IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Legge Regionale 27 agosto 1982, n. 59
"Salubrità della fauna ittica delle acque interne abruzzesi"

# VALUTAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE CHIMICA ALLA FOCE DEL FIUME PESCARA MEDIANTE L'UTILIZZO DEI PESCI COME BIOINDICATORI

**Responsabile del progetto**
Carla Giansante

**Collaborazione scientifica**
Riccardo Caprioli
Anna Rita D'Angelo
Gianfranco Diletti
Giuseppe Gatti
Valeria Melai
Sandro Pelini

Si ringrazia inoltre il Sig. Fabio Sprecacenere che a collaborato alle catture di Cefali  Calamita con reti da posta.

# INDICE

**1. INTRODUZIONE ..... 5**

**2. APPROCCIO MULTIDISCIPLINARE ..... 6**

**3. LE COMUNITÀ DELLE ACQUE CORRENTI E LA LORO FUNZIONE ECOLOGICA ..... 8**

**3.1 Le comunità ittiche ..... 8**

**4. PERTURBAZIONI ALL'ECOSISTEMA ACQUATICO ..... 11**

**4.1 Inquinamento ..... 12**

**4.2 Direttiva quadro sulle acque: Water Framework Directive (WFD) ..... 13**

**5. BIOCONCENTRAZIONE E BIOACCUMULO ..... 15**

**5.1. Biodisponibilità ..... 15**

**5.2. Effetti degli inquinanti sul biota ..... 15**

**6.BIOMONITORAGGIO ..... 20**

**6.1 Bioindicatori ..... 20**

6.1.2. Pesci ..... 22

**6.2 Biomarcatori ..... 23**

**7. LA CONTAMINAZIONE DELL'AREA INDUSTRIALE DI BUSSI OFFICINE (PE) - CONSULENZA TECNICA PER LA PROCURA DELLA REPUBBLICA DEL TRIBUNALE DI PESCARA (DI MOLFETTA & FRACASSI) ..... 26**

**8. OBIETTIVI ..... 33**

**9. MATERIALI E METODI ..... 34**

**9.1 Area di studio ..... 34**

**9.2 Campionamento di fauna ittica ..... 35**

**9.3 Indici di condizione ..... 36**

**9.4 Analisi riproduttiva ..... 38**

9.4.1 Valutazione del sesso ..... 38

9.4.2 Valutazione dello stato di maturità ..... 38

9.4.3 Preparazione dei campioni per analisi istologiche ..... 38

9.4.4 Istologia ..... 38

**9.5 Test del Micronucleo (MN) ..... 40**

9.5.1 Preparazione degli strisci di sangue ..... 41

9.5.2 Lettura dei vetrini ed elaborazione dei dati ..... 42

**9.6 Analisi chimiche ..... 44**
**9.7 Analisi statistiche ..... 44**
**10.RISULTATI ..... 45**
**10.1 Campionamento di fauna Ittica ..... 45**
**10.2 Dati biometrici ..... 45**
**10.3 Indici di condizione ..... 46**
**10.4 Analisi riproduttiva ..... 47**
10.4.1 Valutazione del sesso ..... 47
**10.4.2 Valutazione dello stato di maturità ..... 47**
**10.5 Test del Micronucleo ..... 53**
**10.6 Analisi chimiche nei muscoli dei Cefali Calamita ..... 54**
10.6.1 Metalli Pesanti ..... 54
10.6.2 Diossine e PCB ..... 54
10.6.3 Pesticidi organoclorurati e organofosforati ..... 56
**11. DISCUSSIONE ..... 57**
**11.1 Valutazione dello stato riproduttivo ..... 57**
**11.2 Test del Micronucleo ..... 59**
**11.3 Inquinamento chimico da metalli pesanti, diossine e PCB ..... 60**
**12. CONCLUSIONI ..... 63**
**13. BIBLIOGRAFIA ..... 64**

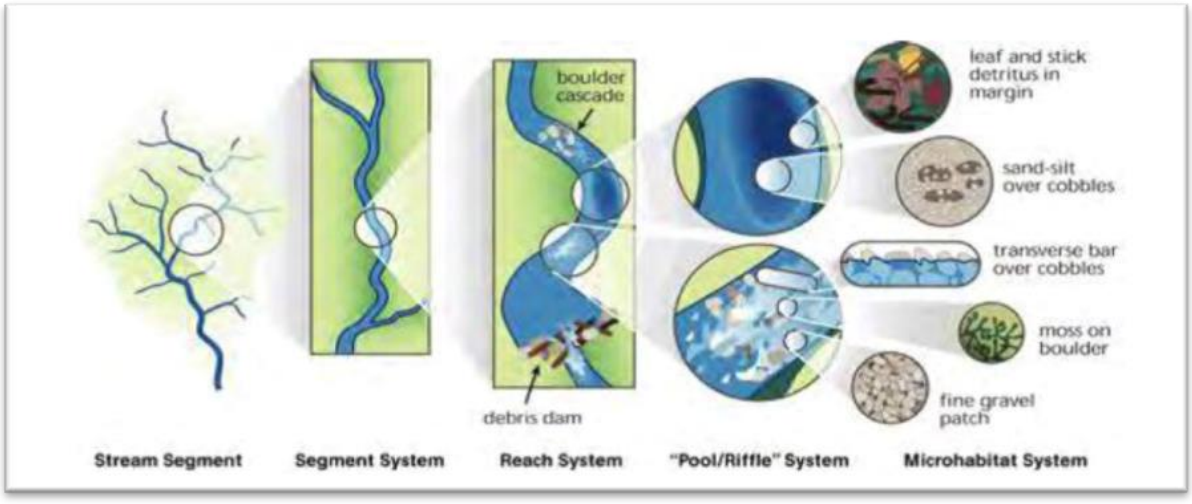
# 1. INTRODUZIONE

La qualità ambientale è strettamente connessa alla qualità della vita, anche attraverso la sicurezza degli alimenti. Una migliore qualità della vita, secondo una visione non antropocentrica, ma ecosistemica e in funzione del mondo animale e vegetale, rende un paese civile. L'Unione Europea, negli ultimi vent'anni, ha fortemente raccomandato la protezione dell'ambiente, soprattutto delle risorse idriche e degli ecosistemi acquatici poiché rivestono un ruolo chiave. L'acqua è l'elemento di maggior importanza all'interno di un ecosistema e rappresenta la risorsa indispensabile per la vita e per tutte le attività umane. Da qualche anno, le sempre più crescenti pressioni antropiche hanno posto l'accento sulla gravità del problema acqua, sulla estrema vulnerabilità e non sostenibilità dell'uso di tale risorsa, evidenziando, con sempre maggior intensità e frequenza, accentuati fenomeni di degrado quali-quantitativo (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Conoscere gli effetti dell'inquinamento e le diverse forme di stress che le attività antropiche esercitano sugli ecosistemi naturali e seminaturali è un passo fondamentale per la corretta gestione del territorio e delle comunità naturali; tale conoscenza rappresenta una grande ricchezza che permette di prevedere con anticipo il futuro del genere umano (ISPRA, 2012).

# 2. APPROCCIO MULTIDISCIPLINARE

Si può pensare ad un fiume come ad un sistema che si sviluppa secondo quattro dimensioni: laterale (da sponda a sponda), verticale (dalla superficie dell'acqua al fondo), temporale e longitudinale (dalla sorgente alla foce) secondo il modello elaborato da Ward nel 1989.
Il *River Continuum Concept* esprime il senso di valutazione longitudinale. La dimensione laterale, invece, coinvolge le interazioni che avvengono tra l'alveo fluviale, la zona riparia e il territorio circostante, compreso l'ambiente iporreico. Questa dimensione ha un'enorme importanza per la presenza di zone filtro, costituite dalle fasce di vegetazione riparia e dai meandri fluviali, che hanno un'alta efficienza depurativa per il corso d'acqua.
La dimensione verticale, investe i rapporti tra l'acqua che scorre nell'alveo e la quota che s'infiltra tra gli interstizi del subalveo fino a raggiungere la falda. In questa dimensione entrano anche gli interscambi tra aria e acqua e la vita che si svolge sull'interfaccia. La comunità dell'ambiente iporreico è caratterizzata dalla presenza di batteri, funghi, e micrometazoi, che, insieme ai macroinvertebrati epibentonici che vi si possono rifugiare, svolgono un'importantissima azione filtrante e autodepurante del corso d'acqua.
Le scale spazio-temporali (Figura 2.1) si estendono da quella di bacino o di tratto di fiume a quella di microhabitat; questa considerazione è importante perché molti processi ecologici significativi si svolgono e possono venire osservati o studiati su più livelli, e anche perché molte delle caratteristiche proprie di un certo livello del sistema fluviale vengono influenzate da quelle appartenenti a livelli più elevati. La sensitività temporale del fiume ai cambiamenti, inoltre, tende a diminuire all'aumentare della scala spaziale considerata.

