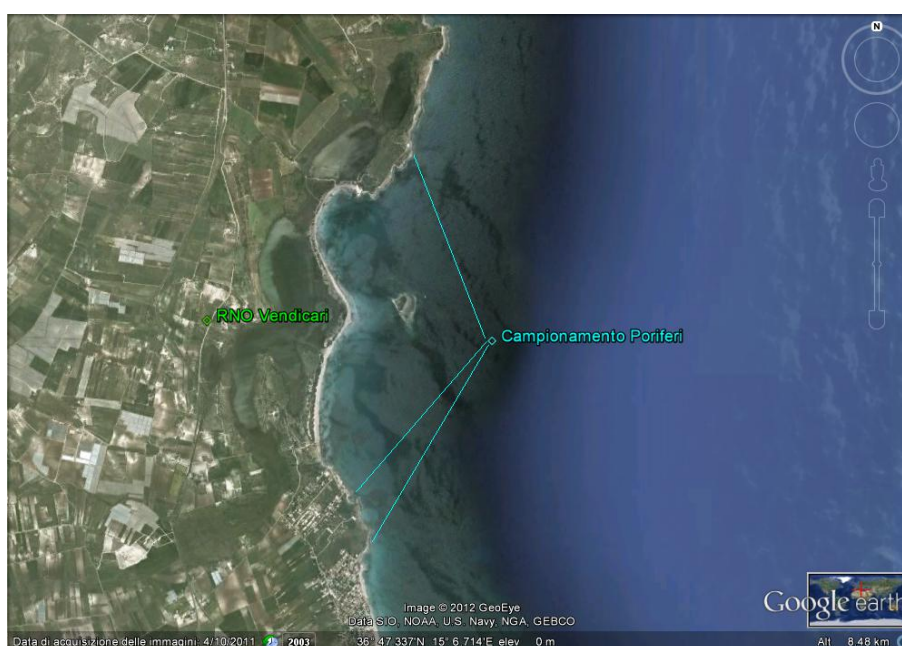
Fig. 26 Foto satellitare con vista della località di San Giovanni Li Cuti (CT)



Tra Vendicari e Porto Palo

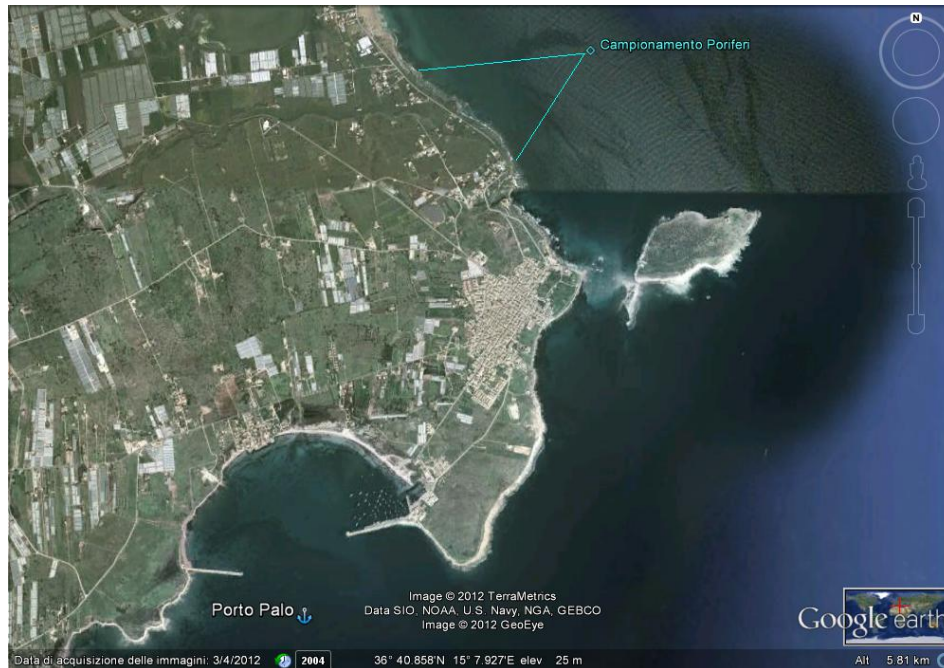
Anche le immersioni svolte nella Sicilia sud-orientale sono avvenute con autorespiratore a profondità variabili tra i -2m e -10m.

Fig. 27 Foto satellitare con vista della costa di Vendicari (SR)



I sopralluoghi sono stati effettuati, lungo la costa rocciosa a nord della Tonnara della RNO di Vendicari, a sud della Riserva naturale nelle località di San Lorenzo e del Bue Marino di Marzamemi e nella costa rocciosa a nord di Portopalo.

Fig. 28 Foto satellitare con vista della costa di Porto Palo di Capo Passero



3.2.4 PRELIEVO ORGANISMI E METODICHE ANALITICHE

Dopo aver effettuato le indagini di controllo sulla presenza o assenza della specie, non avendo rinvenuto il porifero ricercato lungo la costa catanese, si è proceduto a raccogliere gli organismi, scegliendo due siti di prelievo, vista l'abbondanza rilevata, modificando il piano originario e scegliendo di impiantare le strutture sommerse soltanto in due siti portuali (Sferracavallo e Portopalo di Capo Passero).

Il prelievo, destinato all'impianto nel porto di Sferracavallo, è avvenuto nel tratto di mare in zona C dell'AMP Capo Gallo – Isola delle Femmine, in prossimità del porticciolo turistico della Motomar, nel confine est dell'Area Protetta.

Il prelievo, destinato all'impianto nel porto di Porto Palo di Capo Passero, è avvenuto nel tratto di mare del Bue Marino di Marzamemi (Comune di Pachino).

Come da disegno sperimentale, la raccolta ha comportato una serie di attività sul campo e di laboratorio collegate, da effettuare in alcuni casi entro poche ore.

Considerato che il piano sperimentale ha previsto una durata d'impianto nel sito contaminato di 5 mesi e la collocazione di 15 organismi per ogni struttura sommersa (una per sito prescelto), partendo dai siti di prelievo, sono stati presi in considerazione un totale di 30 esemplari della specie oggetto d'indagine, per ciascun sito, divisi in 2 lotti di cui un lotto controllo assoluto o *C* e un *transplant* o *Tn*.

Il lotto controllo assoluto, costituito da 15 esemplari è stato posizionato nel sito originario, mentre l'altro, anche questo composto da 15 esemplari, è stato trasportato fino a destinazione.

Gli esemplari campionati sono stati rimossi dal loro substrato, delicatamente, facendo attenzione a non danneggiare il corpo dell'animale. Tutti gli esemplari da utilizzare per condurre il singolo *transplant* sono stati selezionati con simili dimensioni.

L'esperimento è stato ripetuto per 3 volte su ciascun sito in stagioni diverse.

Il primo esperimento di impianto sia nel Porto di Sferracavallo, sia nel Porto di Portopalo è avvenuto nel mese di ottobre ed ha previsto la durata di 5 mesi (ottobre-marzo), sebbene, in entrambi i siti, sia stato interrotto a causa della mortalità delle spugne. Il secondo esperimento, realizzato in entrambi i siti, è stato avviato nel mese di aprile, prevedendo una durata di 5 mesi

(aprile-settembre), ma anche in questo caso è terminato prima del tempo. Il terzo esperimento, alla luce dei precedenti risultati, si è attuato in entrambi i siti nel mese di giugno e si è concluso dopo 1 mese.

I – II - III Esperimento sito di Sferracavallo

Prelievo organismi

Il prelievo è avvenuto in immersione con autorespiratore (ARA) e gli organismi sono stati raccolti alla profondità di -3 m in previsione dell'impianto alla stessa profondità.

Gli animali sono stati staccati delicatamente dal substrato manualmente e immediatamente conservati in contenitori colmi di acqua marina.

Il primo campionamento si è svolto in funzione del trapianto nel porto di Sferracavallo.

Sono stati prelevati 3 individui, per la prima analisi di metalli pesanti, 15 individui per il trapianto in situ (controllo) e 15 individui per il trapianto nel porto.

Trasporto

Nel caso del trapianto in situ, l'operazione è stata svolta senza sottoporre gli organismi ad alcuno stress, mentre il trasporto dal sito del prelievo a quello del trapianto, ovvero al porto di Sferracavallo, è durato 30min, mantenendo gli animali in una vasca colma d'acqua di mare, refrigerata, con il ghiaccio per mantenere la temperatura di 13 C°, e, ossigenata. Gli altri 3 individui da analizzare sono stati conservati in ghiaccio, durante il trasporto, e poi conservati a -20° in laboratorio.

I – II - III Esperimento sito di Porto Palo

Prelievo organismi

Dopo pochi giorni, così come per il lotto Tn destinato al porto di Sferracavallo, anche il lotto Tn, di 15 individui, destinato all'impianto nel porto di Porto Palo, è stato prelevato dal sito scelto (Bue Marino) alla profondità di -3 m.

Anche in questo caso, sono stati prelevati 3 individui, per la prima analisi di metalli pesanti, 15 individui per il trapianto in situ (controllo) e 15 individui per il trapianto nel porto. Così come avvenuto a Sferracavallo, gli animali sono stati staccati delicatamente dal substrato manualmente e immediatamente trasferiti in una vasca refrigerata e ossigenata.

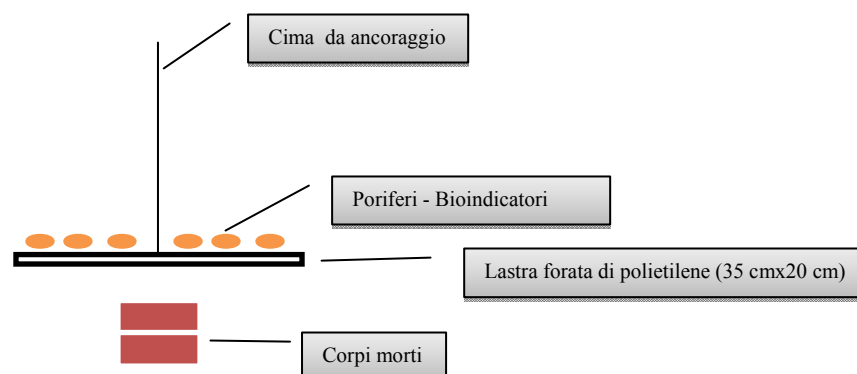
Trasporto

Il trasporto dal sito del prelievo a quello del trapianto, ovvero al porto di Porto Palo, è durato 30 minuti, mantenendo gli animali in una vasca colma d'acqua di mare, refrigerata, con il ghiaccio per mantenere la temperatura di 13 C°.

3.2.5 TRAPIANTO E METODICHE ANALITICHE

Gli organismi, imprigionati da una rete, sono stati inseriti in una struttura rigida e piatta facilmente rimovibile dal fondale con l'utilizzo di una sagola, che ha permesso di lavorare dalla superficie, non essendo consentite immersioni nelle aree portuali.

Fig. 29 Struttura per l'impianto in mare delle spugne



Come precedentemente detto, sono state effettuate tre serie di trapianti. Il lotto controllo C composto da 15 individui è stato posizionato all'interno del sito del prelievo, mentre il Tn è stato impiantato lungo la parete della banchina di ciascun porto scelto.

Arrivati sul posto, gli organismi sono stati inseriti nella struttura ideata per l'impianto e sommersi alla profondità di -3m nella banchina principale del porto.

3.2.6 MONITORAGGIO E CONTROLLO

Il controllo della quantità di metalli pesanti accumulati sarebbe dovuto avvenire nell'arco di 5 mesi, ovvero dopo la prima settimana Tempo 0, per monitorare gli organismi nella prima fase di adattamento, dopo 1 mese dal primo monitoraggio e successivamente ogni due mesi dall'ultimo controllo, sia nel lotto C sia in quelli Tn, asportando dalla gabbia 3 repliche per ciascun lotto.

In tutti i siti sono stati svolti controlli in tempi diversi da quelli programmati: il primo, dopo 1 settimana; il secondo dopo 15 gg dal Tempo 0; il terzo dopo 3 settimane.

I monitoraggi negli impianti controllo C, nei due siti di prelievo, sono stati realizzati dopo 6 gg dal Tempo 0.

4. RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 ESPERIMENTI IN VITRO DI ESPOSIZIONE A METALLI PESANTI - TEST CONDOTTI SU

CHONDRILLA NUCULA

Come indicato nel capitolo Materiali e Metodi, questa fase della ricerca, ha riguardato in primo luogo la caratterizzazione del sito dove è avvenuto il prelievo dei campioni da trattare, secondariamente l'analisi degli organismi di *C.nucula* presenti sul sito e prelevati per la realizzazione di test in condizioni di laboratorio con acqua marina artificiale in presenza di concentrazioni note di Cd, Cu e Pb. Nei campioni trattati è stato valutato l'accumulo dei metalli pesanti, la risposta degli organismi attraverso le indagini sui biomarkers e le modificazioni morfostrutturali.

4.1.1 CARATTERIZZAZIONE DEL SITO DI PRELIEVO

Il sito di prelievo presenta sedimenti con un contenuto di metalli estremamente. Nelle tabelle seguenti sono indicate le medie delle concentrazioni ottenute dalla lettura dei campioni di sedimento e le medie dei valori dei parametri chimico-fisici misurati nei campioni di acqua prelevati.

Tab. 5 Concentrazioni dei metalli pesanti (mg/Kg) presenti nel sedimento del sito di raccolta poriferi

Siti di campionamento	Latitudine	Longitudine	Profondità (m)	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	As
AMP Plemmirio	37° 0'37.43"N	15° 18'27.54"E	2,3	0,102	3,415	1,871	6,991	5,153	2,194	1,045

Tab. 6 Concentrazioni dei metalli pesanti (mg/Kg) presenti nell'acqua marina del sito di raccolta poriferi

Siti di campionamento	Latitudine	Longitudine	Profondità (m)	pH	T	Salinità	DO	NO ₂	NO ₃
AMP Plemmirio	37° 0'37.43"N	15°18'27.54"E	2,3	8,1-8,3	16-21 °C	38-38,6%	>5mg/l	-	-

4.1.2 SITING/SURVEY

All'interno dell'Area Marina Protetta del Plemmirio, la specie è stata rinvenuta in zona A, in zona B ed in zona C, presente su rocce da circa 2 m di profondità a circa 12 m.

In particolare in zona A, dove la costa si presenta con la scarpata, la specie è presente dagli 8 m ai 14 m di profondità, nella zona B, dove la costa degrada dolcemente la specie è presente a ca 30 m di distanza dal litorale e a profondità variabili a partire dai 2 metri di profondità.

4.1.3 ANALISI DEI CAMPIONI CONTROLLO

Nelle tabelle successive si evidenziano i dati relativi alle concentrazioni dei tre metalli (Cd, Cu e Pb) presenti nel corpo dei campioni controllo, prelevati dal sito del Plemmirio.

Tab. 7 Concentrazioni di Cd, Cu e Pb presenti nei poriferi campionati nel sito di prelievo

Cd mg/Kg	Cu mg/Kg	Pb mg/Kg
0,086532114	1,294407243	0,104498727
0,084527799	1,565449353	0,140940594
0,085797711	1,59912793	0,084294947
0,07333474	1,452718576	0,087915875
0,067606442	1,545368403	0,097862667
0,062784069	1,319628868	0,112968277

4.1.4 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DEI METALLI PESANTI NELLE ACQUE DEL TRATTAMENTO

Le analisi condotte mediante ICP-MS sui campioni di acqua contaminata delle vaschette controllo di ciascuna serie di esperimenti, hanno rilevato che la concentrazione nominale corrisponde alla media delle concentrazioni del metallo nelle acque all'inizio dell'esperimento e che la media delle concentrazioni dello stesso metallo nelle acque campionate all'inizio dell'esperimento è pressoché uguale alla media delle concentrazioni presenti nelle acque campionate alla fine dell'esperimento.

Fig. 30

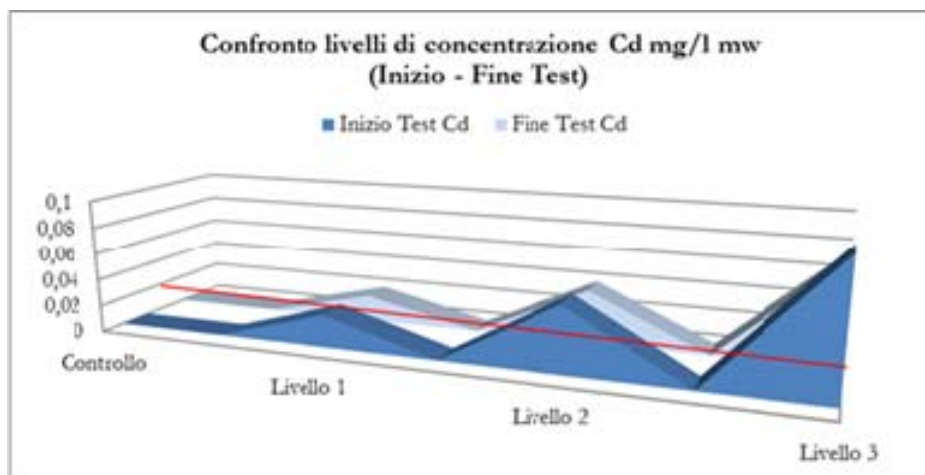


Fig. 31

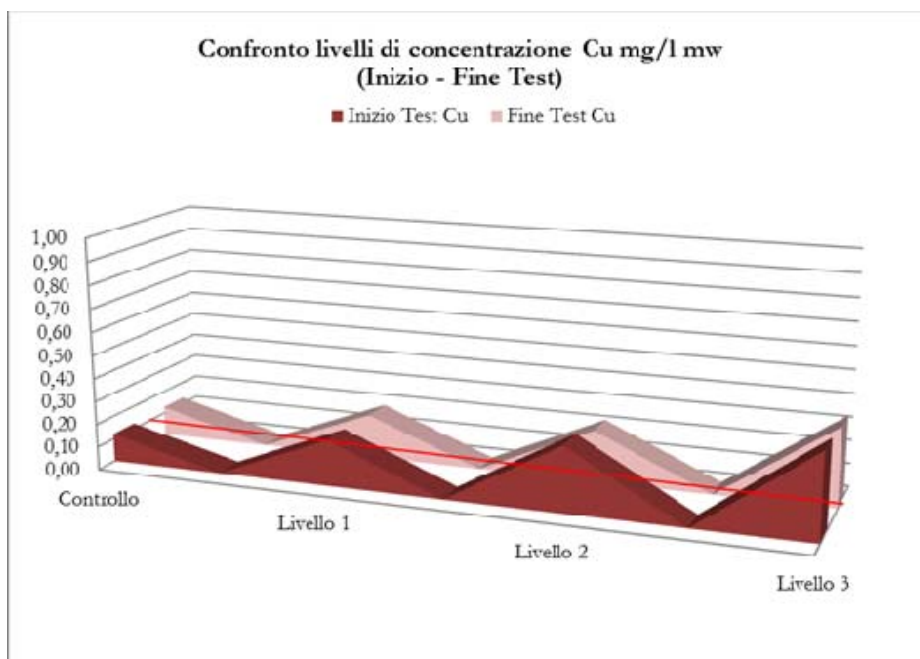
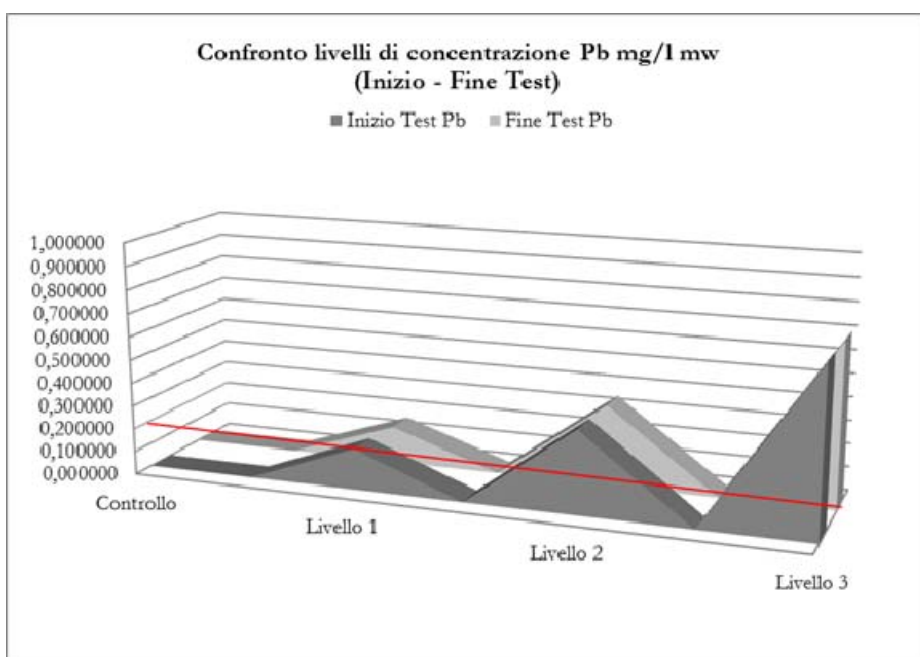


Fig. 32



In tabella 8 sono riportati i valori della concentrazione dei metalli in ppm presenti nell'acqua delle diverse vaschette all'inizio dei trattamenti, dove con il codice esperimento 0 si intende il

livello di metallo presente nell'acqua marina artificiale, non inquinata ed usata nelle vaschette B1 e B2 contenenti gli esemplari incontaminati, ovvero i due controlli di ogni esperimento.

Il codice 1 indica il 1° livello di contaminazione dell'acqua per ogni metallo, ovvero 0,02 mg/l di Cd, 0,1 mg/l di Cu e 0,2 mg/l di Pb, corrispondenti alle concentrazioni immesse nell'acqua iniziale, contenente i metalli in valori presenti in natura in condizioni ottimali.

Il codice 2 indica il 2° livello di contaminazione dell'acqua, ovvero i valori corrispondenti al doppio della concentrazione del codice 1, mentre il codice 3 indica il 3° livello di contaminazione con valori pari a quattro volte il codice 1.

Nel caso dell'acqua marina artificiale contaminata con il Rame si nota che essendo questo metallo un elemento più abbondante rispetto agli altri nell'acqua marina, in quanto costituente essenziale per la vita di molti organismi, la concentrazione di partenza (codice 0) presente nell'acqua marina artificiale è pari a 0,1 mg/l, pertanto l'aggiunta di ulteriore sale del metallo (equivalente al 1° livello, ovvero alla concentrazione limite di emissione stabilita dal D.L. 152/2006) ha provocato l'aumento della concentrazione nei vari livelli di c.a. 0,1 mg/l. Ciò non ha compromesso l'esperimento in quanto lo scopo è stato quello di simulare l'immissione di concentrazioni elevate di metalli pari a quelle consentite dalla Legge, esattamente il doppio e equivalenti a quattro volte la concentrazione limite, ricreando le condizioni di ambienti marini altamente degradati e inquinati da HM.

Tab. 8 Concentrazioni di Cd, Cu e Pb rivelate dall'analisi delle acque usate per i test di esposizione

Codice esperimento	Livelli Cd (mg/l di acqua)	Livelli Cu (mg/l di acqua)	Livelli Pb (mg/l di acqua)
0	0,00014	0,11361	0,00032
0	0,00018	0,11797	0,00039
0	0,00006	0,13508	0,00096
0	0,00021	0,11574	0,00032
0	0,00011	0,11905	0,00039
0	0,00014	0,12413	0,00096
0	0,00014	0,11361	0,00032
0	0,00018	0,11797	0,00039
0	0,00006	0,13508	0,00096
0	0,00021	0,11574	0,00032
0	0,00011	0,11905	0,00039
0	0,00014	0,12413	0,00096
0	0,00014	0,11361	0,00032
0	0,00018	0,11797	0,00039
0	0,00006	0,13508	0,00096
0	0,00021	0,11574	0,00032
0	0,00011	0,11905	0,00039
0	0,00014	0,12413	0,00096

Segue Tab. 8

Codice esperimento	Livelli Cd (mg/l di acqua)	Livelli Cu (mg/l di acqua)	Livelli Pb (mg/l di acqua)
1	0,02282	0,2044	0,17698
1	0,02334	0,19659	0,18116
1	0,02628	0,19379	0,17056
1	0,01997	0,18686	0,17698
1	0,01895	0,19592	0,18116
1	0,01923	0,19084	0,17056
1	0,02282	0,2044	0,17698
1	0,02334	0,19659	0,18116
1	0,02628	0,19379	0,17056
1	0,01997	0,18686	0,17698
1	0,01895	0,19592	0,18116
1	0,01923	0,19084	0,17056
1	0,02282	0,2044	0,17698
1	0,02334	0,19659	0,18116
1	0,02628	0,19379	0,17056
1	0,01997	0,18686	0,17698
1	0,01895	0,19592	0,18116
1	0,01923	0,19084	0,17056

Segue Tab. 8

Codice esperimento	Livelli Cd (mg/l di acqua)	Livelli Cu (mg/l di acqua)	Livelli Pb (mg/l di acqua)
2	0,0487	0,27888	0,36723
2	0,04904	0,28695	0,34463
2	0,04717	0,27866	0,3585
2	0,03906	0,26128	0,36723
2	0,03886	0,2545	0,34463
2	0,03934	0,265	0,3585
2	0,0399827	0,27888	0,36723
2	0,0487	0,28695	0,34463
2	0,04904	0,27866	0,3585
2	0,04717	0,26128	0,36723
2	0,03906	0,2545	0,34463
2	0,03906	0,265	0,3585
2	0,0499838	0,27888	0,36723
2	0,04665522	0,28695	0,34463
2	0,040029898	0,27866	0,3585
2	0,0487	0,26128	0,36723
2	0,04904	0,2545	0,34463
2	0,04717	0,265	0,3585

Segue Tab. 8

Codice esperimento	Livelli Cd (mg/l di acqua)	Livelli Cu (mg/l di acqua)	Livelli Pb (mg/l di acqua)
3	0,09766	0,37301	0,71605
3	0,09686	0,36372	0,72792
3	0,09198	0,36713	0,70453
3	0,07708	0,40459	0,71605
3	0,07589	0,42795	0,72792
3	0,07629	0,41906	0,70453
3	0,09198	0,37301	0,71605
3	0,07708	0,36372	0,72792
3	0,07589	0,36713	0,70453
3	0,09198	0,40459	0,71605
3	0,07708	0,42795	0,72792
3	0,07589	0,41906	0,70453
3	0,09198	0,37301	0,71605
3	0,07708	0,36372	0,72792
3	0,07589	0,36713	0,70453
3	0,09198	0,40459	0,71605
3	0,07708	0,42795	0,72792
3	0,07589	0,41906	0,70453

4.1.5 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DEI METALLI PESANTI NEI CAMPIONI ESPOSTI

Le analisi condotte mediante ICP-MS sugli esemplari contaminati hanno evidenziato una elevata capacità di accumulo di metalli nel corpo degli animali, strettamente correlata con la concentrazione presente nell'acqua.

Tabella 9. Statistica descrittiva, test di Fischer e ANOVA Univariata dei livelli di esposizione per singolo metallo.

		N	Media	Dev. Std.	Minimo	Massimo	F	ANOVA Sig.
Cd mg/Kg	Controllo	18	0,170	0,055	0,081	0,283	785	p<0,001
	Livello 1	18	0,866	0,068	0,714	0,999		
	Livello 2	18	1,222	0,129	1,003	1,483		
	Livello 3	18	2,206	0,204	2,002	2,788		
Cu mg/Kg	Controllo	18	1,503	0,314	1,089	2,567	105	p<0,001
	Livello 1	18	8,589	1,961	4,866	12,09		
	Livello 2	18	13,01	3,283	7,461	19,93		
	Livello 3	18	21,24	5,678	11,26	32,90		
Pb mg/Kg	Controllo	18	0,115	0,026	0,084	0,169	303	p<0,001
	Livello 1	18	3,707	1,046	2,402	5,884		
	Livello 2	18	7,696	1,891	5,004	11,34		
	Livello 3	18	15,34	2,338	10,05	19,04		

Difatti, dalla tabella 9 si evince che, per tutti i metalli considerati, la significatività delle differenze rilevate dall'analisi dei campioni esposti al 1° livello, al 2° livello ed al 3° livello di contaminazione è molto alta con un indice $p < 0,001$. Ciò, a conferma dell'ipotesi di partenza, ovvero dell'efficienza della specie di iper-accumulare HM anche in ambienti fortemente degradati.

Relativamente agli esperimenti realizzati esponendo le spugne ai tre diversi livelli di concentrazione di Cadmio, sono riportati nella tabella seguente i valori relativi alle concentrazioni accumulate dagli esemplari per ciascun livello di concentrazione di esposizione al metallo, dove con livello 0 si indica la concentrazione del metallo presente nell'acqua marina non contaminata.

Tab. 10 Analisi della concentrazione di Cd presente nelle spugne trattate

Livelli di esposizione alle 3 concentrazioni di metallo				
	Livello 0	Livello 1	Livello 2	Livello 3
Cd mg/Kg	0,214736842	0,867732397	1,259144822	2,094879833
	0,242325581	0,882708526	1,275016377	2,117221277
	0,170934579	0,872089771	1,166707911	2,175901685
	0,236641221	0,893444477	1,271253325	2,149662927
	0,283349515	0,86996152	1,227623911	2,008186836
	0,147765152	0,840906686	1,107397232	2,029977222
	0,167987805	0,982776632	1,348566332	2,199727892
	0,120235849	0,829873663	1,29983744	2,788399202
	0,117330097	0,78266499	1,111998727	2,388466883
	0,090792079	0,900288333	1,349772993	2,387340388
	0,117937853	0,837748992	1,288668288	2,001883892
	0,207958183	0,99928873	1,152778399	2,117382923
	0,081273218	0,788938774	1,482669322	2,225246627
	0,128974567	0,811277383	1,002984388	2,019288377
	0,158345669	0,911288222	1,299377829	2,488272222
	0,20008909	0,899382822	1,028736733	2,192882992
	0,190000837	0,90002833	1,299288202	2,299222322
0,189346895	0,71399222	1,029983822	2,028874773	

Le concentrazioni di Cd accumulate nelle spugne nei tre livelli di esposizione e nei controlli sono risultati significativamente differenti come indicato dal risultato dell'ANOVA Univariata ($F=785$; $p<0.001$) (Tab. 9) e rappresentate graficamente tramite Box Plot in Fig. 33.

Le dosi accumulate nelle spugne inoltre aumentano proporzionalmente all'aumentare dei livelli di esposizione come evidenzia il risultato della correlazione di Pearson ($R= 0.967$, $p<0.001$), e la regressione lineare in Fig. 34.

Considerato che il Cadmio è un elemento tossico anche a basse concentrazioni, la capacità da parte della specie studiata di accumulare il metallo pesante apre nuove prospettive nel campo del biomonitoraggio e della conservazione dell'ambiente marino.

Fig. 33 Box-Plot per i vari livelli di esposizione di Cd

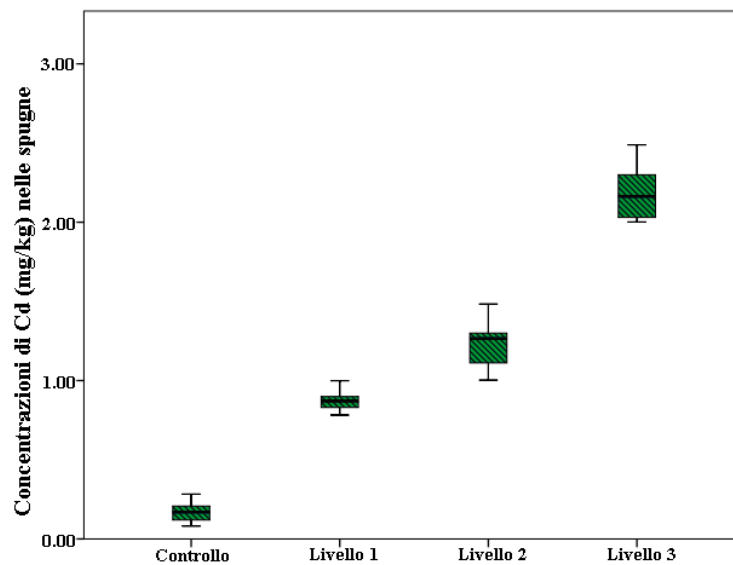
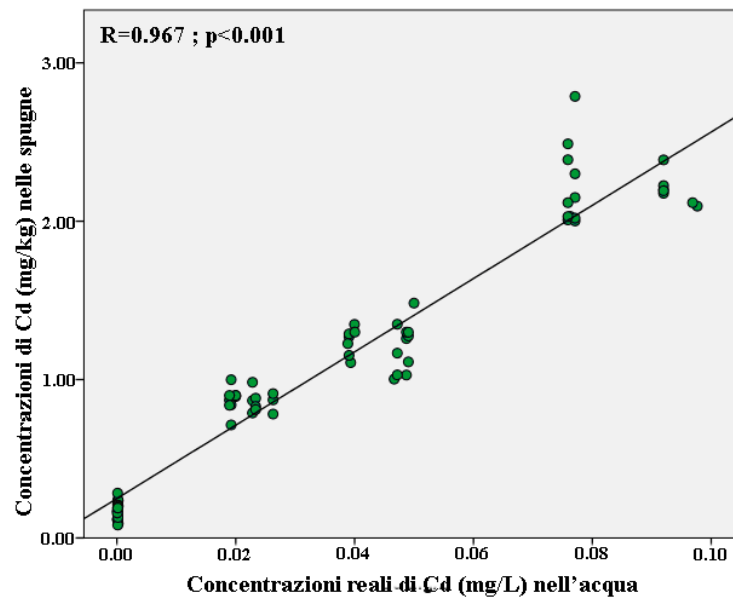


Fig. 34 Regressione Lineare tra le concentrazioni di Cd nelle spugne e i livelli di esposizione reali nell'acqua.



I risultati degli esperimenti realizzati esponendo le spugne ai tre diversi livelli di concentrazione di Rame, sono riportati nella tabella seguente con i valori relativi alle concentrazioni accumulate dalle spugne per ciascun livello di concentrazione di esposizione al metallo.

Come nel caso precedente, il livello 0 corrisponde alla concentrazione del metallo presente in ambienti incontaminati e, come indicato precedentemente nella tabella 8, corrisponde al valore di c.a. 0,1 mg/l.

Quanto detto è anche evidenziato in figura 36, da dove emerge la correlazione tra le concentrazioni di Cu presenti nell'acqua e le concentrazioni rivelate nelle spugne.