**Figura 2.1.** Scale spaziali di un ecosistema fluviale.




All'interno di ogni tratto sono presenti microhabitat quali pozze, ondulazioni e dune, cascate o rapide, zone di ristagno. A questa scala di sotto-tratto divengono rilevanti la superficie del substrato e la fascia iporreica (al di sotto di questa superficie) così come tutti i processi di scambio da cui esse sono interessate. Le dune e le ondulazioni si presentano spesso in zone di acque poco profonde con un fondo costituito da pietre o ghiaie in cui la corrente presenta

velocità più elevate e caratteristiche di turbolenza maggiormente accentuate che altrove. Esse sono solitamente alternate a pozze, zone di acque più lente, calme e profonde, con un fondo caratterizzato da sedimenti a granulometria più fine. L'alternanza di queste due zone è detta sequenza riffle-pull ed è frequente nei sistemi fluviali. La scelta della scala appropriata permette di studiare con le metodiche appropriate ogni componente intrinseca delle dinamiche fluviali e le interazioni che s'instaurano tra di esse.

# 3. LE COMUNITÀ DELLE ACQUE CORRENTI E LA LORO FUNZIONE ECOLOGICA

La vita nelle acque correnti è caratterizzata da una variazione continua delle condizioni ambientali, dalla sorgente alla foce dei fiumi. In prossimità della sorgente il corso d'acqua dipende dall'immissione di detrito proveniente dal terreno circostante. All'aumentare dell'ampiezza del corso d'acqua, le alghe e le macrofite diventano importanti fonti di energia per l'ecosistema acquatico e, di conseguenza, cambiano anche le comunità che lo popolano. In prossimità della foce, i fiumi dipendono dal particolato fine e dalla sostanza organica disciolta come fonte primaria di energia e nutrienti. Qui le specie dominanti sono invertebrati filtratori e pesci bentonici.
La componente planctonica assume importanza nei tratti potamali e comprende organismi produttori (fitoplancton) e organismi consumatori (zooplancton).
Il fattore di maggiore importanza per gli insediamenti biologici è la velocità di corrente e, quasi sempre in buona correlazione con essa, la natura del substrato, la temperatura e la quantità di ossigeno disciolto. Ne deriva che i principali componenti delle comunità animali dell'ambiente lotico sono le biocenosi bentoniche, le comunità di macroinvertebrati e quelle dotate di un'attiva capacità di nuoto: le comunità ittiche.

## 3.1 Le comunità ittiche

I Pesci sono tra gli animali che maggiormente caratterizzano gli ecosistemi fluviali: trascorrono tutta la loro vita nell'acqua e molti di essi svolgono l'intero ciclo biologico nei fiumi (mentre altri prediligono i laghi e altri ancora migrano fra il mare e i corsi d'acqua). Molte specie rivestono una grande importanza per l'uomo essendo oggetto di pesca, per motivi sia professionali sia dilettantistici, e di acquacoltura. In vari luoghi della Terra i Pesci che vivono nei fiumi sono una parte fondamentale dell'alimentazione umana.
La fauna ittica d'acqua dolce si compone di due distinte classi di Vertebrati: i Ciclostomi (*Cyclostomata*) e i Pesci Ossei (*Osteichthyes*). Generalmente la variazione della composizione delle specie ittiche lungo tutta l'asta fluviale è definita dal principio di "zonazione ittica" attraverso la quale gli ambienti fluviali sono suddivisi in base alle caratteristiche ecologiche e morfodinamiche. Nella maggior parte dei corsi d'acqua italiani possono essere individuate 4 zone (Zerunian, 1982) caratterizzate dalla presenza di alcune specie con diverse esigenze bio-ecologiche, appartenenti alle Famiglie dei Salmonidi, dei Ciprinidi e dei Mugilidi (Figura 3.1). Ciascuna zona presenta proprie caratteristiche ambientali, che dipendono principalmente dalla pendenza del terreno su cui scorre il fiume, dalla sua portata e dalla vicinanza con il mare; in alcuni corsi d'acqua, in funzione di ripetuti cambiamenti nella pendenza del terreno, le zone dei tratti medio-alti possono alternarsi.

La zonazione ittica dei corsi d'acqua italiani è basata sulle seguenti zone:
ZONA DEI SALMONIDI (specie tipiche Trota fario e Trota macrostigma) caratterizzata da:

- acqua dolce, limpida e ben ossigenata;

- corrente molto veloce, con presenza di rapide;
- fondo a massi, ciottoli o ghiaia grossolana;
- scarsa o moderata presenza di piante acquatiche;
- temperatura fino a 16-17 °C, ma generalmente inferiore.

ZONA DEI CIPRINIDI A DEPOSIZIONE LITOFILA (dal greco *lithos* = "pietra"; specie tipiche Barbo, Barbo canino, Vairone) che depongono cioè uova e spermatozoi sulla ghiaia, caratterizzata da:

- acqua dolce e limpida, soggetta però a torbide di breve durata, discretamente ossigenata;
- corrente veloce, alternata a zone dove l'acqua rallenta e la profondità è maggiore;
- fondo con ghiaia fine e sabbia;
- moderata presenza di piante acquatiche; temperatura raramente superiore a 19-20 °C.

ZONA DEI CIPRINIDI A DEPOSIZIONE FITOFILA (dal greco *phyton* = "pianta"; specie tipiche Tinca, Scardola, Triotto) che depongono cioè uova e spermatozoi sulle piante acquatiche, caratterizzata da:

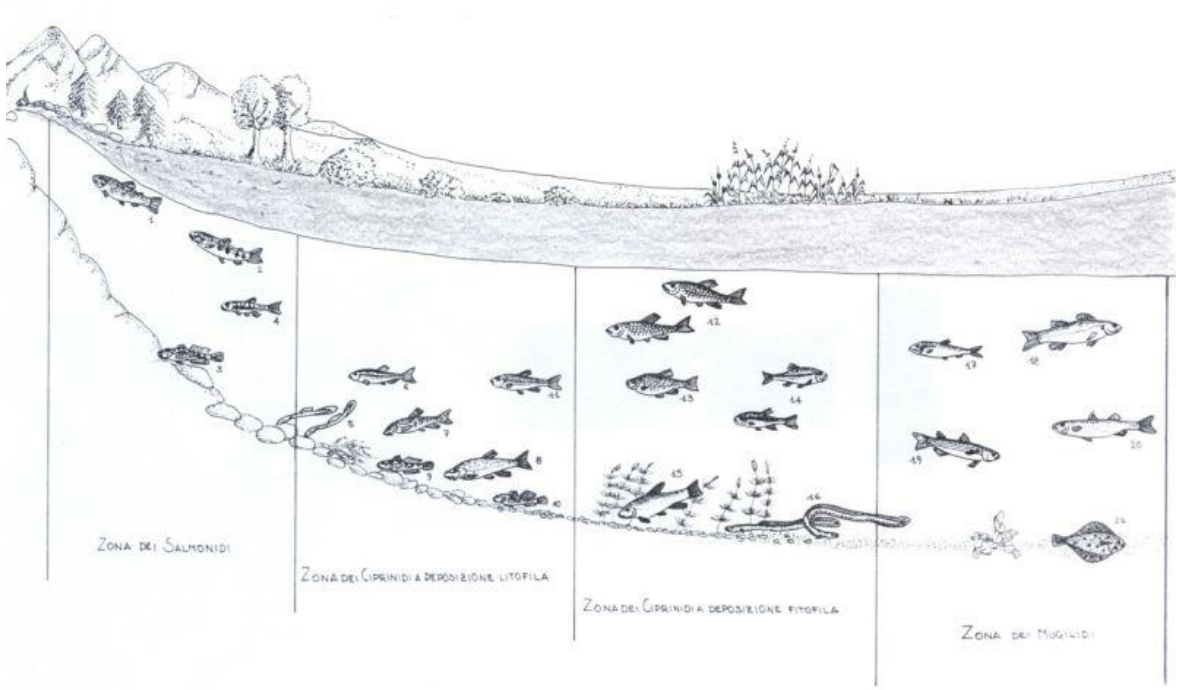
- acqua dolce frequentemente torbida e solo moderatamente ossigenata in alcuni periodi;
- bassa velocità della corrente;
- fondo fangoso;
- abbondanza di piante acquatiche; temperatura fino a 24-25°C.

ZONA DEI MUGILIDI (specie tipiche Cefalo, Muggine Calamita, Muggine Labbrone) caratterizzata da:

- acqua salmastra in seguito al rimescolamento delle acque dolci fluviali con quelle salate marine;
- bassa velocità della corrente;
- fondo fangoso;
- moderata presenza di piante acquatiche;
- temperatura, concentrazione di ossigeno e torbidità molto variabili, anche in funzione delle maree.

La zonazione ittica di un corso d'acqua non va considerata in modo rigido, perché non esistono confini netti fra le varie zone e perché alcune specie, come ad esempio l'Anguilla e il Cavedano, possono essere presenti in uno stesso momento in più zone; bisogna poi considerare che in alcuni ambienti particolari, come le risorgive, possono convivere specie normalmente distribuite in zone diverse.

**Figura 3.1.** Zonazione dei corsi d'acqua. Da sinistra verso destra: Zona dei Salmonidi, Zona dei Ciprinidi a deposizione litofila, Zona dei Ciprinidi a deposizione fitofila, zona dei Mugilidi.