Tab. 11 Analisi della concentrazione di Cu presente nelle spugne trattate

Livelli di esposizione alle 3 concentrazioni di metallo				
	Livello 0	Livello 1	Livello 2	Livello 3
Cu mg/Kg	1,32624082	9,902163309	19,92623808	25,61004886
	1,402083203	9,340050213	17,2504179	19,03097519
	1,28781518	10,89305104	10,17465497	11,26180209
	1,679100726	7,506008011	14,76804893	18,61105235
	1,248370881	8,99822497	10,97768423	13,86097011
	1,088741722	6,923107178	7,461393772	19,83415373
	1,659468178	11,44154923	16,18833872	18,53348783
	2,56692367	8,513671798	13,42056829	13,95343686
	1,294407243	4,865945191	17,67503891	25,35626414
	1,565449353	7,012410501	12,95035685	29,67747362
	1,59912793	9,009142452	14,50728902	20,08605153
	1,452718576	12,09257263	9,8837463	32,90311494
	1,545368403	8,203887747	11,2988746	28,9937912
	1,319628868	10,9832747	11,287364	23,765537
	1,641367704	7,99928773	14,2876463	19,988376
	1,354471171	8,299887438	10,827633	18,938874
	1,638467592	6,328847672	9,2663647	20,000872
	1,380070239	6,28837711	11,9987764	21,8877364

Così come per il Cd, anche il Cu accumulato dalle spugne nei diversi livelli di esposizione è significativamente diverso ($F=105$; $p<0.001$) (Tab. 9; Fig. 35) e proporzionalmente crescente, come indicato dal coefficiente di Pearson ($R=902$; $p<0.001$) (Fig. 36).

Il rame, pur essendo un elemento importantissimo per gli organismi marini, in dosi elevate e per lunghi periodi diventa tossico. L'iperaccumulo dimostrato in *C. nucula* rappresenta un fattore di successo per l'uso della specie come bioaccumulatore e bioremediator.

Fig. 35 Box Plot delle concentrazioni di Cu nelle spugne per ogni livello di esposizione.

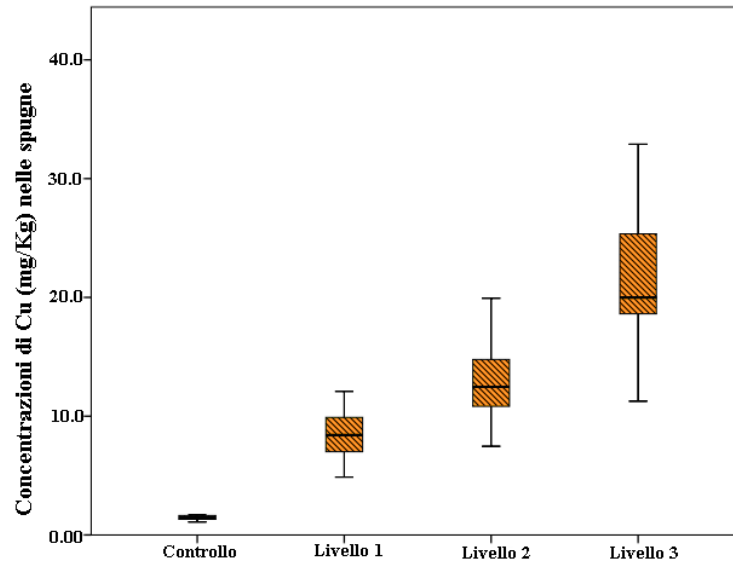
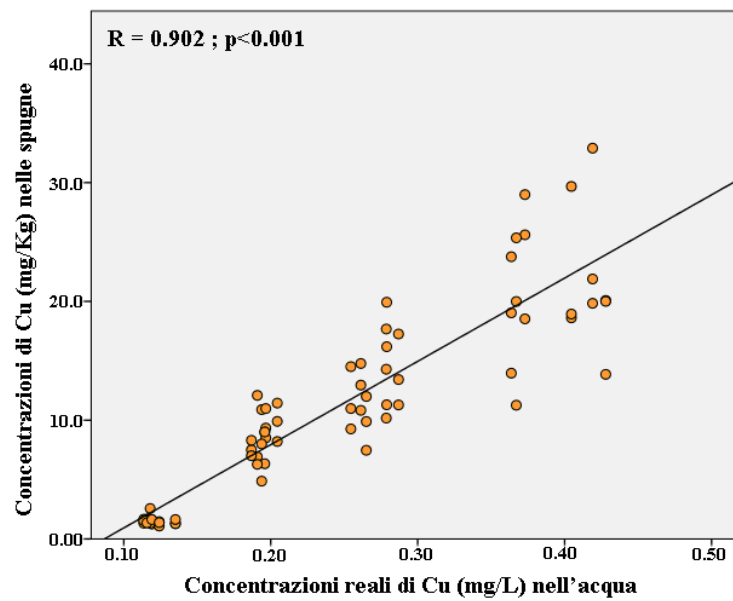


Fig. 36 Regressione Lineare tra le concentrazioni di Cu nelle spugne e i livelli di esposizione reali nell'acqua.



I risultati relativi agli esperimenti realizzati esponendo i poriferi ai tre diversi livelli di concentrazione di Piombo, sono riportati nella tabella seguente e, come nei casi precedenti, rappresentano i valori delle concentrazioni accumulate dalle spugne per ciascun livello di concentrazione di esposizione al metallo.

Tab. 12 Analisi della concentrazione di Pb presente nelle spugne trattate

Livelli di esposizione alle 3 concentrazioni di metallo				
	Livello 0	Livello 1	Livello 2	Livello 3
Pb mg/Kg	0,095586921	5,063209017	5,161564011	16,18669058
	0,104498727	3,282170205	6,572314493	15,33437932
	0,140940594	4,373234562	8,883671618	15,20379622
	0,084294947	5,884007044	9,616435528	15,87117101
	0,087915875	3,443790143	11,33892949	12,78463023
	0,097862667	4,780479346	9,673341049	17,27168434
	0,112968277	5,49744394	9,027242512	13,3484444
	0,153519455	3,298317503	6,661186944	11,28105775
	0,1287455	2,402304014	5,865884903	17,36565294
	0,10376294	2,445652695	5,03726381	10,04948647
	0,12623894	2,579744234	9,563657215	15,92755227
	0,0998273	3,271573088	6,159897831	16,51975484
	0,1690029	4,231578831	6,8273944	19,039984
	0,11109287	2,97130675	7,92749373	18,9387746
	0,1029384	3,8276193	5,0039874	14,884762
	0,1002763	2,8374932	8,4987593	15,20984763
0,0898272	3,4579283	9,3985733	15,977632	
0,16039928	3,0849543	7,3094883	14,99887903	

Le concentrazioni di Pb accumulate in funzione del livello di esposizione sono significativamente diverse ($F = 303$; $p < 0.001$) (Tab. 9, Fig. 37), ed inoltre anche proporzionalmente crescenti, come si evidenzia dal coefficiente di Pearson ($R=963$; $p < 0.001$) (Fig. 38).

Figura 37. Box Plot delle concentrazioni di Pb nelle spugne per ogni livello di esposizione.

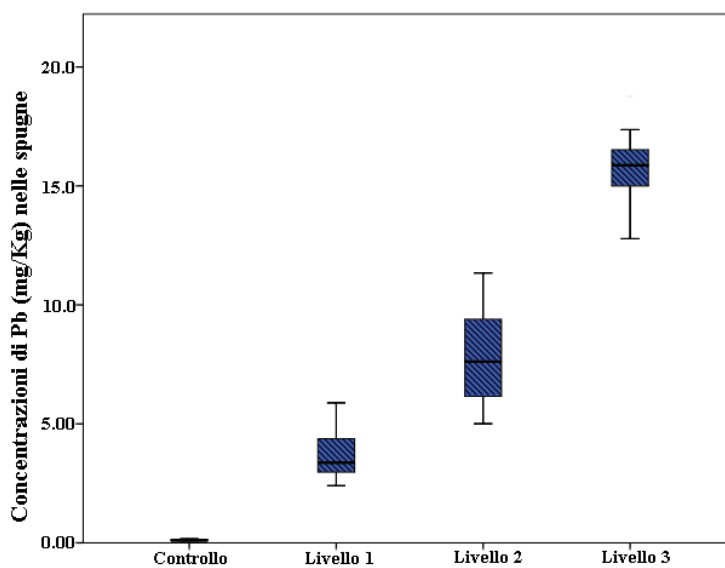
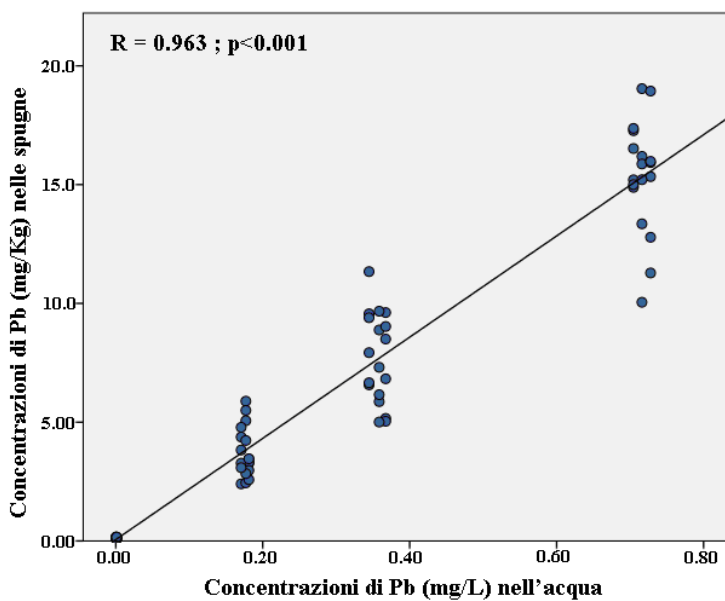


Figura 38. Regressione Lineare tra le concentrazioni di Pb nelle spugne e i livelli di esposizione reali nell'acqua



I risultati raggiunti consentono di affermare che per il Cadmio, per il Rame e per il Piombo, metalli pesanti estremamente tossici per gli organismi, *C. nucula* mostra

un'elevata capacità di accumulazione, che aumenta proporzionalmente all'inquinamento a cui può essere sottoposto un ambiente acquatico.

4.1.6 INDAGINI SULLA RISPOSTA DEGLI ESEMPLARI ESPOSTI A METALLI PESANTI: BIOMARKER E

ANALISI MORFOSTRUTTURALE

A confermare l'efficienza della specie nei processi di accumulo dei metalli pesanti studiati, i risultati ottenuti dalle indagini della risposta degli organismi, attraverso l'analisi delle MTs, hanno mostrato un sistema di detossificazione degli esemplari esposti in relazione alle concentrazioni di Cd e di Pb presenti nell'acqua. I risultati relativi alle metallotioneine sono stati convalidati mediante il metodo del Western blotting e con l'analisi immunostochimica, che hanno rivelato l'espressione delle proteine a concentrazioni medie ed elevate (Livello 2 e Livello 3) dei due metalli, ovvero a concentrazioni superiori di quelle consentite dalla Legge.

L'analisi morfostrutturale non ha evidenziato differenze tra i campioni esposti e gli organismi controllo.

4.1.6a Analisi della risposta degli organismi esposti a concentrazioni elevate di Cadmio

I risultati ottenuti tramite la tecnica Wester Blotting non hanno evidenziato l'espressione delle metallotioneine nel controllo e nel primo livello di esposizione al Cd, ma solo nel secondo e nel terzo livello (Fig. 40b). Dall'analisi densitometrica, l'espressione delle proteine aumenta all'aumentare del livello di concentrazione di metallo nell'acqua, con proporzionalità crescente, come è evidenziato dal coefficiente di Pearson ($R = 0.913$, $p < 0.001$) e dalla regressione lineare rappresentata in figura 39.

Fig. 39 Regressione Lineare tra le concentrazioni di Cd nelle spugne e i livelli di espressione delle MTs per ogni livello di esposizione

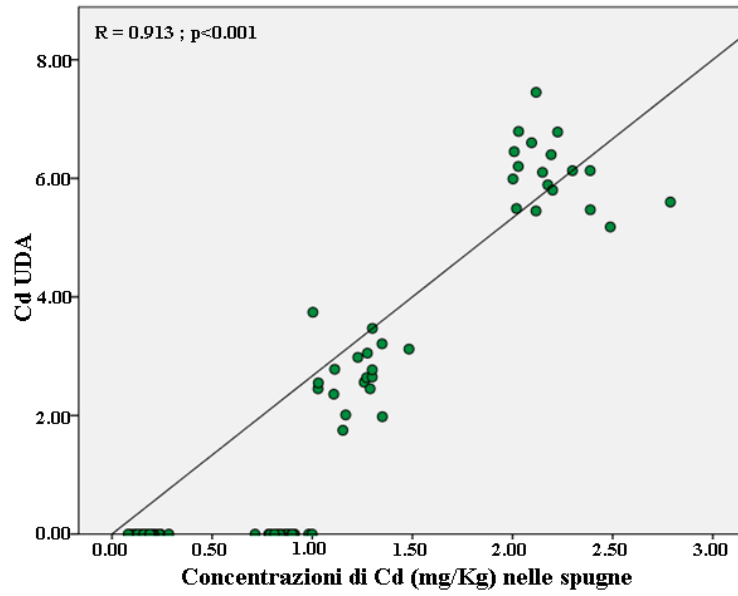


Fig. 40 a Western Blotting – Controllo Actina

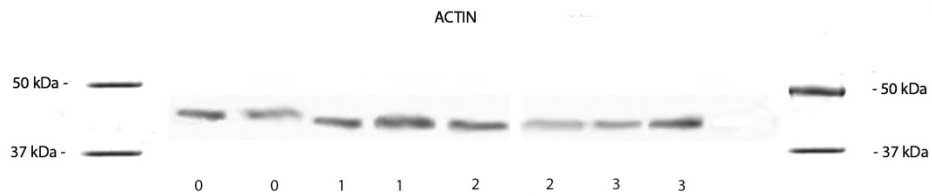
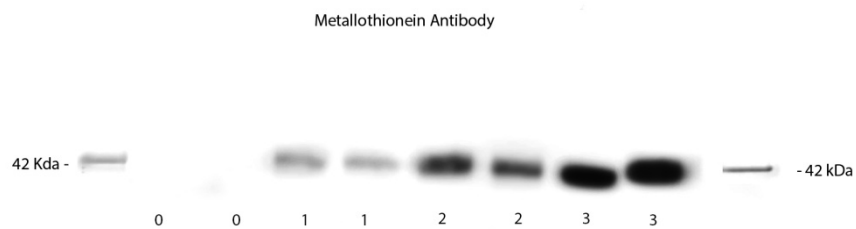


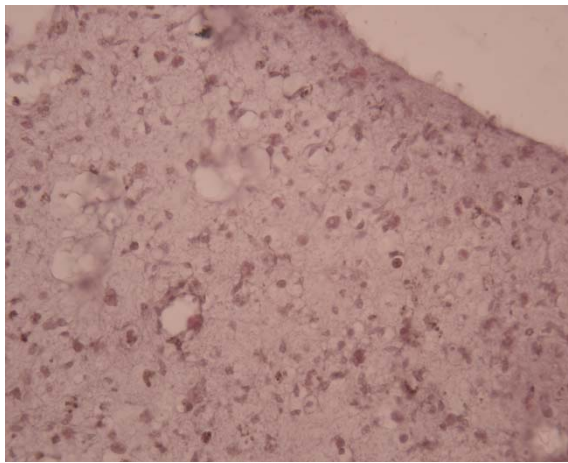
Fig. 40 b Western Blotting – Cd



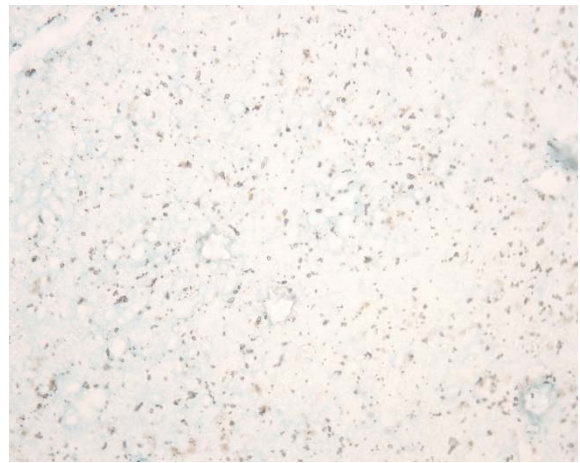
Così come per l'accumulo di Cd nel corpo dell'animale, anche la significatività delle differenze tra l'espressione di proteine negli esemplari esposti al livello 2 e l'espressione delle MTs nei campioni esposti al livello 3 è molto alta, mostrando una capacità detossificante proporzionale al grado di contaminazione dell'acqua.