Indubbiamente, a livello di microscala, la presenza delle specie è influenzata dalla varietà e dalla disponibilità di microhabitat ove le specie ittiche siano in grado di compiere l'intero ciclo vitale (riproduzione, primo accrescimento).
È pertanto comprensibile come in generale interventi di regimazione, presenze di captazioni e tagli della vegetazione riparia e acquatica influiscano in maniera pesante sulla disponibilità di nicchie ecologiche idonee, determinando una drastica riduzione della diversità ambientale (perdita di habitat) con conseguente decremento della diversità ittica.
La distribuzione delle specie è complicata da fattori di tipo biotico, quali ad esempio le interazioni tra specie (competizione, predazione), l'autoecologia delle stesse (preferenze per determinate condizioni idroqualitative e tipologia di microhabitat), le modalità comportamentali nei periodi critici del ciclo vitale (riproduzione, primo accrescimento). A ciò si aggiungono fattori di disturbo, di origine antropica, delle naturali interazioni fra specie, come introduzione di specie alloctone e interventi di ripopolamento.
I Pesci percepiscono in modo sensibile le variazioni ambientali e rispondono a questi stress (Tancioni *et al.*, 2006), quindi sono indicatori efficaci del sistema ambientale circostante per una moltitudine di fattori, tra cui: la loro lunga storia evolutiva, l'ampio spettro adattativo e quindi la capacità di colonizzare la maggior parte degli ambienti acquatici, la collocazione ai livelli più alti della catena trofica, i lunghi cicli vitali, la sistematica più semplice rispetto ad altri gruppi, i meccanismi biochimici e cellulari analoghi ai Vertebrati, fondamentali per prevedere gli eventuali rischi per la salute umana. L'utilizzo dei Pesci come bioindicatori sarà trattato nel dettaglio nel successivo capitolo.

# 4. PERTURBAZIONI ALL'ECOSISTEMA ACQUATICO

Il sistema ambientale è caratterizzato da un'estrema eterogeneità e frammentarietà e le diverse componenti che lo costituiscono interagiscono in vario modo tra loro in un continuo susseguirsi di stati di equilibrio differenti e temporanei in continua evoluzione. Tale dinamismo interno al sistema ambientale è provocato da cause sia naturali sia antropiche (Bonora & Rocco, 2003).
Un corretto approccio di studio del sistema ambientale richiede quindi di rivolgere la massima attenzione ai suoi dinamismi, al continuo divenire del sistema stesso e alle interrelazioni che s'instaurano tra le sue componenti.
Ciò vale a maggior ragione per gli ecosistemi fluviali, caratterizzati naturalmente da perenni mutazioni del loro equilibrio idrologico-morfologico che si riverberano più in generale su quello ecologico.
La reimmissione degli affluenti, la divagazione degli alvei con le continue erosioni o accrescimento delle sponde, le piene annuali o con ricorrenze temporali lunghe, l'abbandono dell'alveo con la creazione di nuovi letti, sono tutte mutazioni naturali degli ecosistemi fluviali che influenzano in modo più o meno marcato anche gli equilibri consolidati della flora e della fauna instaurate lungo le sponde e nelle aree limitrofe.
Il regime idrico dei corsi d'acqua e la loro conformazione geomorfologica hanno subìto inoltre nel tempo numerosi interventi antropici, alcuni di entità rilevante, quali le arginature e le derivazioni d'acqua a uso potabile, irriguo e idroelettrico, con la conseguente alterazione dell'ambiente fluviale naturale.
Tra le principali attività che hanno indotto la trasformazione - e in alcuni casi il degrado - dell'ecosistema fluviale, figurano:

- l'edificazione all'interno delle aree di espansione dei corsi d'acqua;
- la riduzione progressiva della vegetazione ripariale, per convertire i terreni a un'agricoltura più intensiva;
- l'estrazione di inerti (ghiaia e sabbia) dall'alveo;
- la derivazione di quantitativi significativi di acqua;
- la costruzione di dighe e altre opere idrauliche.

Tali modificazioni trovano un immediato riscontro nelle mutazioni paesaggistiche dei luoghi, la cui percezione non è fissa e immutabile, ma varia nel tempo secondo i modelli culturali adottati in quel momento.
Maggiormente pericolose per la vita sono le modificazioni introdotte nelle caratteristiche qualitative degli elementi dell'ecosistema fluviale, in termini non solo di qualità delle acque, ma anche di mantenimento di equilibrati flussi di nutrienti e di sedimenti.
Un corso d'acqua in buone condizioni può ospitare una ricca varietà di organismi animali e vegetali in grado di utilizzare le risorse a disposizione, in un assetto di equilibrio.
La vegetazione ripariale, oltre a costituire ambienti di rilevante valore naturalistico, condiziona i corsi d'acqua regolando i nutrienti e la struttura dei sistemi acquatici, compresa la luce necessaria alla produzione primaria nelle acque. Le foglie che cadono in acqua o che vi sono trasportate dal vento condizionano le catene di detritivori (organismi che si nutrono,

distruggendoli, di rifiuti). Inoltre la presenza di radici e l'accumulo di tronchi condizionano in vario modo il deflusso delle acque.
Le specie che compongono i popolamenti animali e vegetali sono diversamente sensibili alla variazione dei fattori ambientali: i cambiamenti possono essere di tipo stagionale, quando sono legati a fattori climatici ricorrenti, oppure strutturali, quando sono legati a un processo di inquinamento in atto o di trasformazione rilevante del territorio.
Quando l'ecosistema fluviale è perturbato, si assiste, infatti, alla riduzione o alla scomparsa delle specie sensibili e alla dominanza di quelle più resistenti agli inquinanti, con una conseguente diminuzione di complessità dell'ecosistema, cioè una perdita di biodiversità, diretta conseguenza della perdita di autodepurazione e stabilità del sistema fluviale.

## 4.1 Inquinamento

Il Decreto Legislativo n. 152/2006 "Norme in materia ambientale", definisce l'inquinamento idrico come l'effetto dello "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".
L'inquinamento è definito anche come l'immissione o il prelievo nell'ambiente di materia e/o energia tali da provocare un'alterazione persistente e a volte irreversibile delle caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche dell'ecosistema (Della Croce *et al.*, 1997). Questo processo può essere anche di origine naturale (es. eruzioni vulcaniche, alluvioni ecc.), ma è generalmente causato dalle attività antropiche che rappresentano una minaccia sempre più grande per gli ambienti acquatici e le rispettive componenti biotiche.
Le fonti principali di inquinamento sono costituite dall'immissione nelle acque superficiali o sotterranee di reflui urbani, agricoli e industriali. Le sostanze chimiche riversate in questi ambienti possono essere di natura organica (es. solventi, idrocarburi, pesticidi) e inorganica (es. metalli pesanti) e possono produrre effetti più o meno gravi in funzione della loro concentrazione, attività chimica e capacità d'interazione con le funzioni biologiche degli organismi.
Altre gravi forme di alterazione di un ecosistema acquatico sono l'inquinamento termico, causato dagli scarichi a temperature elevate delle centrali termoelettriche, e l'inquinamento legato alle precipitazioni atmosferiche che talvolta possono arrecare danni molto gravi all'intero ecosistema acquatico (es. acidificazione dei laghi del Nord Europa).

Già negli anni '80, la World Conservation Strategy (IUCN/UNEP/WWF, 1980), identifica l'inquinamento come una delle principali minacce per la conservazione della biodiversità e dei processi ecologici essenziali: è la prima volta che un documento internazionale indica in modo esplicito il concetto di "sviluppo sostenibile". In particolare, nel Capitolo V si raccomanda che "lo scarico di sostanze inquinanti e l'uso di pesticidi e di altre sostanze tossiche deve essere controllato". Si deve prestare attenzione per evitare la contaminazione degli habitat di specie uniche minacciate, o economicamente importanti. Dal momento che gli effetti sugli ecosistemi e le specie delle migliaia di sostanze chimiche che entrano

l'ambiente sono in gran parte sconosciuti, dovrebbe essere intrapresa una generale sorveglianza dell'ambiente."
Nonostante questo e altri successivi allarmi del mondo scientifico non si è assistito a una diminuzione delle immissioni nocive per la salute umana e per l'ambiente, anche se negli ultimi decenni si è cercato di approfondire le conoscenze sul destino dei contaminanti ambientali e la loro identificazione, in particolar modo per mezzo della risposta biologica.