Figura 41. Sezioni istologiche di *Chondrilla nucula* contaminati con cadmio (livello 2). a)

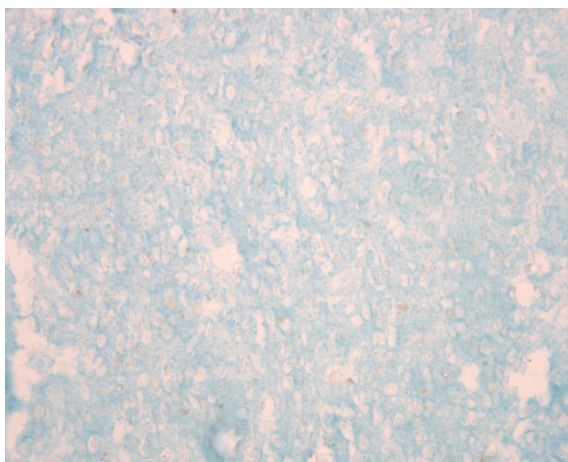
Ematossilina-eosina; b) Alcian blu pH 1; c) Alcian blu pH 2,5; anticorpo anti- MT. 400x



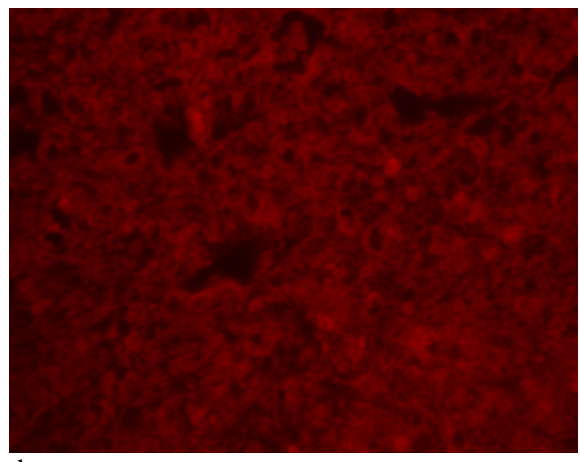
a



b



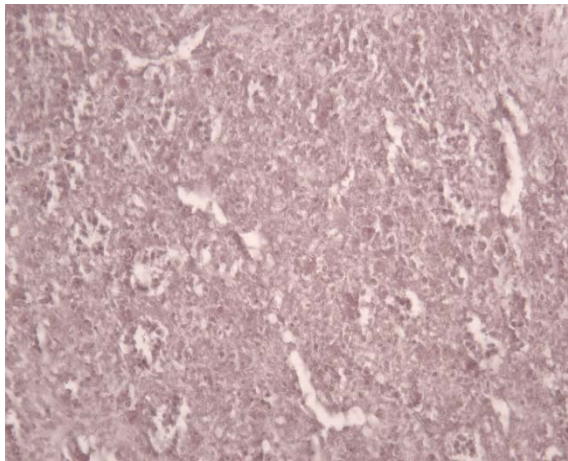
c



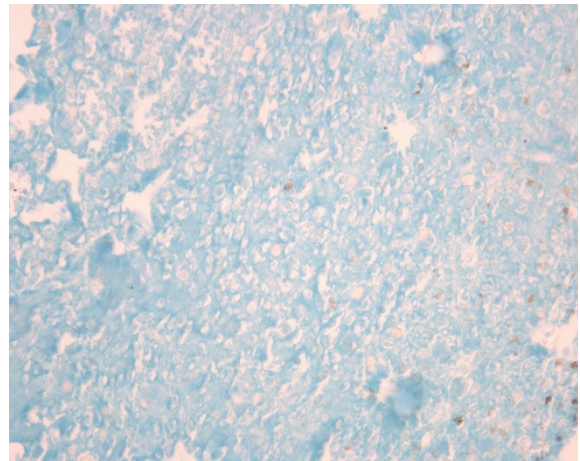
d

E' stato osservato, in studi precedenti, come l'attivazione delle MTs induca l'aumento dei mucopolisaccaridi. Per quanto riguarda l'analisi istochimica è stato evidenziato un aumento dei mucopolisaccaridi acidi solforati e carbossilati nei livelli 2 e 3 (Fig. 41b e 41c; Fig. 42b e 42c).

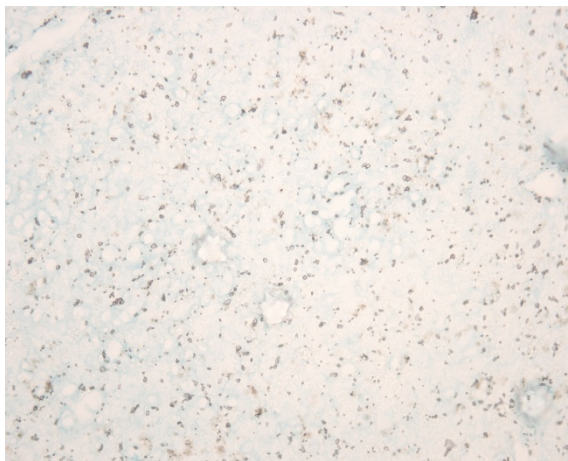
Figura 42. Sezioni istologiche di *Chondrilla nucula* contaminati con cadmio (livello 3). a) Ematossilina-eosina; b) Alcian blu pH 2,5; c) Alcian blu pH 1; anticorpo anti- MT. 400x



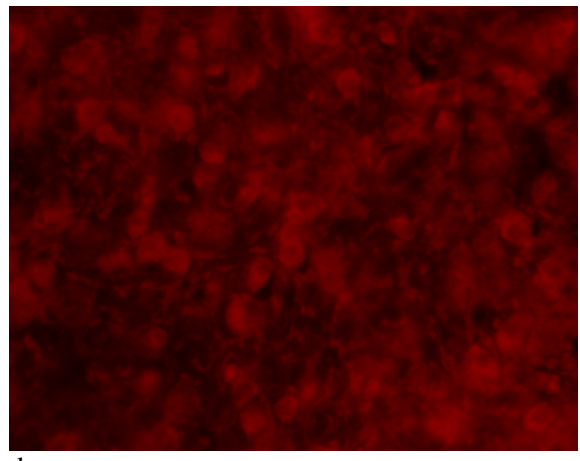
a



b



c



d

L'anticorpo anti-MT ha evidenziato un'immunopositività diffusa nei livelli 2 e 3 (Fig.41d e Fig.42d), in accordo con quanto emerge dall'analisi con Western blotting. Dall'analisi morfologica (Fig.41a e Fig.42a) non si evince alcuna differenza nei tre livelli analizzati rispetto al controllo.

4.1.6b Analisi della risposta degli organismi esposti a concentrazioni elevate di Rame

Sia dalla tecnica Western Blotting che dalle analisi immunostochimiche non è stata evidenziata l'espressione delle MTs (Fig. 44d).

Dall'analisi morfologica (Fig.44a) ed istochimica (Fig. 44b e 44c) non si evince alcuna differenza nei tre livelli analizzati rispetto al controllo.

Fig. 43 Western Blotting – Controllo Actina

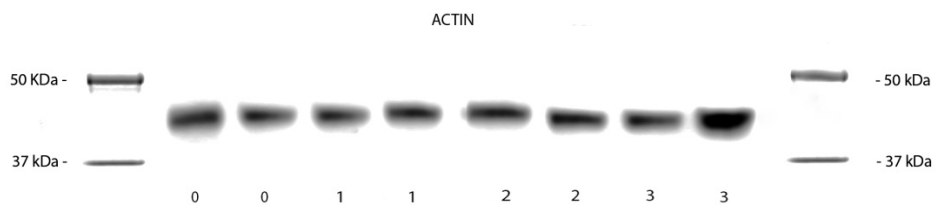
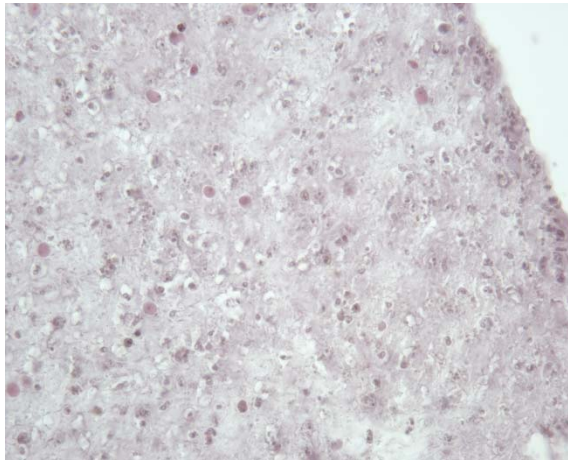
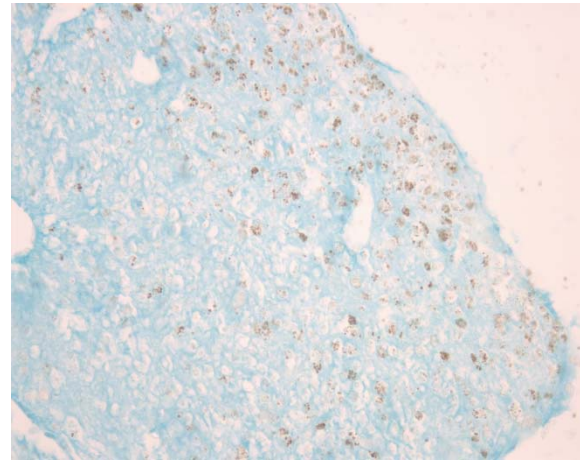


Figura 44. Sezioni istologiche di *Chondrilla nucula* contaminati con rame (livello 3). Non è stata evidenziata nessuna differenza nei tre livelli di contaminazione. a)Ematossilina-eosina; b) Alcian blu pH 2,5; c) Alcian blu pH 1; anticorpo anti- MT. 400x



a



b



c



d

4.1.6c Analisi della risposta degli organismi esposti a concentrazioni elevate di Piombo

Tramite la tecnica Western Blotting non è stata evidenziata l'espressione delle metallotioneine nel controllo e nel primo livello di esposizione al Pb, ma solo nel secondo e nel terzo livello e con proporzionalità crescente, come è evidenziato dal coefficiente di Pearson ($R = 0.913$, $p < 0.001$) e dalla regressione lineare rappresentata in figura 46.

Fig. 45a Western Blotting – Controllo Actina

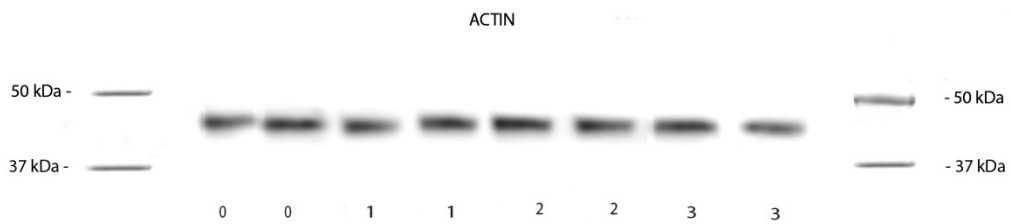


Fig. 45b Western Blotting – Pb

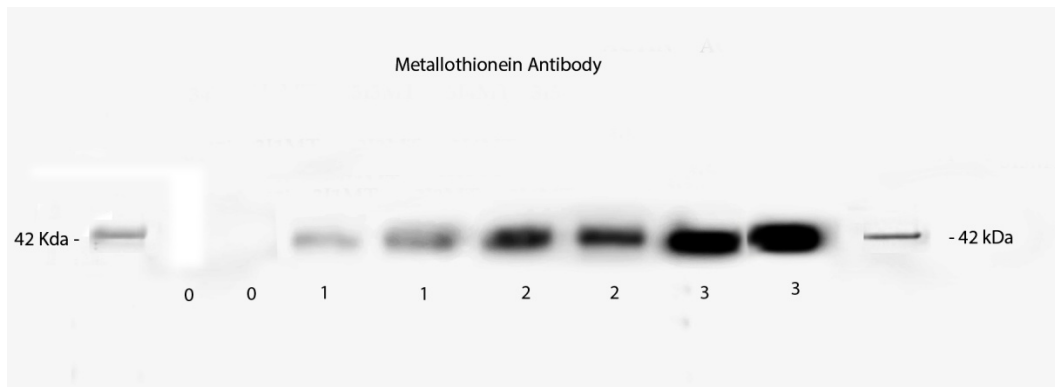
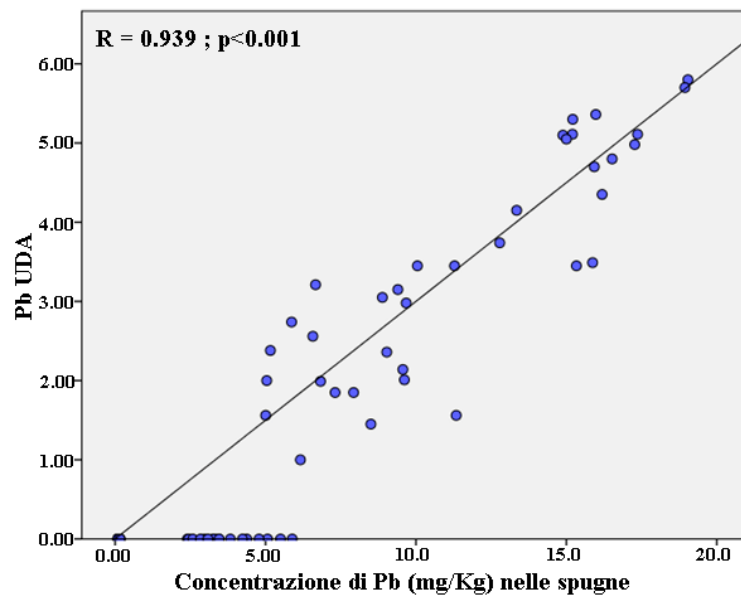
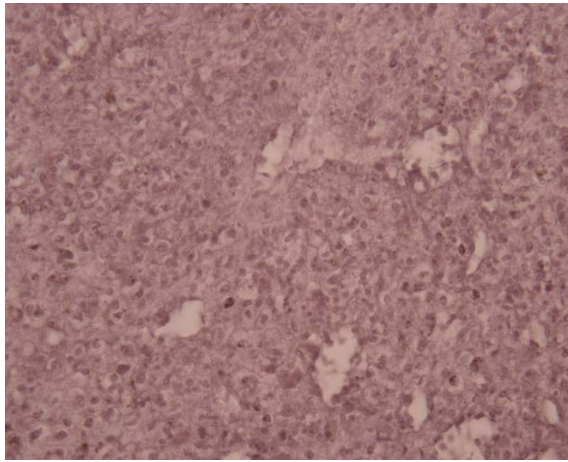


Figura 46. Regressione Lineare tra le concentrazioni di Pb nelle spugne e i livelli di espressione delle MT per ogni livello di esposizione

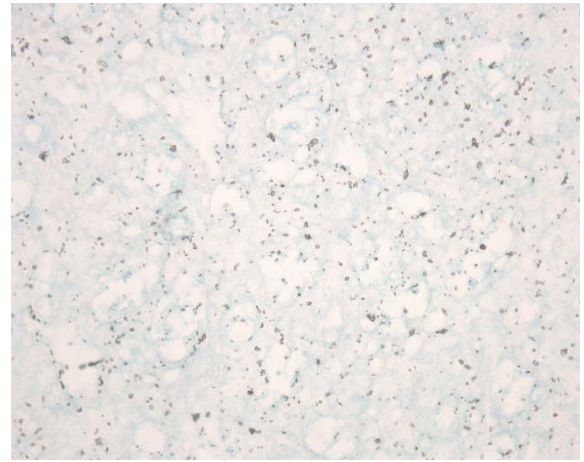


Dall'analisi morfologica (Fig. 47a e Fig.48a) non si evince alcuna differenza nei tre livelli analizzati rispetto al controllo. Per quanto riguarda l'analisi istochimica è stato evidenziato un aumento dei mucopolisaccaridi acidi solforati e carbossilati nei livelli 2 e 3 (Fig. 47b e 47c; Fig. 48b e 48c). L'anticorpo anti-MT ha evidenziato un'immunopositività diffusa nei livelli 2 e 3 (Fig.47d e Fig.48d).

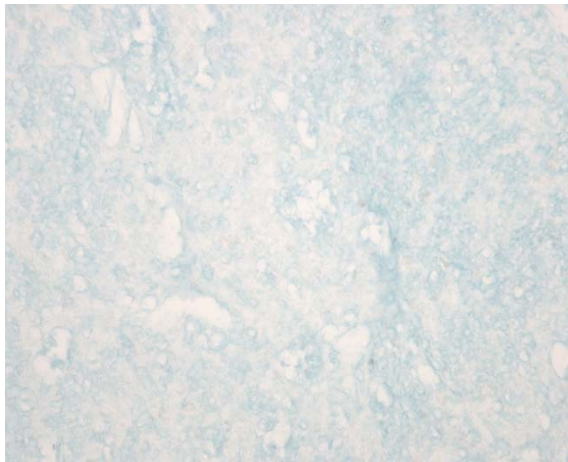
Figura 47. Sezioni istologiche di *Chondrilla nucula* contaminati con piombo (livello 2). a) Ematossilina-eosina; b) Alcian blu pH 1; c) Alcian blu pH 2,5; anticorpo anti- MT. 400x



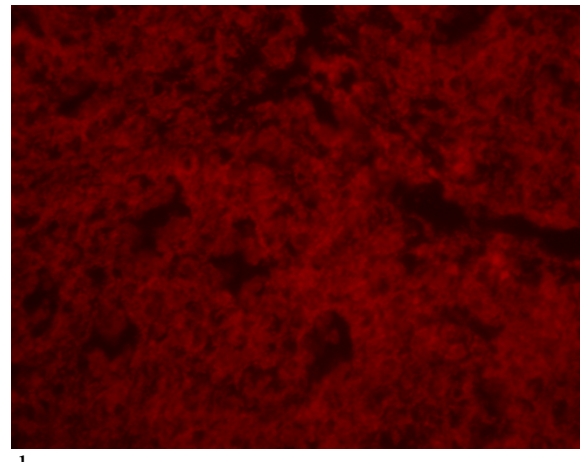
a



b

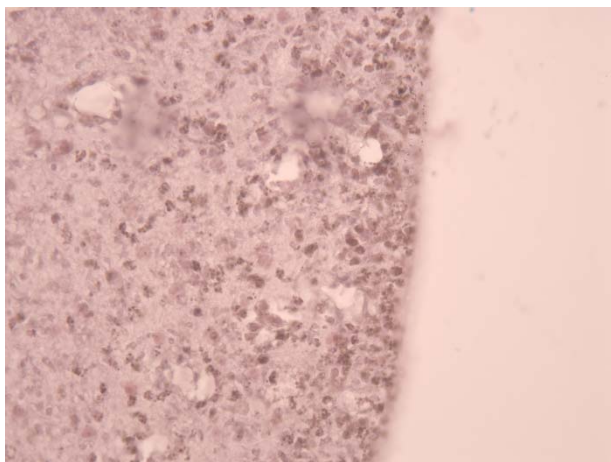


c

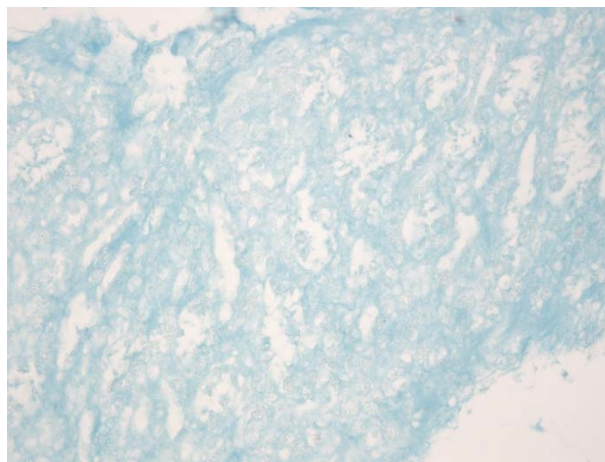


d

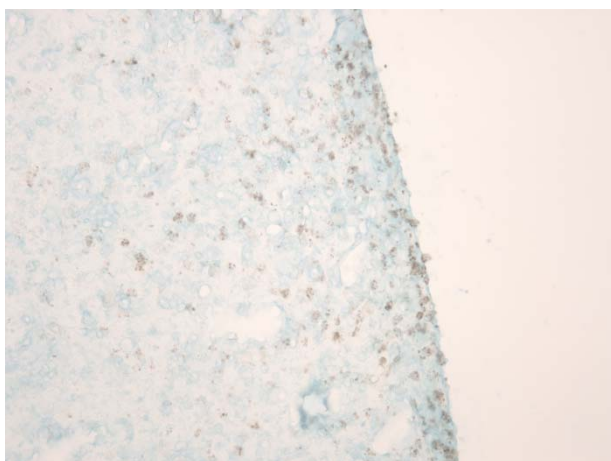
Figura 48. Sezioni istologiche di *Chondrilla nucula* contaminati con piombo (3° livello). a) Ematossilina-eosina; b) Alcian blu pH 2,5; c) Alcian blu pH 1; anticorpo anti- MT. 400x