## 4.2 Direttiva quadro sulle acque: Water Framework Directive (WFD)

La Direttiva Europea 2000/60/CE, nota come "WFD", Water Framework Directive, rappresenta il più importante e recente atto legislativo comunitario sulla tutela degli ambienti acquatici, istituendo un quadro per la protezione delle acque superficiali e sotterranee con lo scopo di mantenere e migliorare l'ambiente acquatico all'interno della Comunità Europea.
Recepita a livello nazionale con vari decreti emanati dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM) e dal Decreto Legislativo n. 152/2006 "Norme in materia ambientale", mette ulteriormente in luce il ruolo chiave degli elementi biologici nella caratterizzazione dello stato di qualità dei corpi idrici.
Gli obiettivi della Direttiva sono: prevenire l'ulteriore deterioramento, proteggere e migliorare lo stato degli ecosistemi acquatici e delle zone umide associate, promuovere un utilizzo sostenibile dell'acqua basato sulla protezione a lungo termine delle risorse idriche disponibili, assicurare la progressiva riduzione dell'inquinamento delle acque sotterranee e prevenire il loro ulteriore inquinamento, contribuire a mitigare gli effetti delle inondazioni e della siccità.
La valutazione dello stato ambientale è incentrata sull'analisi delle comunità biologiche nell'ecosistema acquatico. Gli elementi biologici richiesti rappresentano i differenti livelli trofici dell'ecosistema: i produttori primari (fitobenthos e macrofite) e i diversi livelli di consumatori (macroinvertebrati e pesci); a supporto delle analisi di queste comunità sono studiati gli elementi chimico-fisici e idromorfologici.
La Direttiva 2000/60/CE, quindi, traccia le linee guida per la tutela degli ambienti fluviali, dando la priorità all'identificazione e classificazione dei corpi idrici e alla definizione delle condizioni di riferimento.
L'identificazione e la classificazione dei corpi idrici hanno come obiettivo quello di distinguere, all'interno del territorio di ogni Stato membro, le differenti tipologie fluviali al fine di permettere delle analisi comparative tra corsi d'acqua dello stesso tipo (valutazioni tipo-specifiche).
Per ciascuna tipologia fluviale sono poi definite delle condizioni di riferimento, per risalire allo stato di qualità ecologica o stato ecologico, cioè allo stato delle varie componenti dell'ecosistema fluviale e principalmente dei suoi elementi biotici.
L'identificazione delle condizioni di riferimento (che rappresentano il top di una determinata situazione), è richiesta per fornire un modello rispetto al quale misurare gli effetti delle attività umane passate e presenti su ogni corpo d'acqua (analisi delle pressioni) e per distinguere questi effetti dalle naturali variazioni ambientali.

La WFD fornisce una descrizione generale di 5 classi di stato ecologico per ogni categoria di acque superficiali: elevato, buono, sufficiente, scarso e cattivo.
Ogni classe rappresenta un diverso grado di disturbo antropico sugli elementi dell'ecosistema acquatico. La componente biotica è il punto focale per una valutazione pertinente dello stato di qualità dell'ecosistema, quindi è lo strumento più efficace per una corretta pianificazione.
La nuova rete di monitoraggio prevista dalla direttiva si articola in più fasi riassumibili nei seguenti punti: caratterizzazione delle acque superficiali, determinazione delle condizioni di riferimento tipo specifiche, individuazione delle pressioni e valutazione dello stato ecologico.

# 5. BIOCONCENTRAZIONE E BIOACCUMULO

Le modalità di ripartizione degli inquinanti nelle matrici ambientali si ripercuotono sulla loro diffusione nelle acque superficiali, sulle caratteristiche di biodisponibilità e bioaccumulo e quindi sulla loro capacità di interazione con il biota, infine sulla loro capacità di migrazione attraverso lo strato insaturo per raggiungere le falde. Conoscere la ripartizione degli inquinanti nelle varie matrici è di fondamentale importanza per indagare sul loro destino e sulle modalità di esposizione dei vari organismi.
L'accumulo può essere espresso da vari indicatori. La bioconcentrazione rappresenta l'accumulo netto nell'organismo di un elemento/sostanza, come risultato dell'esposizione all'elemento/sostanza presente nell'acqua; il bioaccumulo è invece l'accumulo netto di un elemento/sostanza nell'organismo come risultato dell'esposizione a tutte le possibili sorgenti (acqua, cibo) in cui si trova l'elemento/sostanza.
La biomagnificazione infine rappresenta l'incremento della concentrazione di un elemento/sostanza negli organismi dei livelli trofici più elevati come conseguenza dell'ingestione di organismi di livelli trofici inferiori (US EPA, 2004).

## 5.1. Biodisponibilità

La biodisponibilità è definita come la quantità di contaminante libera di essere assimilata ed è il fattore fondamentale affinchè si manifesti un effetto tossico dell'inquinante sul biota. Generalmente la frazione di sostanza tossica considerata biodisponibile è per lo più quella disciolta nella fase acquosa (acqua della colonna o acqua interstiziale del sedimento), mentre quella legata al particolato è generalmente considerata non-disponibile.
Le sostanze tossiche possono essere trasformate attraverso processi abiotici e biotici e trasportate all'interno del suolo, oppure possono lasciare il suolo entrando nell'atmosfera (volatilizzazione /evaporazione) o nell'acquifero (lisciviazione).

## 5.2. Effetti degli inquinanti sul biota

La prima risposta di un organismo alla contaminazione consiste nell'attivazione di un meccanismo protettivo. Nella maggior parte dei casi questi meccanismi provvedono alla disintossicazione dalla sostanza inquinante, ma in alcuni casi producono sostanze attive che possono arrecare danno all'organismo. Un tipo di risposta consiste nella riduzione della sostanze inquinanti attraverso la formazione di un legame con un'altra molecola, che può provvedere all'espulsione o all'immagazzinamento (isolamento).
Insieme con i meccanismi protettivi, un organismo può anche essere in grado di riparare i danni causati dalle sostanze inquinanti.
Le sostanze inquinanti presenti nell'acqua possono avere molti effetti diversi sugli organismi: di seguito si riportano gli effetti generali che può avere una sostanza inquinante sul biota.

**- Genotossicità**

Molti composti che entrano nel corpo di un organismo sono noti per la capacità di danneggiare il DNA, e quindi i geni da questo espressi, e pertanto sono chiamate genotossine. Solitamente quando gli inquinanti danneggiano il DNA, entra in gioco un sistema di riparazione naturale dell'organismo che ripristina lo stato usuale, ma quando questo sistema non funziona per qualche motivo, le cellule con DNA danneggiato possono dividersi. Le cellule mutanti prodotte provocando dei difetti che possono essere trasmessi alla prole.

**- Cancerogenicità**

Molte sostanze inquinanti sono cancerogene, il che significa che possono indurre il cancro negli esseri umani e negli animali, agendo in una o più fasi dello sviluppo. Le sostanze inquinanti, infatti, possono funzionare da induttori, cioè possono introdurre proprietà per la formazione del cancro nelle cellule di un organismo, da promotori, cioè possono promuovere lo sviluppo di cellule dotate di proprietà di formazione del cancro, e da progressori, cioè possono stimolare la divisione e la diffusione illimitata delle cellule cancerogene. Quando questi tipi di sostanze sono assenti il cancro non può essere indotto.

**- Neurotossicità**

Il sistema nervoso degli organismi è molto sensibile agli effetti tossici dei prodotti chimici, sia naturali sia artificiali. I prodotti chimici che causano effetti neurologici sono detti neurotossine. Tutte le neurotossine disturbano in qualche modo la normale trasmissione degli impulsi lungo le fibre nervose o attraverso le sinapsi.
Le conseguenze della neurotossicità sono svariate e possono manifestarsi con tremiti e convulsioni muscolari non coordinate, con disfunzione dei nervi e delle trasmissioni, con annebbiamento e depressione o persino totale disfunzione di parti del corpo. La neurotossicità può essere così seria da ostruire le sinapsi. Il blocco sinaptico può causare la morte a seguito della paralisi dei muscoli del diaframma e conseguente difficoltà respiratoria.

**- Disturbo nel trasferimento energetico**

La trasformazione energetica negli organismi avviene attraverso il sistema mitocondriale nelle cellule tramite la produzione di ATP (Adenosintrifostato). Quando la produzione di ATP viene disturbata, il trasferimento energetico cessa, influenzando le capacità vitali di un organismo.

**- Incapacità riproduttiva**

Un gruppo eterogeneo di composti naturali e di sintesi, definito come "distruttori endocrini", costituiti ad esempio da alchinfenoli, DDT ed i suoi derivati o metaboliti, nonylfenolo, bisfenolo A e PCBs, pesticidi, possono interferire o distruggere, attraverso diversi meccanismi, il sistema endocrino di specie selvatiche causando effetti avversi sulla salute del singolo organismo, oppure sulla sua progenie o sull'intera popolazione. La maggior parte degli studi mostrano che gli effetti sulla riproduzione dei Pesci dovuti all'esposizione di queste sostanze sono:

- Alterata struttura delle gonadi (declino dell'indice gonadosomatico, GSI)

- Ritardato sviluppo delle gonadi
- Riduzione dei livelli plasmatici degli ormoni sessuali
- Femminilizzazione (comparsa di intersex)
- Presenza di vitellogenina nel plasma dei maschi e dei giovanili
- Anomalie della fecondazione
- Mascolinizzazione delle femmine
- Ipermascolinizzazione dei maschi e comportamento aggressivo

Nei Pesci gli ormoni giocano un ruolo essenziale nello sviluppo delle gonadi e nei processi riproduttivi. Nelle aree temperate, generalmente, i pesci hanno una riproduzione di tipo stagionale, controllata da parametri ambientali come il fotoperiodo, la temperatura, i cicli lunari e tidali (Munro *et al.*, 1990). Il ciclo riproduttivo può essere suddiviso in due principali fasi. La proliferazione, la crescita e la differenziazione dei gameti costituiscono la prima fase (vitellogenesi e spermatogenesi), mentre la maturazione finale degli oociti (FOM) e degli spermatozoi, con lo stadio di preparazione al loro rilascio (spermiazione), costituisce la seconda fase. Inoltre, è possibile riconoscere tre differenti tipologie di sviluppo dell'ovario: sincrono, sincrono a gruppi e asincrono (Wallace & Selman, 1981; Tyler & Sumpter, 1996). Nello sviluppo sincrono gli oociti arrivano a maturazione tutti contemporaneamente ed è caratteristico delle specie semelpare come il salmone del pacifico (*Oncorhynchus* spp.) e l'anguilla che si riproducono una sola volta nella vita. Nei pesci con sviluppo sincrono a gruppi si osservano due o più distinti gruppi di oociti a differente stadio di sviluppo nell'ovario. Infine, le specie con sviluppo dell'ovario asincrono hanno un gruppo di oociti primari e un gruppo eterogeneo di oociti in vitellogenesi; da questo ultimo, alcuni lotti sono reclutati man mano per raggiungere la maturazione finale durante la stagione riproduttiva, ad intervalli regolari o semiregolari. La distinzione tra ovario asincrono e sincrono a gruppi in grado di rilasciare più lotti è molto sottile, specialmente in quei Pesci che hanno una bassa frequenza di deposizione (3-5 volte).

**- Effetti comportamentali**

Tutti i comportamenti possono subire alterazioni se l'organismo è contaminato da sostanze inquinanti, ad esempio una riduzione della vigilanza o la perdita di appetito possono aumentare la vulnerabilità ai predatori diminuendo la probabilità' di sopravvivenza.

**- Sinergia**

Le sostanze inquinanti possono interagire tra loro riducendo il loro effetto chimico generale o aumentandolo, in quest'ultimo caso rendendo una sostanza inquinante ancor più pericolosa. Si riportano di seguito alcuni esempi di risposte biologiche alle diverse esposizioni.

**- Sostanze inorganiche**

Questi composti non possono essere scissi in componenti meno nocivi poiché non sono biodegradabili. Il rischio di tossicità da metalli o metalloidi si presenta solo ad elevati valori

di biodisponibilità e dopo un periodo di esposizione sufficientemente lungo (l'esposizione di *Daphnia magna* per 32 giorni ad una concentrazione di 10 ppb di cromo esavalente, ne riduce la sopravvivenza e la fecondità, US EPA, 1980). L'esposizione di *Oncorhynchus mykiss* ad elevate concentrazioni di cromo causa deformità nelle branchie, nei reni e nei tessuti stomacali a pH 7,5, mentre influisce solo sulle branchie a pH 6,5 (Van der Putte *et al.*, 1981). L'esposizione cronica determina in ogni caso effetti nocivi: i Pesci continuamente esposti a concentrazioni tossiche di piombo mostrano le problematiche tipiche dell'avvelenamento da questo metallo quali curvatura della spina dorsale, lordosi, anemia, distruzione dei neuroni spinali e dell'epitelio respiratorio, atrofia muscolare, paralisi.

Il mercurio invece esplica i suoi effetti dannosi a livello del sistema nervoso centrale e dell'apparato riproduttore. La sua tossicità è causata dalla sua affinità per i composti organici contenenti zolfo (es. proteine), con i quali forma legami covalenti che gli consentono di migrare facilmente attraverso le membrane (US EPA, 1997).

- **Sostanze organiche**

A differenze dei composti inorganici, quelli organici, con le loro proprietà fisico-chimiche e la loro capacità di persistere nell'ambiente, possono migrare attraverso le membrane biologiche più facilmente e bioaccumulare nei tessuti lipidici dando luogo, nella maggior parte dei casi, al fenomeno della biomagnificazione. Secondo Gray (2002) il processo di biomagnificazione dei PCB è principalmente imputabile proprio al tenore lipidico degli organismi, ma soprattutto alla posizione trofica che questi hanno nella catena alimentare. Spesso esiste una conlinearità tra questi due parametri, ma è difficile rilevarne l'importanza relativa nel processo di bioaccumolo delle sostanze organiche (Kiriluk *et al.*, 1995; Kidd *et al.*, 2001; Kucklick & Baker 1998). Nel lavoro di Walters *et al.* (2008), a parità di esposizione, i pesci hanno accumulato una quantità di PCB tra le 3 e le 5 volte maggiore di quella accumulata dai macroinvertebrati. Moore *et al.* (1999) hanno dimostrano come specie piscivore siano esposte alla contaminazione di PCB attraverso la dieta, rilevando una riduzione del 50% della fertilità. I PCB sono inseriti da IARC (International Agency for Research on Cancer) nel gruppo dei cancerogeni probabili, cioè dei composti con evidenza di cancerogenicità limitata per l'uomo e sufficiente evidenza di cancerogenicità per l'animale. Nei Pesci bentonici è stata rilevata un'incidenza di tumori associati all'esposizione di inquinanti come IPA, PCB, DDT (APAT, 2005).

Gli effetti biologici di un'esposizione, dal livello molecolare a quello ecosistemico, sono difficilmente riconducibili all'agente inducente, a causa delle modalità di esposizione, spesso multiple e ricorrenti, dell'induzione di risposte metaboliche comuni da parte di sostanze differenti e dalla complessità dell'organizzazione biologica. (APAT, 2005).
Nella tabella seguente (Tabella 5.1) sono riportati gli effetti indotti da composti tossici e genotossici ai vari livelli dell'organizzazione biologica, descritti da Bolognesi & Venier (2003).

**Tabella 5.1.** Effetti biologici dati dall'esposizione a composti tossici e genotossici ai vari livelli dell'organizzazione biologica.

| Livello organizzativo | Risposte biologiche indotte | Tempo di latenza | Biomarcatori |
|---|---|---|---|
| **Cellula** | Segnali immediati di allarme | Secondi/minuti | Reazioni comportamentali |
| | Assorbimento, distribuzione e metabolismo | Ore | Determinazione dei contaminanti e dei loro metaboliti nei liquidi biologici |
| | Alterazioni di macromolevole biologiche (DNA e proteine) e di funzioni cellulari | Ore/giorni | Danno al DNA<br><br>Attività enzimatica di fase I e II |
| **Tessuto/organo** | Interferenza con i processi di detossificazione, regolazione e alterazioni funzionali | Giorni/settimane | Lesioni preneoplastiche. Alterazioni riproduttive |
| **Organismo** | Alterazioni di sviluppo, crescita, riproduzione, comportamento, tempo di vita | Mesi/anni | Difetti funzionali<br>Riduzione della vitalità<br>Riduzione della fertilità<br>Malformazioni<br>Tumori e altre patologie |
| **Popolazione** | Modificazioni delle caratteristiche nella struttura (abbondanza, distribuzione) e nella sua funzionalità (adattabilità, resistenza,…) | Anni | Dimensione e composizione<br>Dominanza di varianti |
| **Ecosistema** | Cambiamenti strutturali e funzionali (biomassa, produttività, relazioni trofiche, …) | Anni | Varietà e abbondanza delle specie rappresentate nella comunità biologica |

# 6.BIOMONITORAGGIO

La valutazione della presenza di eventuali composti inquinanti e la conoscenza completa della condizione ecologica di un ecosistema sono condizioni assolutamente necessarie per una corretta gestione e prevenzione dei rischi legati alla salute umana e per la tutela ambientale. Le analisi chimiche effettuate sui diversi comparti abiotici (aria, acqua, sedimento) presentano lo svantaggio di fornire soltanto un dato puntiforme, sia spaziale sia temporale, alcune volte non rappresentativo dell'evoluzione della contaminazione e soggetto a notevole errore in caso di condizioni ambientali particolari. Il dato ricavato non fornisce, inoltre, alcuna indicazione sulla reale frazione di contaminazione biodisponibile, valore che può variare a seconda delle caratteristiche chimico-fisiche del composto. Alcune classi di contaminanti, come i metalli pesanti ed i composti organici persistenti, sono presenti nell'ambiente spesso a concentrazioni al di sotto della soglia analitica. Mediante il cosiddetto "biomonitoraggio", che è definito come l'utilizzo di organismi per la valutazione di cambiamenti di qualità dell'acqua o dell'aria (Cairns & van der Shalie, 1980), si può invece evidenziare la frazione biodisponibile del composto ed il suo destino lungo la rete trofica. Il biomonitoraggio può essere effettuato sia con i Bioindicatori sia con i Biomarcatori (Van Gestel & Van Breummelen, 1996).

## 6.1 Bioindicatori

Per definizione gli indicatori sintetizzano gli attributi fisici, chimici o biologici che caratterizzano le condizioni ecologiche di un determinato ambiente.
Si possono distinguere in: indicatori fisici e chimici (es. concentrazioni di nutrienti), indicatori biologici (o bioindicatori), che riflettono la presenza, le condizioni e il numero di specie di organismi animali e vegetali che popolano l'ecosistema considerato, e indicatori ecologici, cioè la combinazione dei precedenti due tipi di indicatori (misura o serie di misure o modelli che caratterizzano un ecosistema o una delle sue componenti critiche).
Per sintetizzare i diversi tipi d'informazione è spesso necessario ricorrere all'aggregazione (razionale o empirica) di uno o più indicatori, espressa in forma numerica da specifici "indici". Tra questi, i più noti sono (ISPRA, 2012):

- indici di diversità: riflettono in forma quantitativa la diversità delle comunità;
- indici qualitativi: basati sulla presenza/assenza di specifiche unità tassonomiche;
- indici indicativi di determinate condizioni ambientali;
- indici biotici: combinano la valutazione della biodiversità con l'informazione di opportuni *taxa* guida.