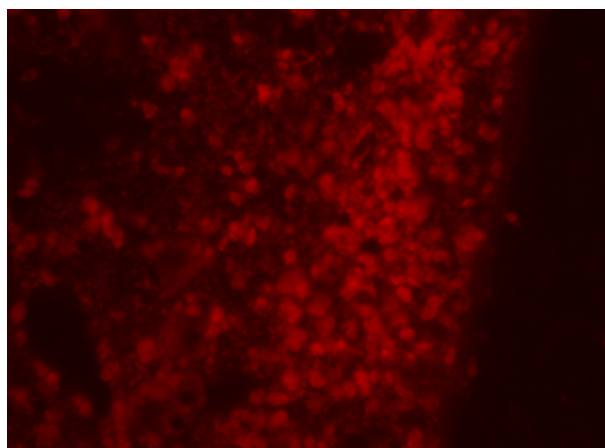
a



b



c



d

4.2 ESPERIMENTI PILOTA DI BIOREMEDIATION

L'approccio applicativo delle informazioni acquisite sulla capacità di iperaccumulo di metalli pesanti in *C. nucula* ha permesso l'avvio di sperimentazioni biotecnologiche per il risanamento di aree portuali, con l'analisi della fattibilità degli esperimenti, definendo alcune linee guida finalizzate al miglioramento delle ricerche.

Gli esperimenti sul campo hanno consentito di evidenziare alcuni punti critici della metodologia.

Il disegno sperimentale iniziale ha previsto una prima fase di caratterizzazione dei siti dove effettuare il trapianto per l'allestimento delle strutture pilota per il risanamento ambientale, una seconda fase di survey, a cui sono seguite le attività di campionamento e transplanting.

Al fine di procedere con l'attività di transplanting per il biomonitoraggio e il restauro delle aree portuali si è proceduto con la ricerca in situ di *Chondrilla nucula* in aree vicine a quelle scelte, sicuri dell'abbondanza della specie segnalata lungo le coste della Sicilia.

La specie, pur essendo definita in letteratura una specie comune e abbondante lungo le coste mediterranee, è stata rinvenuta soltanto in alcune aree.

4.2.1 CARATTERIZZAZIONE DEI SITI DI IMPIANTO

Dall'analisi dei sedimenti sono state ottenute le medie delle concentrazioni di metalli pesanti (mg/Kg p.s.±ds) nei sedimenti delle tre aree portuali (Sferracavallo, Ognina e Porto Palo) riportate nella tabella sopra.

In generale, come si può osservare i sedimenti dell'area portuale di Portopalo risultano avere concentrazioni significativamente più elevate di metalli pesanti rispetto a quelle dei siti

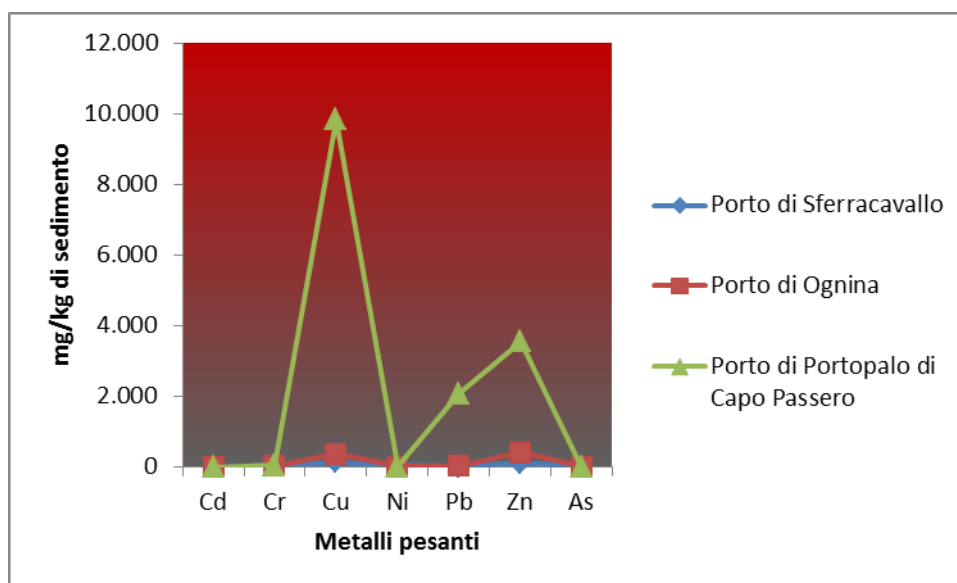
Sferracavallo e Catania, probabilmente perché Portopalo, essendo una delle più importanti marinerie della Sicilia, risente delle intense attività portuali dovute al mantenimento dei pescherecci.

In generale si osservano valori crescenti di concentrazione di metalli pesanti tra i porti in esame, evidenziando concentrazioni più basse a Sferracavallo, più alte ad Ognina e massime a Portopalo, in accordo con gli obiettivi del presente lavoro.

Tab. 13 Concentrazioni di HM presenti nei sedimenti campionati nelle aree di studio

Siti di campionamento	Latitudine	Longitudine	Profondità (m)	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	As
Porto di Sferracavallo	38°12'1.71"N	13°16'32.55"E	3	0,173	50,569	133,771	50,969	14,479	124,188	10,722
Porto di Ognina	37°31'45.84"N	15° 6'55.36"E	12	0,239	38,676	369,050	17,339	24,899	408,931	10,377
Porto di Portopalo di Capo Passero	36°40'17.60"N	15° 7'37.94"E	2,6	0,465	55,539	9838,709	7,590	2091,736	3554,897	8,976

Fig. 49 Concentrazioni di HM presenti nei sedimenti campionati nelle aree di studio



4.2.2 SURVEY

AMP Capo Gallo – Isola delle Femmine

La prima indagine, finalizzata al prelievo degli organismi è stato svolto lungo la Costa di Sferracavallo, in previsione dell'impianto nel vicino porto di Sferracavallo.

Durante l'attività di campo la specie è stata rinvenuta soltanto in due siti all'interno dell'AMP.

La ricerca è stata svolta in 3 siti, nel golfo di Sferracavallo dove si trova anche il porto, ad est e ad ovest di Punta Barcarello e nel tratto di costa a nord del porticciolo turistico della Motomar.

Chondrilla nucula è stata rinvenuta ad ovest di Punta Barcarello e in particolare nelle pozze d'acqua formatesi lungo il marciapiede a vermeti, a pochi centimetri di profondità, e, in prossimità della Motomar, dove invece è abbondante, ricoprendo le rocce del fondale da -1m a -5m dalla superficie.

La sua presenza non è stata rilevata nel golfo di Sferracavallo, dove invece era attesa.

AMP Ciclopi e costa catanese

La ricerca svolta lungo la costa catanese e all'interno dell'AMP Isole Ciclopi non ha dato alcun risultato, infatti *Chondrilla nucula* non è stata rinvenuta, condizione che ha escluso la possibilità di trapiantare la spugna nel Porto di Ognina a Catania.

Tra Vendicari e Porto Palo

Durante le indagini condotte nell'area tra la RNO di Vendicari e Porto Palo di Capo Passero la specie è stata rinvenuta in abbondanza lungo il tratto costiero della località Bue Marino a Marzamemi (Comune di Pachino), condizione ideale per il successivo trapianto nel sito portuale vicino.

4.2.3 INDAGINI SULLA SOPRAVVIVENZA DEI CAMPIONI TRAPIANTATI

Il primo esperimento di impianto sia nel Porto di Sferracavallo, sia nel Porto di Portopalo è avvenuto nel mese di ottobre ed ha previsto la durata di 5 mesi (ottobre-marzo), sebbene, in entrambi i siti, sia stato interrotto a causa della mortalità delle spugne. Il secondo esperimento, realizzato in entrambi i siti, è stato avviato nel mese di aprile, prevedendo una durata di 5 mesi (aprile-settembre), ma anche in questo caso è terminato prima del tempo. Il terzo esperimento, alla luce dei precedenti risultati, si è attuato in entrambi i siti nel mese di giugno e si è concluso dopo 1 mese.

Il piano sperimentale ha previsto un primo controllo dopo 1 settimana per monitorare gli organismi nella prima fase di adattamento e dei monitoraggi successivi per rilevare la concentrazione di metalli pesanti accumulati dalle spugne.

In entrambi i siti sono stati svolti soltanto 4 controlli, il primo dopo 1 settimana che ha evidenziato una condizione di deperimento degli organismi, il secondo dopo 15 gg dal Tempo 0 che ha mostrato un alto tasso di mortalità nelle due aree portuali; il terzo, dopo 3 settimane, ha rilevato una mortalità sempre crescente; il quarto, dopo 30 gg, ha evidenziato un tasso di mortalità del 100%.

Durante i monitoraggi effettuati, dopo 6 gg dal Tempo 0, negli impianti controllo C, nei due siti di prelievo, non è stata ritrovata la struttura impiantata, probabilmente a causa di forti mareggiate.

4.2.4 OSSERVAZIONI SULLA FATTIBILITÀ DELLA SPERIMENTAZIONE

I limiti riscontrati durante le prove di trapianto, hanno consentito la definizione di alcune linee guida per la sperimentazione, individuando le condizioni necessarie per l'utilizzo del porifero studiato nel Bioremediation.

Alcune osservazioni riguardano la metodologia da seguire nelle varie fasi del nuovo impianto, dal prelievo al controllo degli impianti, altre considerazioni sono relative all'ecologia ed alla distribuzione della specie, altre ancora sono connesse alla scelta dei siti degli impianti e dei siti di prelievo.

In generale il processo di sperimentazione si può riassumere nel seguente schema



Nel dettaglio, tuttavia bisogna tenere conto di molti aspetti che se sottovalutati possono compromettere l'efficacia della sperimentazione.

I passaggi di un programma di successo sono schematizzati in fig. 50.

La fase preliminare è l'individuazione del sito dove realizzare l'impianto di bioremediation, da caratterizzare analizzando in primo luogo i parametri chimico-fisici che dovranno essere nel range di tolleranza della specie studiata.

Parallelamente risulta necessario scegliere il luogo di prelievo dei campioni da trapiantare. Il sito dovrà essere stabilito sulla base di:

- abbondanza della specie studiata
- vicinanza con il luogo di coltura degli organismi

Il prelievo dovrà essere dunque effettuato asportando gli esemplari con la massima attenzione al fine di non lacerare i corpi e di favorire il successivo impianto nelle strutture destinate al risanamento.

I campioni dovranno restare sommersi per tutta la durata delle operazioni per evitare un possibile contatto con l'aria, possibile causa di danneggiamento agli osculi del porifero.

Il trasporto dovrà avvenire in modo più celere possibile e comunque in contenitori refrigerati e areati contenenti acqua marina artificiale e alimento per i poriferi.

Risulta di importanza fondamentale per la buona riuscita del trapianto, un periodo di acclimatazione, durante cui i campioni prelevati saranno tenuti in coltura, sotto osservazione in condizioni controllate ed inseriti in apposite strutture per l'adesione al nuovo substrato, che sarà la base della struttura usata per l'impianto nel sito da risanare.

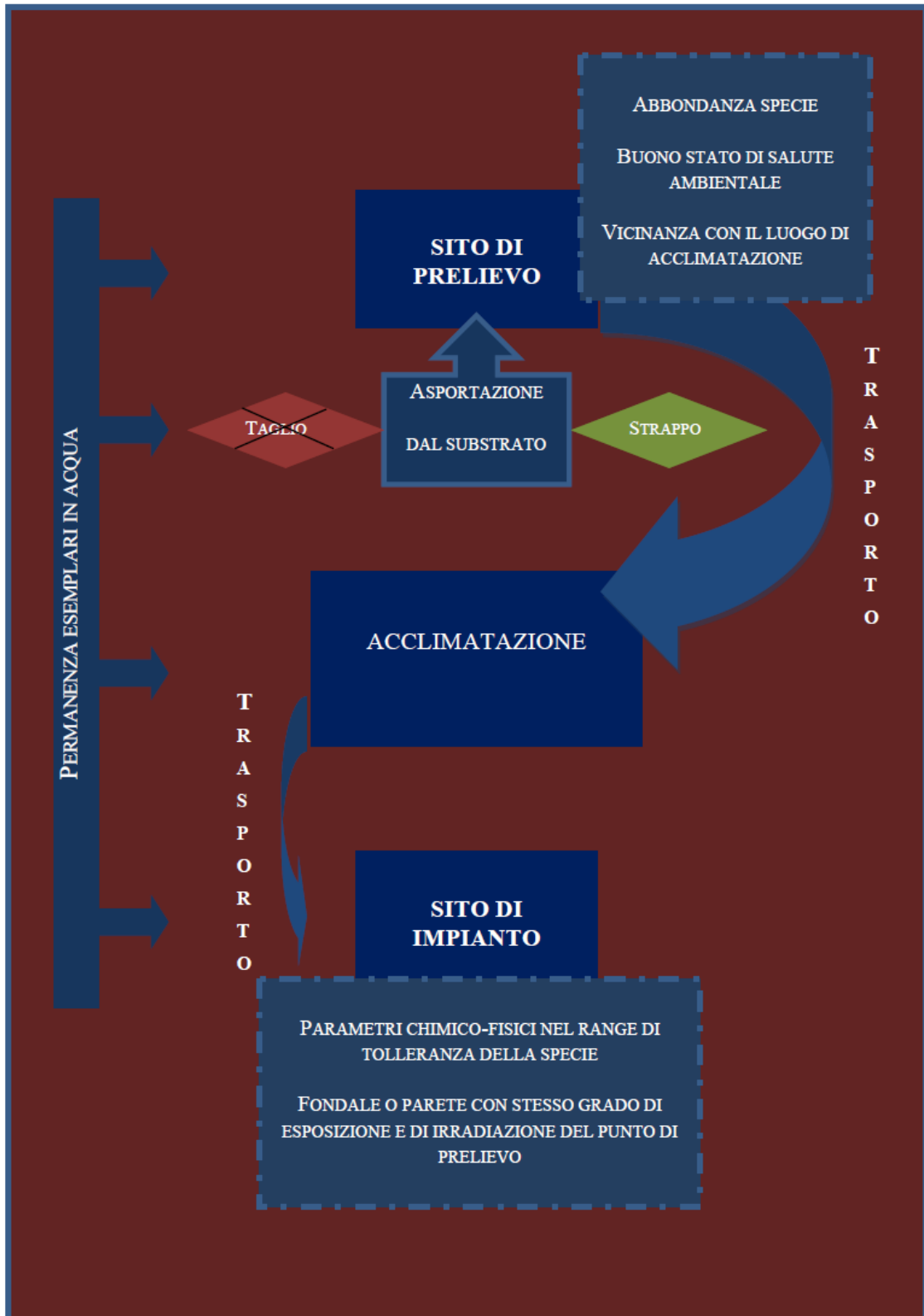
Il successivo trasporto presso il sito del nuovo impianto dovrà essere effettuato come precedentemente descritto, ponendo particolare attenzione nell'evitare la fuoriuscita dall'acqua delle strutture dove sono impiantate le spugne.

La messa in posa delle strutture dovrà essere realizzata in modo che sia il grado di esposizione, sia il grado di irradiazione sia lo stesso del punto di prelievo dei campioni usati per il trapianto.

La gestione ed il mantenimento dell'impianto di maricoltura per il risanamento sarà effettuata in immersione.

Gli alti costi previsti per la realizzazione di un impianto efficiente sono sicuramente compensati dal successo dell'operazione, che consentirebbe non soltanto un reale risanamento di aree gravemente inquinate, ma anche un restauro ambientale, contribuendo all'insediamento di specie in aree estremamente impoverite.

Fig. 50 – Linee guida per la realizzazione di impianti di bioremediation



CONCLUSIONI

Biomonitoraggio e Bioremediation sono i due temi più rilevanti nell'ambito della tutela dell'ambiente ed in particolare del mare. La fascia costiera è quella maggiormente soggetta alle attività antropiche e gli organismi dell'ecosistema sono le prime vittime dell'inquinamento.