Un bioindicatore per essere ritenuto efficiente deve essere:

- rilevabile;
- facilmente misurabile;
- scientificamente valido;
- sensibile a piccole variazioni di stress ambientale;

- applicabile in aree geografiche ampie e nel numero più ampio possibile di comunità e di ambienti ecologici;
- quantificabile;
- economico.

È da sottolineare che i requisiti di un buon bioindicatore variano con la natura dello stesso, con il tipo di risposta che è in grado di esprimere, con il tipo e la durata dell'alterazione ambientale che si intende rilevare.
A questo proposito, può essere utile seguire le indicazioni di USEPA: Evaluation Guidelines For Ecological Indicators (EPA, 2003) che descrivono un processo di valutazione tecnica degli indicatori ecologici composta da 4 fasi.
Ogni indicatore proposto deve infatti poter rispondere alle seguenti domande:
Fase 1 – rilevanza concettuale: l'indicatore è rilevante per la richiesta gestionale e la risorsa o funzione ecologica a rischio?
Fase 2 – fattibilità dell'applicazione: i metodi di campionamento e misura delle variabili ambientali sono tecnicamente fattibili, appropriati ed efficienti per un loro uso nell'ambito di un programma di monitoraggio?
Fase 3 – variabilità della risposta: gli errori umani di misura della variabilità naturale spaziale e temporale sono sufficientemente compresi e documentati?
Fase 4 – interpretazione ed utilizzazione: l'indicatore fornirà informazioni sulle condizioni ecologiche significative per le decisioni gestionali?
Chiaramente questo processo non intende stabilire l'accettabilità o l'efficacia di un indicatore in assoluto, ma semplicemente permette di verificare se un particolare indicatore è adatto in relazione a specifici obiettivi. Inoltre, va ricordato che l'uso dei bioindicatori, sebbene costituisca uno strumento di fondamentale importanza nel rilevare una possibile compromissione di un ambiente, nella maggior parte dei casi non è in grado di identificare precisamente ed univocamente le cause della compromissione, poiché l'ambiente solitamente è interessato da stressori multipli. Alla fase di monitoraggio, deve quindi necessariamente seguire una fase di identificazione degli stressori.

I tipi di bioindicatori, le modalità diversificate di risposta e le condizioni ambientali da rilevare permettono una vasta scelta di uso. I bioindicatori preferiti sono organismi di scarsa o nulla mobilità, selezionati in modo da avere un patrimonio genetico il più possibile uniforme per dare risposte omogenee agli stimoli ambientali. I bioindicatori nati in natura danno invece informazioni di massima che devono essere rilevate da un operatore adeguatamente addestrato, in quanto il segno di risposta potrebbe essere mascherato, esaltato o depresso dalla concomitante eventuale presenza di altre azioni più o meno occulte di stress ambientale non direttamente collegate con quella che si intende rilevare.

Ai sensi della Direttiva 2000/60/CE, la valutazione dello stato ecologico delle acque correnti deve avvenire tramite bioindicatori (microalghe, macrofite acquatiche, macroinvertebrati bentonici, comunità ittiche).
In questo studio sono state prese in considerazione le comunità ittiche.

### 6.1.2. Pesci

Lo studio delle comunità ittiche, come per le macrofite e le alghe, solo di recente è stato utilizzato ai fini della valutazione dello stato ecologico dei corpi idrici fluviali: tradizionalmente era orientato a scopi gestionali, con monitoraggi finalizzati a valutare la distribuzione e la consistenza delle specie di interesse ai fini della pianificazione dei prelievi e ripopolamenti, soprattutto mediante la redazione di Carte Ittiche. Solo nell'ultimo decennio sono stati proposti indici formalizzati finalizzati alla valutazione dello stato della comunità, quali l'Indice Ittico (Forneris *et al.*, 2007), l'EFI+ (EFI+ Consortium, 2009), anche attraverso approcci basati sull'uso di reti neurali FIDESS (Scardi *et al.*, 2007).
L'Indice di Stato Ecologico per la Comunità Ittica (ISECI), nella sua ultima versione (Zerunian *et al.*, 2009) è stato adattato alle richieste della WFD ed è stato individuato dalla normativa italiana come metodo ufficiale per la fauna ittica fluviale (DECRETO MATTM 260/2010). E' nato come un indice di tipo naturalistico, mirato a valutare la comunità ittica non solo per le funzioni ecosistemiche da essa svolte, ma anche dal punto di vista della naturalità e della coerenza ecologica.
I pesci possono rappresentare un "sistema di allarme precoce" di danni ambientali per diverse ragioni:

- integrano gli effetti di un'ampia varietà di disturbi ambientali, con risposte a diversi livelli dell'organizzazione biologica, da quello molecolare a quello di comunità;
- evidenziano relazioni tra le risposte individuali di organismi esposti ad inquinanti e gli effetti a livello di popolazione;
- costituiscono un sistema di biondicazione di potenziali rischi per la salute umana e un sistema di verfica dell'efficienza d'interventi di riqualificazione degli ambienti acquatici.

Le popolazioni e comunità ittiche sono indicatori nella valutazione del degrado ambientale anche perché integrano gli effetti di fattori di alterazione ambientale con le altre componenti dell'ecosistema acquatico, in virtù della loro dipendenza da queste per la sopravvivenza, la crescita o la riproduzione. (Tancioni *et al.*, 2006).
Inoltre, poiché molte specie hanno una vita relativamente lunga, lo studio a livello di popolazioni e comunità può costituire una documentazione a lungo termine dello stress ambientale. Gli studi delle popolazioni e delle comunità ittiche di un fiume ricoprono quindi un ruolo fondamentale per la valutazione dello stato di integrità ecologica dei sistemi lotici, in quanto rappresentano delle componenti biotiche sensibili sia all'inquinamento delle acque sia al degrado delle caratteristiche morfologiche, idrauliche ed idrodinamiche.
Le caratteristiche ecologiche-evolutive che ne rappresentano i punti di forza per il proprio utilizzo nelle valutazioni ambientali sono:

- lunga storia evolutiva;
- ampio spettro adattativo;
- colonizzazione di tutti gli ambienti acquatici
- tra i Pesci, i Teleostei rappresentano i più moderni abitanti dei sistemi acquatici continentali.

## 6.2 Biomarcatori

Un biomarcatore permette di misurare una variazione indotta da un composto tossico o da altro fattore di stress in componenti o processi biochimici, cellulari, strutturali o funzionali, valutabile in un sistema biologico e rilevante per il problema studiato (Bolognesi & Venier, 2003).
I biomarcatori consentono di analizzare nel tempo ed in modo quantitativo l'effetto dell'inquinante sugli organismi esposti, di effettuare indagini comparative in habitat differenti fornendo, a seconda del tipo prescelto, preziose indicazioni sul livello di esposizione, sulla associazione fra l'esposizione e la risposta biologica o su un futuro effetto e sulla suscettibilità a breve e a lungo termine. Da un punto di vista sia etico sia di efficienza è molto importante ricercare, caratterizzare, validare e utilizzare biomarcatori non distruttivi quali la misurazione di specifiche attività enzimatiche o il dosaggio di molecole rilevabili in sangue, feci, biopsie e prelievi muco-cutanei per raccogliere informazioni ripetute nel tempo, senza sacrificare gli organismi bioindicatori (Ministero Ambiente, 2010).
La rilevazione precoce di una contaminazione può aiutare ad evitare che l'eventuale danno possa estendersi anche a livelli superiori dell'organizzazione biologica (Munkittrick & McCarthy, 1995). Nel caso di uno screening ambientale, i biomarker dovrebbero servire per compiere un'indagine preliminare (sistemi di "early warning") volta a mettere in evidenza la presenza di una sostanza xenobiotica e poter prevedere l'impatto che questa potrebbe avere sull'ambiente, utilizzandone eventualmente una "batteria" nel caso non si conosca esattamente il tipo di contaminazione (Paynem *et al.*, 1987).
Per la valutazione degli effetti biologici di agenti genotossici in organismi acquatici è utilizzato un approccio di biomonitoraggio simile a quello impiegato per le popolazioni umane e che consiste nella individuazione di biomarcatori di esposizione, di effetto e di suscettibilità (APAT, 2005):

- i biomarcatori di esposizione indicano un'esposizione dell'organismo a dei composti chimici, senza fornire informazioni in merito all'intensità dell'effetto prodotto;
- i biomarcatori di effetto, chiamati anche biomarcatori di risposta, sono invece la conseguenza dell'esposizione e possono spaziare da alterazioni a livello di un bersaglio critico fino a cambiamenti tardivi, progressivi ed effetti patologici importanti;
- i biomarcatori di suscettibilità sono impiegati per identificare organismi con maggior probabilità di un effetto avverso a causa della variabilità individuale.