Spesso sono gli stessi organismi che ci informano dello stato di salute del mare, le specie "sentinella" possono raccontarci la storia evolutiva dell'ambiente ed il loro studio ci consente di trovare soluzioni per rimediare ai danni ambientali continuamente provocati dalle attività antropiche.

Fino a poco tempo fa, le specie sentinella per eccellenza sono stati i mitili per la loro capacità di accumulare nei tessuti tutto quel che si trova nella colonna d'acqua.

Oggi, grazie a studi recenti, anche i poriferi sono stati rivalutati come organismi sentinella per lo stato di salute delle acque, in quanto animali in grado di accumulare concentrazioni alte di metalli pesanti e altri inquinanti, in certi casi, anche, con maggiore efficienza di altri organismi storicamente utilizzati come bioindicatori.

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di contribuire alla conoscenza di *C. nucula* finalizzata alla conservazione dell'ambiente marino e al suo restauro.

La scelta di *Chondrilla nucula* si è basata su lavori recenti aventi come oggetto la capacità filtrante della specie.

Gli esperimenti in laboratorio hanno evidenziato una capacità elevata di assorbire metalli pesanti, con una significativa correlazione positiva tra la concentrazione dei metalli presente nell'acqua del trattamento e l'accumulo degli stessi negli organismi esposti.

Alla luce dei risultati ottenuti dalle indagini sulle metallotioneine, si può affermare che in *C. nucula* esistono sistemi molto efficienti di detossificazione, che le permettono, a concentrazioni più elevate di accumulare i metalli, senza, tuttavia modificare la conformazione morfologica.

La capacità di una specie di accumulare grandi quantitativi di sostanze inquinanti pur non modificando l'organizzazione morfostrutturale rappresenta sicuramente un grande vantaggio nel campo delle biotecnologie che mirano al risanamento ambientale.

Vista l'efficienza di accumulare metalli e la resistenza testata in condizioni di laboratorio, è possibile asserire che la specie in questione possa essere utilizzata come ottimo bioaccumulatore sia in piani di biomonitoraggio sia in progetti di recupero ambientale.

Tuttavia, per poter sfruttare *C. nucula* in azioni di bioremediation, risulta necessario superare alcune problematiche emerse dallo studio, dovute, in primo luogo alla capacità di adattamento della specie nei siti di impianto dove le condizioni fisico-chimiche per la sopravvivenza sono differenti da quelle ottimali e, secondariamente, anche, alla non facile reperibilità degli esemplari in prossimità dei siti di impianto. Come si è verificato, durante l'attività di siting finalizzata all'individuazione del sito di prelievo di *Chondrila nucula* per il successivo trapianto nel porto di Ognina di Catania. L'inattesa assenza della specie, identificata in letteratura come cosmopolita e largamente distribuita nel Mar Mediterraneo, non ha permesso di perseguire gli obiettivi iniziali di impianto nel porto catanese.

A conferma di quanto detto, uno studio recente (Goodwin *et al.*, 2014) ha dimostrato come *C. nucula* sia una specie particolarmente sensibile alle variazioni delle condizioni chimico-fisiche, determinando una distribuzione selettiva.

Queste considerazioni risultano importanti al fine di poter stabilire un protocollo sperimentale finalizzato al bioremediation, inoltre, la conoscenza dei fattori che limitano la crescita e la sopravvivenza delle spugne potrebbe aiutare a progettare impianti di risanamento, efficienti e di facile gestione.

BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Andral B, Stanisiere JY, Sauzade D, Damier E, Thebault H, Galgani F, Boissery P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar Pollut Bull* 49(9-10):704-712.
- Arillo A, Bavestrello G, Burlando B, Sarà M 1993. Metabolic integration between symbiotic cyanobacteria and sponges: a possibile mechanism. *Marine Biology* 117: 159-162.
- 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*, 55(7): 1151-1164.
- Audet P., Charest C., 2008. Allocation plasticity and metal-partitioning: meta-analytical perspectives in phytoremediation. *Environmental Pollution* 156: 290–296.
- Baird, C., 1997. *Chimica ambientale*. Zanichelli editore, Bologna, pp. 273.
- 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.*, 61(3-4): 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, pp. 40-45.
- Batista D., Muricy G., Rocha R. C., Miekeley N. F., 2014 Marine sponges with contrasting life histories can be complementary biomonitors of heavy metal pollution in coastal ecosystems *Environ Sci Pollut Res* 21:5785–5794.
- 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.

- Bavestrello G, Bonito M, Sarà M 1993a. Silica content and spicular size variation during an annual cycle in *Chondrilla nucula* Schmidt (Porifera, Demospongiae) in the Ligurian Sea. *Sci. Mar.* 57(4): 421-425.
- Bavestrello G, Bonito M, Sarà M 1993b. Influence of depth on the size of sponge spicules. *Sci. Mar.* 57(4): 415-420.
- Bayne B.L., Moore M.N., Widdows J., Livingstone D.R., Salkeld P., 1979 - Measurement of the responses of individuals to environmental stress and pollution: studies with bivalve molluscs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 286:563-581.
- Becerro MA, Lopez NI, Turon X, Uriz MJ 1994. Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 179: 195-205.
- Belarbi EH, Contreras Gomes A, Chisti Y, Garcia Camacho F, Molina Grima E 2003. Producing drugs from marine sponges. *Biotechnology Advances* 21: 585-598.
- 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.
- Bergmann W, Feeney RJ 1951. Contributions to the study of marine products: the nucleosides of sponges. *J. Org. Chem.* 16: 981-987.
- Berthet, B., C. Mouneyrac, et al., 2005. "Metallothionein concentration in sponges (*Spongia officinalis*) as a biomarker of metal contamination." *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 141(3): 306-313.
- Bidder G 1896. Note on prospects for the improvement of sponge-fisheries. *J. Mar. Biol. Ass.* 4: 195-202.
- Bohsale SH, Nagle VL, Jagtap TG 2002. Antifouling potential of some marine organisms from India against species of *Bacillus* and *Pseudomonas*. *Mar. Biotechnol.* 4: 111-118.
- Bongiorni L, Pietra F 1996. Marine natural products for industrial applications. *Chem. Ind.* pp. 54-58.
- Borris RP, Gould SJ 1999. Molecular diversity, biological diversity and the search for new drugs. IUPAC.

- Boudou A., Ribeyre F., 1983. Contamination Of Aquatic Biocenoses By Mercury Compounds: An Experimental Toxicological Approach. In: J.O. Nriagu (Ed.). Aquatic Toxicology. John Wiley, New York, pp. 73-116.
- Boury-Esnault & Lopès, 1985. Family Chondrillidae In: Hooper JNA, Van Soest RWM (Eds) Systema Porifera: a guide to the classification of sponges, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Boury-Esnault, N 2002. Order Chondrosida In: Hooper JNA, Van Soest RWM (Eds) Systema Porifera: a guide to the classification of sponges, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Bowler K. e Duncan D.J., 1970. The Effect Of Copper On Membrane Enzymes. Biochem Biophys Acta 196:116-119.
- Brown, D.A., Bay, S.M. and Hershelman, G.P., 1990. Exposure of Scorpionfish (*Scorpaena uttata*) 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.
- 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.
- Burdige, D.J., 1993. The biochemistry of manganese and iron reduction in marine sediments. *Earth Sci. Rev.*, 35: 249–284.
- Burgess JG, Boyd KG 2003. The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling* 19(supplement): 197-205.
- Burgess JG, Jordan EM, Bregu M, Mearns-Spragg A, Boyd KG 1999. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *J. Biotech.* 70: 27-32.
- Bury, N.R., Walker, P.A. and Glover, C.N., 2003. Nutritive Metal Uptake in Teleost Fish. *J. Exp. Biol.*, vol. 206 (1): 11–23. Butterworths. London.
- 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 (10): 2141–2154.

- 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.
- Campenhout K. V., Infante H.G., Adams F. and R. Blust, 2004. Induction and Binding of Cd, Cu, and Zn to Metallothionein in Carp (*Cyprinus carpio*) Using HPLC-ICP-TOFMS. *Toxicological Sciences* 80: 276–287.
- Canton J.H. E Slooff W., 1982. Toxicity And Accumulation Studies Of Cadmium (Cd²⁺) With Freshwater Organisms Of Different Trophic Levels. *Ecotoxicol Environ Safety* 6:113-138.
- Capon RJ, Skene C, Lacey E, Gill JH, Wadsworth D, Friedel T 1999. Geodin A magnesium salt: a novel nematocide from a Southern Australian marine sponge *Geodia*. *J. Nat. Prod.* 62: 1256-1259.
- Carballeira NM, Maldonado L 1986. Identification of 5,9-hexadecadienoic acid in the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Lipids* 21(7): 470-471.
- Carballeira NM, Maldonado L, Porras B 1987. Isoprenoid fatty acids from marine sponges. Are sponge selective? *Lipids* 22(10): 767-769.
- Carballo JL, Gómez P, Cruz-Barranza JA, Flores-Sánchez DM 2003. Sponges of the family Chondrillidae (Porifera: Demospongiae) from the Pacific coast of Mexico, with the description of three new species. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 116(2): 515-527.
- Carson R. 1962. *The Silent Spring*. Penguin Books(Ed), Harmondsworth, pp 317.
- Cattaneo-Vietti R, Benatti U, Cerrano C, Giovine M, Tazioli S, Bavestrello G 2003. A marine biological underwater depuration system (MUDS) to process waste waters. *Biomol. Engineering* 20: 291-298.
- Cebrian, E. and M. J. Uriz , 2007. "Contrasting effects of heavy metals on sponge cell behavior." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53(4): 552-558.
- Cebrian, E. and M. J. Uriz, 2007. "Contrasting effects of heavy metals and hydrocarbons on larval settlement and juvenile survival in sponges." *Aquatic Toxicology* 81(2): 137-143.
- Cebrian, E., M. J. Uriz, et al., 2007. "Sponges as biomonitors of heavy metals in spatial and temporal surveys in northwestern Mediterranean: Multispecies comparison." *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(11): 2430-2439.

- Cebrian, E., R. Martí, et al., 2003. "Sublethal effects of contamination on the Mediterranean sponge *Crambe crambe*: Metal accumulation and biological responses." *Marine Pollution Bulletin* 46(10): 1273-1284.
- Chanas B, Pawlik JR, Lindel T, Fenical W 1996. Chemical defence of the Caribbean sponge *Agelas clathrodes* (Schmidt). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 208: 185-196.
- 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.
- Cherian M.G., 1994 - The significance of the nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver and tumor cells. *Environ. Health Perspect.*, 3:131-135.
- Chowdhury, M.J., Baldisserotto, B., and Wood, C.M., 2005. Tissue-Specific Calcium and Metallothionein Levels in Rainbow Trout Chronically Acclimated to Waterborne or Dietary Cadmium., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 48 (3): 381–390.
- 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.
- Claire Goodwin, Riccardo Rodolfo-Metalpa, Bernard Picton & Jason M. Hall-Spence, 2014. Effects of ocean acidification on sponge communities - *Marine Ecology* 35 (Suppl. 1), 41–49.
- Claus G, Madri PP, Kunen SM 1967. Removal of microbial pollutants from waste effluents by the redbear sponge. *Nature* 216: 712-714.
- Colwell R.R., 2002. Fulfilling the promise of biotechnology. *Biotechnol Adv.* 20: 215-228.
- Commissione europea, Communication from the Commission to the Council, the European Parliament and the Economic and Social Committee, Pricing policies for enhancing the sustainability of water resources, COM(2000)477 final, 26/7/2000 .
- Commissione Europea, *Opinion of the Commission pursuant to Article 251, 2, let. c) of the EC Treaty, on the European Parliament's amendments to the Council's common position regarding the Proposal for a European Parliament and Council Directive establishing a framework for Community action in the field of water policy*, (COM(97) 49 final, COM (97)614 final, COM (98) 76 final e COM (99) 271 final amending the proposal of the Commission pursuant to art. 250, p. 2 of the EC Treaty; COM (2000) 219 final, 1997/0067 (COD), Brussels, 5 giugno 2000.

Commissione Europea, Proposta al Consiglio europeo per una direttiva che stabilisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque, COM/97/0049 final SYN 97/0067, Brussels, OJ [1997] C184/20.

Commissione europea, Proposta di direttiva del Consiglio che stabilisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque, COM/97/0049 final SYN 97/0067, Brussels, OJ [1997] C184/20 43.

Communication from the Commission to the Council, the European Parliament and the Economic and Social Committee, Pricing policies for enhancing the sustainability of water resources, COM(2000)477 final, 26/7/2000.

Communication from the Commission to the European Parliament and the Council, Towards Sustainable Water Management in the European Union – First stage in the implementation of the Water Framework Directive 2000/60/CE, [COM(2007)128 final], [SEC(2007)363].

Comunicazione della Commissione al Parlamento Europeo e al Consiglio, Verso una gestione sostenibile delle acque nell'Unione europea – prima fase dell'attuazione della direttiva quadro sulle acque (2000/60/CE), [SEC(2007)362], [SEC(2007)363].

Consiglio europeo, Common Position (EC) N. 41/1999, adottata dal Consiglio il 22 ottobre 1999 (with a view to the adoption of a Directive 1999/./EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for Community action in the field of water policy), Brussels, OJ (1999), C343/01.

Convenzione sull'accesso alle informazioni, la partecipazione del pubblico ai processi decisionali e l'accesso alla giustizia in materia ambientale, approvata con Decisione 2005/370/CE del Consiglio, del 17 febbraio 2005, relativa alla firma, a nome della Comunità europea, della convenzione sull'accesso alle informazioni, la partecipazione del pubblico al processo decisionale e l'accesso alla giustizia in materia ambientale, G.U.C.E L 124 del 17 maggio 2005, pp 1-3; G.U.C.E L 164M del 16 giugno 2006.

Cotte J 1908. Sponge culture. Bull. Bur. Fish. 28: 589-614.

Coughlan J 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. Marine Biology 2: 356-358.

- Cowling MJ, Hodgkiess T, Parr ACS, Smith MJ, Marrs SJ 2000. An alternative approach to antifouling based on analogues of natural processes. *Sci. Total Environ.* 258: 129-137.
- 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 (4): 255–262.
- Davies PJ 1983. Reef growth. In: Barnes DJ (Ed) *Perspectives on Coral Reefs* pp. 66-106.
- Davis AR, Butler AJ, Altena I 1991. Settlement behaviour of ascidian larvae: preliminary evidence for inhibition by sponge allelochemicals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 72: 117-123.
- 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 (3-4):265-277.
- Decaprio A.P., 1997 - Biomarkers: coming of age for environmental health and risk assessment. *Environ. Sci. Tech.*, 31:1873-1848.
- Decreto Legislativo 11 maggio 1999, n. 152 "Testo aggiornato del decreto legislativo 11 maggio 1999, n. 152, recante: "Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole", a seguito delle disposizioni correttive ed integrative di cui al decreto legislativo 18 agosto 2000, n. 258", *Gazzetta Ufficiale* n. 246 del 20 ottobre 2000 - Supplemento Ordinario n. 172.
- Decreto Legislativo 11 maggio 1999, n. 152, "Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole", *Gazzetta Ufficiale* n. 246 del 20 ottobre 2000 - Supplemento Ordinario n. 172.
- Decreto Legislativo 16 gennaio 2008, n. 4, "Ulteriori disposizioni correttive ed integrative del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale", *Gazzetta Ufficiale* n. 24 del 29 gennaio 2008 – Supplemento Ordinario n. 24.
- Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152 "Norme in materia ambientale", *Gazzetta Ufficiale* n. 88 del 14 aprile 2006 - Supplemento Ordinario n. 96.

- Decreto legislativo 9 novembre 2006, n. 284 Disposizioni correttive e integrative del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale G.U. n. 274 del 24 novembre 2006.
- Decreto Legislativo del 3 aprile 2006, n. 152, “Norme in materia ambientale”, *Gazzetta Ufficiale* n. 88 del 14 aprile 2006, Supplemento ordinario n. 96.
- Deliberazione della Giunta Provinciale di Bergamo, “Avvio del procedimento di Valutazione Ambientale Strategica (VAS) del Piano Provinciale di Settore delle risorse idriche, n. 222 del 15/5/2008.
- Depledge M.H., 1994. The rational basis of the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Fossi M.C. e Leonzio C., *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 271-295.
- Di Toro, D.M., Mahony, J.D., Hansen, D.J., Scott, K.J., Carlson, A.R., Ankley, G.T., 1992. Acidvolatile sulfide predicts the acute toxicity of cadmium and nickel in sediments. *Environ. Sci. Technol.*, 26: 96–101.
- Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 23 ottobre 2000, che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque, GUCE, n. L 327, del 22/12/2000.
- Direttiva 2003/35/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 26 maggio 2003 che prevede la partecipazione del pubblico nell'elaborazione di taluni piani e programmi in materia ambientale e modifica le direttive del Consiglio 85/337/CEE e 96/61/CE relativamente alla partecipazione del pubblico e all'accesso alla giustizia, G.U.C.E. L 156/17 del 26/6/2003 44.
- Direttiva 2004/35/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 aprile 2004, sulla responsabilità ambientale in materia di prevenzione e riparazione del danno ambientale, GU L 143 del 30.4.2004.
- Direttiva 2006/118/CE del 12 dicembre 2006 del Parlamento europeo e Consiglio sulla protezione delle acque sotterranee dall'inquinamento e dal deterioramento, GUCE, n. L372 del 27/12/2006.
- Direttiva 76/160/CEE del Consiglio, dell'8 dicembre 1975, concernente la qualità delle acque di balneazione, in G.U.C.E. L 31 del 5.2.1976.
- Direttiva 78/659/CEE del Consiglio, del 18 luglio 1978, sulla qualità delle acque dolci che richiedono protezione o miglioramento per essere idonee alla vita dei pesci, in G.U.C.E. n. L 222 del 14/08/1978.

- Direttiva 79/923/CEE del Consiglio, del 30 ottobre 1979, relativa ai requisiti di qualità delle acque destinate alla molluschicoltura, in G.U.C.E. L 281 del 10 novembre 1979.
- Direttiva 91/271/CEE del Consiglio, del 21 maggio 1991, concernente il trattamento delle acque reflue urbane, GUCE n. L 135 del 30/05/1991.
- Direttiva 92/43/CEE del Consiglio del 21 maggio 1992 relativa alla conservazione degli habitat naturali e seminaturali e della flora e della fauna selvatiche, GU L 206 del 22 luglio 1992.
- Doherty V.F., Ogunkuade O.O., Kanife U.C., 2010. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in Some Selected Fishes in Lagos, Nigeria. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 7: 359-365.
- Dolara, P., 1997. Tossicologia generale e ambientale. Piccin Nuova Libreria s.p.a.
- Donia M, Hamann MT 2003. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *The Lancet* 3: 338-348.
- Dubois R 1914. Spongiculture par essaimage. IX Cong. Int. Zool. Monaco, Obertur, Rennes: 659-660.
- Duckworth AR, Battershill CN, Bergquist PR 1997. Influence of explant procedures and environmental factors on culture success of three sponges. *Aquaculture* 156: 251-267.
- Dugo G., La Perar L., Bruzzese A., Pellicanò T.M. and Lo Turco V., 2006. Concentration of Cd (II), Cu (II), Pb (II), Se (IV) and Zn (II) in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) tissues from Tyrrhenian Sea and Sicilian Sea by derivative stripping potentiometry. *Food Control* 17 (2): 146-152.
- Dural M., Göksu M.Z, Ozak A.A., Derici B., 2006. Bioaccumulation of some heavy metals in different tissues of *Dicentrarchus labrax* L, 1758, *Sparus aurata* L, 1758 and *Mugil cephalus* L, 1758 from the Camlik lagoon of the eastern coast of Mediterranean (Turkey). *Environ Monit Assess* 118 (1-3): 65-74.
- Economu E, Konteatis D 1990. Sponge fishery in Cyprus 1900-1989. Republic of Cyprus, Ministry of Agriculture and Natural Resources, Department of Fisheries, Nicosia. pp. 52.
- Egan S, Thomas T, Holmström C, Kjelleberg S 2000. Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environ. Microbiol.* 2: 343-347.

- 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.
- 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(3): 235-256.
- Engel S, Pawlik JR 2000. Allelopathic activities of sponge extracts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 207: 273-281.
- Ensley S., 2003. Lead-Metals And Minerals. In: *Clinical Veterinary Toxicology*, Di Plumlee K.H. (Ed), Mosby, 22: 204-210.
- EPA, 1980. Ambient Water Quality Criteria For Cadmium. In: U.S. Environ. Protection Agency Report.
- 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(3): 269-285.
- Fanelli G, Portacci G, Boero F 2003. Patches of *Chondrilla nucula*: high-biodiversity spots within low-biodiversity barrens. 38th European Marine Biology Symposium, Aveiro, September 8-12 2003, abstract book: 115-116.
- 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 (6) 956–962.
- Fasulo S., Mauceri A., Maisano M., Giannetto A., Parrino V., Gennuso F., D’Agata A., 2010. Immunohistochemical and molecular biomarkers in *Coris julis* exposed to environmental contaminants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* doi: 10.1016/j.eco env. 2009.12.025.
- Faulkner DJ 2002. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 19: 1-48.
- Fossi M.C., 1998. Biomarkers. Strumenti di diagnosi e prognostici di “salute” ambientale. *Ecotossicologia*. UTET.
- Fowler B.A., Hildebrand C.E., Kojima Y., Webb M., 1987 - Nomenclature of metallothionein. *Experientia Suppl.*, 52:19-22.

- Frost TM 1980. Clearance determinations for the freshwater sponge *Spongilla lacustris*: effects of temperature, particle type and concentration, and sponge size. Arch. Hydrobiol. 99:330-356.
- Fu, W., L. Sun, et al., 2006. "Potential of the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* as a bioremediator of pathogenic bacteria in integrated aquaculture ecosystems." Biotechnology and Bioengineering 93(6): 1112-1122.
- Fu, W., Y. Wu, et al., 2007. "Efficient bioremediation of total organic carbon (TOC) in integrated aquaculture system by marine sponge *Hymeniacidon perlevis*." Biotechnology and Bioengineering 97(6): 1387-1397.
- Gaino E, Corriero G, Pronzato R 1994. La spongicoltura in Mediterraneo. In: L'acquacoltura. Acad. Int. Sci. Tecn. Subacquee Ustica (ed), Quaderno 14: 41-62.
- Gaino E, Pansini M, Pronzato R 1977. Aspetti dell'associazione tra *Chondrilla nucula* Schmidt (Demospongiae) e microrganismi simbiotici (Batteri e Cianofite) in condizioni naturali e sperimentali. Cahiers de Biologie Marine XVIII: 303-310.
- Gaino E, Pronzato R 1992. Epidemie e pesca intensiva minacciano la sopravvivenza delle spugne commerciali del bacino Mediterraneo. Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova 56-57: 209-224.
- Gaino E., 1980. Indagine ultrastrutturale sugli ovociti maturi di *Chondrilla nucula* Schmidt (Porifera, Demospongiae). Cah Biol Mar 21:11-22.
- Galstoff PS 1942. Wasting disease causing mortality of sponges in the West Indies and Gulf of Mexico. Proc. VIII Am. Sci. Congress 3: 411-421.
- Geldreich EE 1972. In Mitchell R (ed) Water pollution microbiology, New York, Wiley-Interscience, pp. 207-241.
- 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.
- Gerhart D, Rittschof D, Mayo S 1988. Chemical ecology and the search for marine antifoulants: studies of predator-prey symbiosis. J. Chem. Ecol. 14: 1903-1915.
- Gifford, S., R. H. Dunstan, et al., 2007. "Aquatic zooremediation: deploying animals to remediate contaminated aquatic environments." Trends in Biotechnology 25(2): 60-65.

- 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(9): 1702–1716.
- Gili JM, Coma R 1998. Benthic suspension feeders: their paramount role in littoral marine food webs. *TREE* 13(8): 316-321.
- Goodwin C., Rodolfo-Metalpa R., Picton B., Hall-Spencer J. M., 2014. Effects of ocean acidification on sponge communities, *Marine Ecology* 35:41–49.
- Goureau TF, Hartman WD 1966. Sponge: effect on the form of reef corals. *Science* 191: 343-344.
- Grandini, S., 1993. Rame e cadmio in tessuti di teleostei. *Il Pesce*, 4/93.
- Gray, 1987. In: Hooper JNA, Van Soest RWM (Eds) *Systema Porifera: a guide to the classification of sponges*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Gray, 1872. Family Chondrillidae In: Hooper JNA, Van Soest RWM (Eds) *Systema Porifera: a guide to the classification of sponges*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Grosell, M. and Wood, C.M., 2002. Copper Uptake Across Rainbow Trout Gills: Mechanisms of Apical Entry. *J. Exp. Biol.*, vol. 205 (8): 1179–1188.
- 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.
- Hansen, I.V., Weeks, J.M., Depledge, M.H., 1995. Accumulation of copper, zinc, cadmium and chromium by the marine sponge *Halichondria panicea* Pallas and implications for biomonitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 31: 133–138.
- Harvey A 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *DDT* 5(7): 294-300.
- Hay ME 1996. Marine chemical ecology: what's known and what's next? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 200: 103-134.

- Hentschel U, Schmid M, Wagner M, Fieseler L, Gernert C, Hacker J 2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 305-312.
- 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*, 312 (1-3):195-219.
- Ilan M, Contini H, Carmeli S, Rinkevicius B 1996. Progress towards cell cultures from a marine sponge that produce bioactive compounds. *J. Mar. Biotechnol.* 4: 145-149.
- Johnston, E. L. and G. F. Clark, 2007. "Recipient environment more important than community composition in determining the success of an experimental sponge transplant." *Restoration Ecology* 15(4): 638-651.
- Kagi J.H.R., 1993 - Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. In: *Metallothionein III*. (Suzuki K.T., Imura N., Kimura M., Eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. pp. 29-55.
- Kagi J.H.R., Vallee B.L., 1960 - Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.*, 235:3460-3465.
- Kashman Y, Hirsh S, McConnell OJ, Othani I, Kusumi T, Kakisawa H 1989. Ptilomicalin A: a novel polycyclic guanidine alkaloid of marine sponge origin. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 8925-8926.
- Ker K., Charest C., 2010. Nickel remediation by AM-colonized sunflower. *Mycorrhiza*, 20: 399-406.
- Kernan MR, Molinski TF, Faulkner DJ 1988. Macrocyclic antifungal metabolites from the Spanish dancer nudibranch *Hexabranchus sanguineus* and sponges of the genus *Halichondria*. *J. Org. Chem.* 53: 5014-5020.
- Kinetics in Juvenile Yellow Perch (*Perca flavescens*). *Aquat. Toxicol.*, 75 (2): 108–126.
- 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.*, 49 (4): 520–527.

- Klautau M, Russo CAM, Lazoski C, Boury-Esnault N, Thorpe JP, Solé-Cava AM 1999. Does cosmopolitanism result from overconservative systematics? A case study using the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Evolution* 53(5): 1414-1422.
- 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.
- Konig GM, Wright AD, Angerhofer CK 1996. Novel potent antimalarial diterpene isocyanates isothiocyanates and isonitriles from the tropical marine sponge *Cymbastela hooperi*. *J. Org. Chem.* 61: 3259-3267.
- Konovalov, Yu.D., 1999. Mercury in Fish Organism: Review. *Gidrobiologicheskii Zh.*, 35 (2): 74–89.
- 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*. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 187- 227.
- Kumada H., Kimura S., Yokote M., 1980. Accumulation And Biological Effects Of Cadmium In Rainbow Trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46: 97-103.
- 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.*, 21 (4): 760–761.
- Lathoud JA 1991. *Spongia marina tosta*. In: *Etudes de matiere medicale homeopathique*. Editions Boiron, France. pp 1181-1187.
- Lauchner G 1980. Diseases of Porifera. In: *Diseases of marine animals-I, General Aspects, Protozoa to Gasteropoda*, Kinne O. (ed), Wiley: 139-165.
- Ledda F., Pronzato R. & Manconi R., 2014. Mariculture for bacterial and organic waste removal: a field study of sponge filtering activity in experimental farming *Aquaculture Research*, 45: 1389–1401.

- Legge 18 maggio 1989, n. 183, Norme per il riassetto organizzativo e funzionale della difesa del suolo, Gazzetta Ufficiale del 25 maggio 1989, n. 120.
- Legge 20 marzo 1865, n. 2248 (allegato F), Legge sulle opere pubbliche, in G.U 27 aprile 1865 n. RU 02248 00417 46.
- Legge 5 gennaio 1994, n. 36 Disposizioni in materia di risorse idriche, Supplemento Ordinario n. 11 Gazzetta Ufficiale 19 gennaio 1994, n. 14.
- Legge 5 gennaio 1994, n. 36, "Disposizioni in materia di risorse idriche", *Gazzetta Ufficiale* n. 14 del 19 Gennaio 1994- Supplemento Ordinario n. 11.
- Legge del 10 maggio 1976, n. 319 , Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento, Gazzetta Ufficiale del 29 maggio 1976, n. 141.
- Legge n. 13 del 27 Febbraio 2009, Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 30 dicembre 2008, n. 208, recante misure straordinarie in materia di risorse idriche e di protezione dell'ambiente, G.U. n. 49 del 28 Febbraio 2009; testo coordinato G.U. n. 49 del 28 Febbraio 2008.
- Lim YJ, Lee CO, Hong J, Kim DK, Im KS, Jung JH 2001. Cytotoxic polyacetylenic alcohols from the marine sponge *Petrosia* species. *J Nat Prod* 64(12): 1565-1567.
- Longo, C., G. Corriero, et al., 2010. "Bacterial accumulation by the Demospongiae *Hymeniacidon perlevis*: A tool for the bioremediation of polluted seawater." *Marine Pollution Bulletin* 60(8): 1182-1187.
- 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.
- Luiten EEM, Akkerman I, Koulman A, Kamermans P, Reith H, Barbosa MJ, Spikema D, Wijffels RH 2003. Realizing the promises of marine biotechnology. *Biomol. Eng.* 20: 429-439.
- 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*, 129 (3): 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*, 39 (1-12): 137-144.
- Madri PP, Claus C, Kunen SM, Moss EE 1967. Preliminary studies on the *Escherichia coli* uptake of the redbear sponge *Microciona prolifera* (Verrill). *Life Sci.* 6: 889-894.
- Mahaut M.L., Basuyaux O., Baudinière E., Chataignier C., Pain J., Caplat C., 2013. The porifera *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818) as a bioindicator for water quality monitoring *Environ Sci Pollut Res* 20:2984–2992.
- Maldonado, M., X. Zhang, et al., 2010. "Selective feeding by sponges on pathogenic microbes: A reassessment of potential for abatement of microbial pollution." *Marine Ecology Progress Series* 403: 75-89.
- Mank A, Kilian EF 1979. The ingestion and digestion of food of the freshwater sponge *Spongilla lacustris*. In: Lévi C, Boury-Esnault N (eds) *Biologie des spongiaires*. Vol 291. Paris: Colloques internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique pp. 353-360.
- Margoshes M., Vallee B.L., 1957 - A cadmium binding protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.*, 79:4813-4814.
- Martin D, Uriz MJ 1993. Chemical bioactivity of Mediterranean benthic organisms against embryos and larvae of marine invertebrates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 173: 11-27.
- 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.*, 38 (3): 283–297.
- Mayer AMS 1999. Marine pharmacology in 1998: antitumoral and cytotoxic compounds. *Pharmacologist* 41(4): 159-164.
- Mayer-Pinto, M., A. J. Underwood, et al., 2010. "Effects of metals on aquatic assemblages: What do we really know?" *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 391(1-2): 1-9.
- McCarthy PJ, Pitts TP, Gunawardana GP, Kelly-Borges M, Pomponi SA 1992. Antifungal activity of meridine a natural product from the marine sponge *Corticium sp.* *J. Nat. Prod.* 55: 1664-1668.

- 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.
- Mendola D 2003. Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: processes developments and economics. *Biomol. Eng.* 20: 441-458.
- Mercury and its Teratogenic Effect upon Larvae of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae), *Biologia Vnutrennih*, 1: 99–107.
- Milanese M, Sarà A, Manconi R, Pronzato R., 2003. Sponge population survey along the South-Eastern coast of the Sinai Peninsula. 38th EMBS, Aveiro (Portogallo), 08-13/09/2003.
- Milanese, M., E. Chelossi, et al., 2003. "The marine sponge *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862 as an elective candidate for bioremediation in integrated aquaculture." *Biomolecular Engineering* 20(4-6): 363-368.
- Moore HF 1910. A practical method of sponge culture. *Bull. Bureau Fisheries* 28: 545-585.
- Moore, B.C., Dasgupta, N., Martinez, E.A. and Schaumloffel, J., 2002. The Potential Association Between Menthum Deformities and Trace Elements in Chironomidae (Diptera) taken From a Heavy Metal Contaminated River, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 42 (3): 286–291.
- Müller WEG 2003. Sponges (Porifera). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 258.
- Müller WEG, Korzhev M, Le Penne G, Müller IM, Schröder HC, 2003. Origin of metazoan stem cell system in sponges: first approach to establish the model (*Suberites domuncula*). *Biomol. Eng.* 20: 369-379.
- Müller WEG, Müller WEG, 2003. Analysis of the sponge [Porifera] gene repertoire: implications for the evolution of the metazoan body plan. In: Müller WEG (ed) *Sponges (Porifera)*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp1-33.
- 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*, 149 (1): 44-58.

- Nickel M 2001. Cell biology and biotechnology of marine invertebrates. Sponges (Porifera) as model organisms. Arbeiten und Mitteilungen aus dem Biologischen Institut der Universität Stuttgart pp 32-149.
- Nishiyama GK, Bakus GJ 1999. Release of allelochemicals by three tropical sponges (Demospongiae) and their toxic effects on coral substrate competitors. *Memoirs of the Queensland Museum* 44: 411-417.
- Nogata Y, Yoshimura E, Shinshima K, Kitano Y, Sakaguchi I 2003. Antifouling substances against larvae of the barnacle *Balanus amphitrite* from marine sponges *Acanthella cavernosa*. *Biofouling* 19: 193-196.
- Oclarit JM, Okada H, Ohta S, Kaminura K, Yamaoka Y, Iizuka T, Miyashiro S, Ikegami S 1994. Anti-Bacillus substance in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium. *Microbios* 78: 7-16.
- Ogra Y., Suzuki K.T., 2000 - Nuclear trafficking of metallothionein: possible mechanisms and current knowledge. *Cell. Mol. Biol.*, 46:357-365.
- Olsson I.M., Eriksson J., Oborn I., Skerfving S., Oskarsson A., 2005 - Cadmium in food production systems: a health risk for sensitive population groups. *Ambio*, 34:344-351.
- Pan, K., O. O. Lee, et al., 2011. "Sponges and sediments as monitoring tools of metal contamination in the eastern coast of the Red Sea, Saudi Arabia." *Marine Pollution Bulletin* 62(5): 1140-1146.
- Pansini M, Pronzato R 1990. Observations on the dynamics of a Mediterranean sponge community. In: *New perspectives in sponge biology*, Ruetzler K (ed), Smithsonian Institute Press, Washington DC: 404-415.
- Patel, B., M. C. Balani, et al., 1985. "Sponge 'sentinel' of heavy metals." *Science of The Total Environment* 41(2): 143-152.
- Pawlik JR, Chanas B, Toonen RJ, Fenical W 1995. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. *Mar Ecol Prog Ser* 127: 183-194.
- Peakall U.K., Walker C.H., 1994 – The role of biomarker in environmental assessment. *Ecotoxicol.*, 3:173-179.