Inoltre l'utilizzo dei biomarcatori è diverso a seconda se l'analisi sia di tipo distruttivo, cioè preveda il sacrificio degli animali, o non distruttivo se sono utilizzati sangue, penne, feci, pelle. Solo in questo secondo caso si ha il vantaggio di poter ripetere le determinazioni sullo stesso organismo a distanza di tempo.
Tra i biomarker finora utilizzati in campo ambientale copre una posizione di rilievo la misura dell'inibizione dell'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE), un enzima presente nel tessuto nervoso di tutti i gruppi animali che catalizza l'idrolisi del neurotrasmettitore acetilcolina. E' noto che alcuni pesticidi come gli organofosforati ed i carbammati, utilizzati su larga scala, hanno un'azione inibitoria nei confronti dell'acetilcolinesterasi. I composti organofosforati

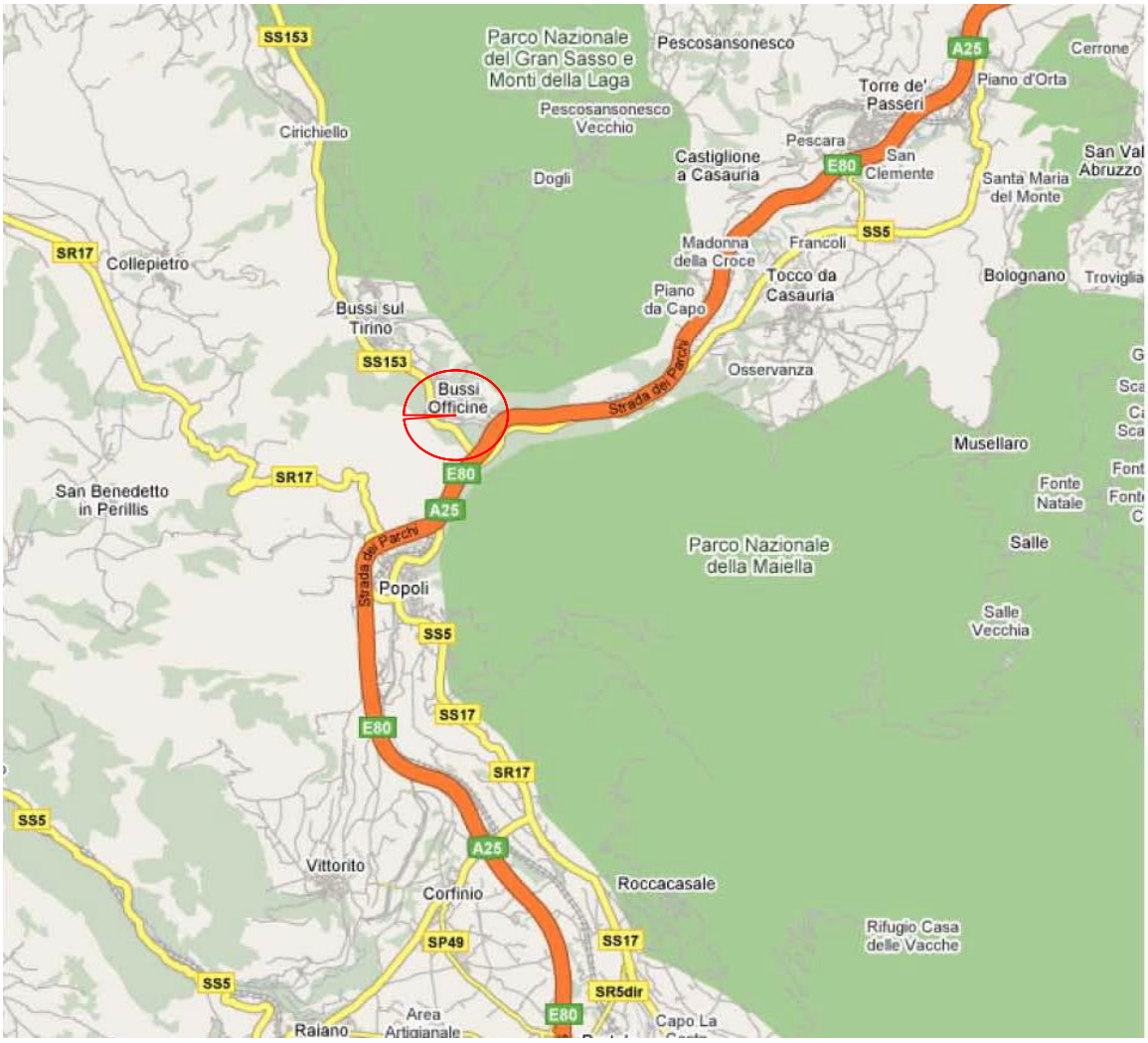
sono stati utilizzati in diversi campi come pesticidi, lubrificanti, additivi nei carburanti ed anche come agenti chimici impiegati in diversi conflitti (Ehrich, 1998), mentre i carbammati sono usati principalmente come insetticidi (Fukuto, 1987). Un altro metodo impiegato in molti programmi di monitoraggio ambientale consiste nella valutazione dell'induzione dell'attività delle monossigenasi epatiche a funzione mista (MFO), sensibile alla presenza di composti xenobiotici nell'ambiente. In particolare, è utilizzata la famiglia di enzimi appartenenti al citocromo P450, probabilmente diffusa in tutto il regno animale, inclusi gli invertebrati (Snyder, 2000). Il citocromo P450 ha un ruolo importante nel metabolizzare i composti inquinanti come gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) ed altri composti quali alcuni congeneri di PCB, diossine e furani (Bosveld & Berg, 2002). Tali composti, legandosi al recettore Ah, stimolano la sintesi delle proteine appartenenti alla superfamiglia CYP1A, responsabili dei processi di detossificazione (Hestermann *et al.*, 2000).
Metodi di valutazione in fase di sperimentazione prevedono l'utilizzo di organismi più complessi, come i Pesci, che presentano dinamiche biochimiche e cellulari molto più simili a quelle umane e che possono essere utilizzati, sia in situ sia ex situ (Tancioni *et al.*, 2005; Tancioni *et al.*, 2015). Inoltre, questi organismi possono consentire una lettura integrata delle risposte a stress ambientali a diversi livelli dell'organizzazione biologica, come per esempio attraverso l'analisi dei tessuti gonadici per valutare l'impatto sul biota e sulla salute umana generato dalla presenza nell'ambiente di determinate sostanze come i cosiddetti distruttori endocrini (*Endocrine Disruptors*), gli alchinfenoli, i DDT ed i suoi derivati o metaboliti, i PCBs, i pesticidi (Brunner *et al.*, 1985).
Lo studio e la ricerca di test genotossici e di biomarcatori capaci di fornire risposte precoci e dirette per i danni causati da composti xenobiotici ai diversi organismi sono diventati prioritari. In quest'ottica assume un ruolo chiave la messa a punto di metodi standardizzati come nel caso del Test del Micronucleo (MN). Questo test è facilmente applicabile, non implica l'allestimento di colture cellulari, è indipendente dal numero di cromosomi della specie, non presenta eccessive difficoltà di riconoscimento al microscopio ed è di facile e rapida esecuzione (Lemos *et al.*, 2007). Il primo tentativo di conteggio dei micronuclei è stato sviluppato da Evans nel 1959 per misurare il danno indotto dai neutroni veloci e dai raggi gamma sugli apici radicali di *Vicia faba*. Lemos rilevò che le rotture cromatidiche e cromosomiche, come anche gli scambi simmetrici e asimmetrici, potevano dare origine a frammenti acentrici e che quest'ultimi in alcuni casi erano espulsi dai nuclei delle cellule figlie, comparendo nel citoplasma come micronuclei nella successiva interfase. Tra il 1973 e il 1975 è stato sviluppato il metodo definito appunto "*Micronucleus Test*" consistente nel conteggio dei micronuclei in eritroblasti policromatici estratti dal midollo osseo dei mammiferi. Nei pesci sono stati impiegati anche tessuti differenti, quali branchie, reni e fegato (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Arkhipchuk & Garanko, 2005). Numerosi studi hanno dimostrato che gli eritrociti del sangue periferico dei Pesci presentano un'elevata incidenza di MN dopo esposizione a molti inquinanti ambientali, sia per esposizione diretta (immersione) ad agenti mutageni (Rodriguez-Cea *et al.*, 2003; Kamlesh & Sunil, 2009, rispettivamente in relazione al cadmio e al mercurio) sia per indagini in situ (è stata dimostratata l'incidenza dell'aumento nella frequenza di MN in acque influenzate da scarichi di industrie pertrolchimiche, fabbriche di armamenti, concerie e contaminazioni da mercurio (Lemos *et al.*, 2007; Ayllòn *et al.*, 2000; Nagpure *et al.*, 2015, Porto *et al.*, 2005). Alcuni autori, come Rodriguez-Cea *et al.* (2003)

hanno valuato la sensibilità delle diverse specie d'acqua dolce al test per la stima del danno genotossico, al fine di valutarne l'applicabilità negli studi sul campo. In letteratura è emersa un'evidente variabilità intra e interspecifica nella frequenza di MN, in particolare della frequenza basale, presumibilmente causata anche dalla mancanza di criteri uniformi di analisi nella lettura (Bolognesi *et al.*, 2006).
Un estensivo utilizzo dei biomarcatori potrebbe apportare vantaggi notevoli per la salvaguardia dell'ambiente e della salute umana.