- Perry NB, Blunt JW, Munro MHG, Pannell LK 1988. Mycalamide A an antiviral compound from a New Zealand sponge of the genus *Mycale*. *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4850-4851.
- 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.
- Petit GR 1991. The bryostatins. In: Herz W, Grisebach H, Kirby GW, Tamm C (eds) *Progress in the chemistry of organic natural products*, Springer Verlag, New York pp 153-195.
- Podgurskaya, O.V., Kavun, V.Ya. and Lukyanova, 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.
- Pomponi SA 1999. The bioprocess-technological potential of the sea. *J. Biotechnol.* 70: 5-13.
- Pomponi SA, Willoughby R 1994a. Sponge cell culture for production of bioactive metabolites. In: van Soest RWM, Kempen TMG, Braekman SC (eds). *Sponge in time and space*. Balkema, Rotterdam: 395-400.
- Pomponi SA, Willoughby R 1994b. Recent progress in marine sponge cell culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 30A: 30.
- Porter JW 2001. The ecology and etiology of newly emerging marine diseases. *Hydrobiologia* 460: 1-228.
- Porter JW, Targett WM 1988. Allelochemical interactions between sponges and corals. *Biol. Bull.* 175: 230-239.
- 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*, 13 (6): 519–533.
- Proksch P, Edrada RA, Ebel R 2002. Drugs from the seas-current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 59: 125-134.
- Pronzato 2002. A climber sponge. VI International Sponge Conference, Rapallo, 29/09-05/10/2002.

- Pronzato R 1999. Sponge-fishing, disease and farming in the Mediterranean Sea. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 9: 485-493.
- Pronzato R, Cerrano C, Cubeddu T, Lanza S, Magnino G, Manconi R, Pantelis J, Sarà A, Sidri M 1998. Sustainable development in coastal areas: role of sponge farming in integrated aquaculture. Book of Abstract. *Aquaculture and Water. Fish culture, shell fish culture and water usage.* EAS 26: 231-232.
- Pronzato R, Manconi R, Milanese M, Sarà A, Ferretti C, Cerrano C, Pansini M, Chelossi E 2003. Impiego sperimentale dei poriferi in maricoltura integrata finalizzata alla depurazione delle acque ed alla produzione di molecole bioattive. Relazione finale V Piano Triennale Ministero Politiche Agricole e Forestali, progetto N° 5 C 155.
- Pronzato R, Rizzello R, Dessy E, Corriero G, Scalera Liaci L 1996. Distribuzione e pesca di *Spongia officinalis* lungo il litorale pugliese. *Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova* 60-61: 79-89.
- Pulitzer-Finali G 1983. A collection of Mediterranean Demospongiae (Porifera) with, in appendix, a list of the Demospongiae hitherto recorded from the Mediterranean Sea. *Ann. Mus. St. Nat. G. Doria Genova* 84: 445-621.
- 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*, 120 (3): 497-507.
- Rao, J. V., P. Kavitha, et al., 2006. "*Petrosia testudinaria* as a biomarker for metal contamination at Gulf of Mannar, southeast coast of India." *Chemosphere* 65(4): 634-638.
- Rasmont R 1961. Une technique de culture des éponges d'eau douce en milieu contrôlé. *Ann. Soc. R. Zool. Belg.* 91:147-156.
- Regoli F, Cerrano C, Chierici E, Bompadre S 2000. Susceptibility to oxidative stress of the Mediterranean demosponge *Petrosia ficiformis*: role of endosymbionts and solar irradiance. *Marine Biology* 137: 453-461.
- Reilly, C., 1991. Metal contamination of food. 2nd ed., *Elsevier, Essex*, 152-175.

- Reiswig HM 1971a. Particle feeding in natural populations of three marine Demosponges. *Biol. Bull.* 141: 568-591.
- Reiswig HM 1971b. In situ pumping activity of tropical Demospongiae. *Mar. Biol.* 9: 38-50.
- Reiswig HM 1975. Bacteria as food for temperate-water marine sponges. *Can. J. Zool.* 53: 582-589.
- 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.
- Riisgård HU, Thomassen S, Jakobsen H, Weeks JM, Larsen PS 1993. Suspension feeding in marine sponges *Halichondria panicea* and *Haliclona urceolus*: effects of temperature on filtration rate and energy cost of pumping. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 96:177-188.
- Rinkevich B 1999. Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. *J. Biotechnol.* 70: 133-153.
- Saby, E., J. Justesen, et al., 2009. "In vitro effects of metal pollution on Mediterranean sponges: Species-specific inhibition of 2',5'-oligoadenylate synthetase." *Aquatic Toxicology* 94(3): 204-210.
- Sanders B.M., Martin L.S., Nelson W.G., Phelps D.K., Welch W., 1991. Relationships between accumulation of a 60 kDa stress protein and scope-for-growth in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. *Marine Environmental Research* 31 (2): 81-97.
- Sarà M 1973. Animali filtratori ed autodepurazione nel mare: il ruolo dei poriferi. *Atti III Simposio Nazionale sulla Conservazione della Natura, Bari 02-06/05/1973. Vol I: 35- 52.*
- Sarà M 1999. Il ruolo dei Poriferi nella biodiversità, struttura e dinamica del coralligeno del Mediterraneo. *Biologia Marina Mediterranea* 6(1): 144-150.
- Sarà M 2003. Evoluzione e speciazione. In Cicogna F, Bianchi CN, Ferrari G, Forti P (eds) *Grotte marine. Cinquant'anni di ricerca in Italia. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio* 233-240.
- Sarà M, Bavestrello G, Cattaneo-Vietti R, Cerrano C 1998. Endosymbiosis in sponges: relevance for epigenesis and evolution. *Symbiosis* 25: 57-70.

- Sarà M, Scalera-Liaci L 1964. Associazione fra la cianoficea *Aphanocapsa feldmanni* e alcune demospongie marine. Boll. Zool. 31:55-65.
- Sarkar A., Ray D., Shrivastava A.N., Sarker S., 2006. Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. Ecotoxicology 15: 333-40.
- Sata NU, Matsunaga S, Fusetani N 1999. Aurantosides D E and F: new antifungal tetramic acid glycosides from the marine sponge *Siliquariaspongia japonica*. J. Nat. Prod 62: 969-971.
- Scalera Liaci L, Mercurio M, Palladino F, Massari S, Corriero G 1999. The farming of Mediterranean commercial sponges in the Marine Reserve of Porto Cesareo (LE). Biol. Mar. Medit. 6(1): 110-118.
- Scalera-Liaci L, Sciscioli M 1975. Sexual cycles of some marine Porifera. Pubbl. Staz. Zool. Napoli 39 suppl: 307-316.
- Schmitz FJ 1994. Cytotoxic compounds from sponges and associated microfauna. In: van Soest RWM, Kempen TMG, Braekman SC (eds). Sponge in time and space. Balkema, Rotterdam: 485-496.
- Schröder HC, Kljajić Z, Weiler BE, Gasić M, Uhlenbruck G, Kurelec B, Müller WEG 1990. The galactose-specific lectin from the sponge *Chondrilla nucula* displays anti-human immunodeficiency virus activity in vitro via stimulation of the (2'-5')oligodeanelylate metabolism. Antiviral Chemistry & Chemotherapy 1(2): 99-105.
- Searle PA, Molinski TF 1995. Phorboxazoles A and B: potent cytostatic macrolides from marine sponge *Phorbas* sp. J. Am. Chem. Soc. 117: 8126-8131.
- Searle PA, Richter RK, Molinsky TF 1996. Bengazoles C-G from the sponge *Jaspis* sp. Synthesis of the side chain and determination of absolute configuration. J. Org. Chem. 61: 4073-4079.
- Selvin, J., S. S. Priya, et al., 2009. "Sponge-associated marine bacteria as indicators of heavy metal pollution." Microbiological Research 164(3): 352-363.
- Sepčić K, Batista U, Vacelet J, Macek P, Turk T 1997. Biological activities of aqueous extracts from marine sponges and cytotoxic effects of 3-alkylpyridinium polymers from *Reniera sarai*. Comp. Biochem. Physiol. 117C: 47-53.

- Serra, R., Carpene, 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.
- Shugart L.R., McCarthy J.F., Halbrook R.S., 1992 - Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Anal.*, 12:353-360.
- Sidri M, Milanese M, Brümmer F, Pronzato R 2003. Oogenesis in the Mediterranean sponge *Chondrilla nucula* (Porifera, Demospongiae): general morphological aspects. 69. Jahrsversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Berlino (Germania), 09-13/06/2003.
- Sidri M, Milanese M, Brümmer F, Pronzato R, Ferretti C 2002. Reproductive aspects of *Chondrilla nucula* in the Mediterranean Sea. VI International Sponge Conference, Rapallo, 29/09-05/10/2002.
- Simpson TL 1984. The cell biology of sponges. New York: Springer-Verlag pp.661.
- 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.
- 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., 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., 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.
- 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.

- Spehar R.L., Anderson R.L., Fiandt J.T., 1978. Toxicity And Bioaccumulation Of Cadmium And Lead In Aquatic Invertebrates. *Environ Pollut* 15 (3): 195-208.
- 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., M. Licciano, et al., 2006. "Filtering activity of *Spongia officinalis* var. *adriatica* (Schmidt) (Porifera, Demospongiae) on bacterioplankton: Implications for bioremediation of polluted seawater." *Water Research* 40(16): 3083-3090.
- Stabili, L., M. Licciano, et al., 2008. "Evaluation of microbiological accumulation capability of the commercial sponge *Spongia officinalis* var. *adriatica* (Schmidt) (Porifera, Demospongiae)." *Water Research* 42(10-11): 2499-2506.
- Storelli M.M. Intake of essential minerals and metals via consumption of seafood from the Mediterranean Sea. *J Food Prot* 2009, 72, (5), 1116-20.
- Storr JF 1964. Ecology of the Gulf of Mexico commercial sponges and its relation to fishery. US Dept. Interior Wildlife Service, Special Scientific Report 466: 1-73.
- 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.
- Swearingen III DC, Pawlik JR 1998. Variability in the chemical defense of the sponge *Chondrilla nucula* against predatory reef fishes. Contribution n° 183 of the UNCW Center for Marine Science Research.
- 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.
- Terlizzi A, Fraschetti S, Gianguzza P, Faimali M, Boero F 2001. Environmental impact of antifouling technologies: state of the art and perspectives. *Aquatic. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 11: 311-317.
- Thacker RW, Becerro MA, Lumbang WA, Paul VJ 1998. Allelopathic interactions between sponges on a tropical reef. *Ecology* 79: 1740-1750.

- the forest floor as a result of Cracow urban pollution. *Environment International*, vol. 28, no. 8, pp. 691-698.
- Thomann, R.V., 1989. Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.*, 23, 699-707.
- Topçu, N. E., T. Pérez, et al., 2010. "In situ investigation of *Spongia officinalis* (Demospongiae) particle feeding: Coupling flow cytometry and stable isotope analysis." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 389(1-2): 61-69.
- Topsent E 1934. Étude d'éponges littorales du Golfe de Gabès. *Bull. Stn. Agric. Pêche Castiglione* 2: 68-102.
- Tramper J, Battershill C, Brandenburg W, Burgess G, Hill R, Luiten E, Müller WGM, Osinga R, Rorrer GI, Tredici M, Uriz M, Wright P, Wijffels R 2003. What to do in marine biotechnology? *Biomol. Eng.* 20: 467-471.
- Tsoukatou M, Hellio C, Vagias C, Harvala C, Roussis V 2002. Chemical defense and antifouling activity of three Mediterranean sponges of the genus *Ircinia*. *Z. Nzturforsch* 57c: 161-171.
- Tsukamoto S, Kato H, Hirota H, Fusetani N 1996a. Ceratinamides A and B: new antifouling dibromotyrosine derivatives from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Tetrahedron* 52(24): 8181-8186.
- Tsukamoto S, Kato H, Hirota H, Fusetani N 1996b. Ceratinamide: an unprecedented antifouling cyanoforamide from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *J. Org. Chem.* 61(9): 2936-2937.
- Uriz MJ, Turon X, Becero MA, Galera J 1996. Feeding deterrence in sponges. The role of toxicity, physical defenses, energetic contents, and life-history stage. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 205: 187-204.
- Usher KM, Kuo J, Fromont J, Sutton DC 2001. Vertical transmission of cyanobacterial symbionts in the marine sponge *Chondrilla australiensis* (Demospongiae). *Hydrobiologia* 461: 15-23.
- Vacelet J 1975. Etude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et sponges du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *J. Microsc. Biol. Cell.* 23: 271-288.

- Vacelet J 1991. Statut des éponges commerciales en Méditerranée. In : Boudouresque CF et al (eds) Les espèces marines à protéger en Méditerranée, France, GIS Posidonie pp. 35-42
- Vacelet J, Donadey C 1977. Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 30: 301-314.
- Van de Vyver G, Vray B, Belaouane S, Toussaint D 1990. Efficiency and selectivity of microorganism retention by Ephydatia fluviatilis. In: Rützler K (ed) New perspectives in Sponge Biology. Washington DC, Smithsonian Institute Press, 1990; 511-515.
- 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.
- Venkateswara Rao, J., K. Srikanth, et al., 2009. "The use of marine sponge *Haliclona tenuiramosa* as bioindicator to monitor heavy metal pollution in the coasts of Gulf of Mannar, India." Environmental Monitoring and Assessment 156(1): 451-459.
- Verdenal B, Vacelet J 1990. Sponge culture on vertical ropes in the north-western Mediterranean sea. In: Rutzler K (ed), New perspectives in Sponge Biology. Smithsonian Inst Press, Washington D.C, 416-424.
- 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.
- Vicente VP 1985. Overgrowth activity by the encrusting sponge *Chondrilla nucula* on a coral reef in Puerto Rico. In: Rützler K (ed) New perspectives in sponge biology. Smithsonian Institution Press Washington DC London, pp 436-442.
- Vicente VP 1989. Regional commercial sponge extinction in the West Indies: are recent climatic changes responsible? P.S.Z.N.I. Mar. Ecol. 10: 179-191.
- Waddell B, Pawlik JR 2000a. Defenses of Caribbean sponges against invertebrate predators. I. Assays with hermit crabs. Mar Ecol Prog Ser 195: 125-132.

- Waddell B, Pawlik JR 2000b. Defenses of Caribbean sponges against invertebrate predators. II. Assays with sea stars. *Mar Ecol Prog Ser* 195: 133-144.
- Wahl M 1989. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 58, 75-189.
- Wallase, 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.
- Widdows, J. and P. Donkin, 1992. "Mussels and environmental contaminants: Bioaccumulation and physiological aspects." *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*: 383-424.
- Wilkinson CR 1978. Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar. Biol.* 49: 161-167.
- Wilkinson CR 1983. Role of sponges in coral reef structural processes. In: Barnes DJ (Ed) *Perspectives on Coral Reefs* pp. 263-274.
- Wilkinson CR, Nowak M, Austin B, Colwell RR 1981. Specificity of bacterial symbionts in Mediterranean and Great Barrier Reef sponges. *Microbial Ecology* 7: 13-21.
- Willemsen PR 1994. The screening of sponge extracts for antifouling activity using a bioassay with laboratory-reared cyprid larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 5: 361-373.
- Willenz P, Vray B, Maillard MP, Van de Vyver G 1986. A quantitative study of the retention of radioactively labelled *E. coli* by the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. *Physiol. Zool.* 59: 495-504.
- Zhang X., Zhang W., Xue L., Zhang B., Jin M., Fu W., 2010. Bioremediation of bacteria pollution using the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* in the intensive mariculture water system of turbot *Scophthalmus maximus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 105 (1): 59-68.
- Zheng Z, Zeng W, Huang Y, Yang Z, Li J, Cai H, Su W 2000. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organisms associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Lett.* 188: 87-91.

RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questa esperienza difficoltosa ma ricca di soddisfazioni che ha arricchito le mie conoscenze scientifiche desidero ringraziare quanti hanno contribuito alla realizzazione della mia tesi di Dottorato ed in particolare tutti coloro che hanno creduto nel mio progetto e che mi hanno sostenuto nei momenti più delicati.

Desidero porgere i miei più sinceri ringraziamenti al Prof. Antonio Mazzola, per la sua professionalità e soprattutto per avermi dato la possibilità di realizzare questo lavoro.

Ringrazio di cuore la Prof.ssa Margherita Ferrante e lo staff del Laboratorio di Igiene Ambientale dell'Università degli Studi di Catania.

In particolare ringrazio con stima e affetto la Dott.ssa Chiara Copat per l'aiuto e per l'incoraggiamento ricevuto, la Dott.ssa Alfina Grasso e il Dott.re Giovanni Arena per la collaborazione e per l'amicizia ricevuta.

Ringrazio la Dott.ssa Giusy Privitera per il valido aiuto nella realizzazione dei test di laboratorio.

Ringrazio sentitamente la Prof.ssa Violetta Brundo per avermi incoraggiato e per aver preso parte nel progetto arricchendo i risultati del mio lavoro.

Ringrazio la Dott.ssa Roberta Pecoraro per il supporto indispensabile e per la sua amicizia e il Dott.re Fabrizio Puglisi per la preziosa collaborazione.

Un grazie particolare lo dedico a mia madre 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.

Grazie al mio compagno di vita per essere stato paziente, per avermi sempre incoraggiata in questa sofferta ma importante avventura.