# 7. LA CONTAMINAZIONE DELL'AREA INDUSTRIALE DI BUSSI OFFICINE (PE) - CONSULENZA TECNICA PER LA PROCURA DELLA REPUBBLICA DEL TRIBUNALE DI PESCARA (Di Molfetta & Fracassi)

Il polo industriale di Bussi Officine si trova a valle dell'abitato di Bussi sul Tirino, lungo le sponde del fiume omonimo, poco a monte della sua confluenza con il fiume Pescara. Prescindendo dai danni creati dagli insediamenti industriali, il sito avrebbe una vocazione ambientale di particolare pregio, essendo collocato al confine tra il Parco Nazionale del Gran Sasso e Monti della Laga a Nord e il Parco Nazionale della Maiella a Sud (Figura 7.1.)

**Figura 7.1.** Inquadramento geografico dell'area.



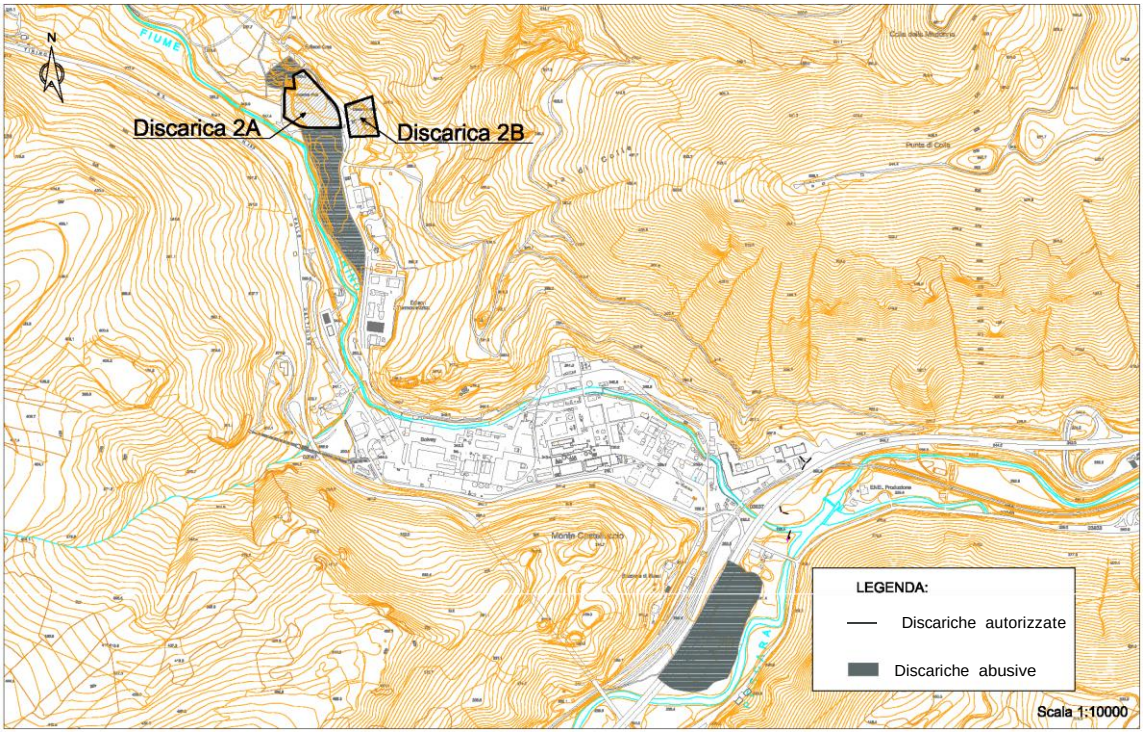

La zona è ricca d'acqua per la presenza di numerose sorgenti, oltre che dei due corsi d'acqua citati. Poco più di 2 km a valle del sito industriale, nelle Gole di Popoli, è ubicato il campo

pozzi di Colle Sant'Angelo che contribuisce all'approvvigionamento idropotabile dei comuni della Val Pescara, compreso l'omonimo capoluogo.
Furono proprio l'abbondanza di acqua e la disponibilità di energia elettrica, oltre alla vicinanza della ferrovia, che favorirono agli inizi del '900 la nascita del primo insediamento industriale con l'impianto di elettrolisi del cloruro di sodio, primo in Italia, per la produzione di soda caustica, ipoclorito di sodio e acido cloridrico.
Nel sito si svilupparono una serie di aziende che vennero progressivamente acquisite dalla Montecatini nel periodo che va dal 1928 al 1931.
Durante la seconda guerra mondiale gli stabilimenti di Bussi vennero militarizzati e resi organizzativamente dipendenti dal Ministero della Difesa, che potenziò tutte le produzioni funzionali alla realizzazione di esplosivi e di altri prodotti bellici, tra cui la famigerata iprite.
Il periodo post-bellico, caratterizzato dall'avvento della Petrolchimica a danno della Carbochimica, rappresenta un periodo di stasi nello sviluppo del polo industriale, che poi riprende agli inizi degli anni '60 con il "miracolo economico" italiano e l'avvio dell'impianto clorometani (brevetto Montecatini), utile per smaltire il cloro derivante dalla elettrolisi del cloruro di sodio.
Nel marzo 1966 lo stabilimento di Bussi entra a far parte della Montecatini-Edison, poi Montedison. Nel 1968 viene avviato l'impianto di produzione dell'acqua ossigenata, che si svilupperà nel tempo passando dalle 3000 t del 1968 alle 39.000 t del 1990. Gli anni '80 sono contrassegnati da una sostanziale continuità con lievi continui incrementi dei quantitativi delle produzioni storiche: Soda Caustica, Ipoclorito, Acqua Ossigenata, Clorometani, Acido Cloridrico, Perborato di Sodio, Cloruro Ammonico, mentre una decisa crescita conosce l'impianto degli antidetonanti per le benzine.
Nel periodo 1985-90 la Montedison è interessata da un pesante conflitto per il suo controllo, viene riorganizzata dando vita a diverse società di settore: Montedipe, Montefibre, Himont, Ausimont, che controlla la MonteFluos, società che, nel panorama chimico della Capogruppo, è attiva e tende al ruolo di leader nella chimica del Fluoro, curando anche la chimica dei Perossidi Inorganici. A seguito di varie disavventure gestionali, a fine 2001, SOLVAY sollecita la prelazione per l'acquisto dell'intera Ausimont, acquisto che viene perfezionato l'1 maggio 2002 con il passaggio nel gruppo Solvay della fabbrica di Bussi, ad esclusione degli impianti acqua ossigenata e persali, unitamente alle fabbriche di Spinetta Marengo e Porto Marghera. Dall'1 gennaio 2003 Solvay si trasforma in Solvay Solexis. Nel gennaio 2005 è fondata Solvay Chimica Bussi S.p.A., spin off della Solvay Solexis. Lo società di spin off è proprietaria degli impianti e dell'attività produttiva mentre la proprietà del sito resta in capo a Solvay Solexis. Attualmente, presso il polo di Bussi, sul sito di proprietà di Solvay Solexis, in aggiunta a SOLVAY Chimica Bussi, sono insediate le seguenti aziende:

- DEGUSSA MEDAVOX, che produce acqua ossigenata e percarbonato sodico. In precedenza al posto del percarbonato produceva perborato ($NaBO_3\ 4H_2O$).
- SILISIAMONT, che produce biossido di silicio.
- NEW ISAGRO PLANT, che produce il tetraclorazone, un principio attivo per prodotti in agricoltura. In precedenza su quest'area vi era la SIAC (sempre del gruppo Ausimont) dedita alla produzione di antidetonanti per le benzine (piombo tetraetile e piombo tetrametile). SIAC ha cessato l'attività nel 1990 ed è stata demolita dal 1995 al 1997.

All'interno del sito industriale, idrogeologicamente a monte dello stabilimento Solvay, sono ubicate due discariche autorizzate di tipo 2A e 2B (Figura 7.2). Nel corso delle indagini a cura del Corpo Forestale dello Stato, è emerso che anche aree limitrofe alla discarica 2A (per soli materiali inerti) si presentavano contaminate da rifiuti non inerti e contenenti prevalentemente piombo e mercurio. Inoltre in località "Tre Monti", nei pressi della stazione ferroviaria di Bussi, è stata individuata un'altra area contaminata ed interessata dall'abbandono di rifiuti organici clorurati.

**Figura 7.2.** Discariche autorizzate e non autorizzate.




Nel 2004 la Regione Abruzzo ha affidato ad ARTA un programma di monitoraggio delle acque sotterranee durante il quale furono rilevate concentrazioni di inquinanti organici clorurati superiori ai limiti massimi previsti per i siti inquinati dal D.M. 471/99. In un caso vi era anche il superamento del valori di tetracloroetilene dell'allegato I al D. Lgs 31/01, relativo alle acque potabili. I prelievi erano riferiti agli 8 pozzi del cosiddetto "Campo Sant'Angelo" situato nei comuni di Castiglione a Casauria e Tocco da Casauria, le cui acque erano miscelate con quelle provenienti dall'Acquedotto "Giardino" e distribuite per uso potabile in vari comuni della valle del Pescara dalla Azienda Comprensoriale Acquedottistica (ACA).
A seguito dei risultati delle analisi, anche su invito del Corpo Forestale di Pescara, sono stati effettuati altri accertamenti da ARTA, da ACA, dal WWF, da alcuni cittadini e dal Sindaco di Torre de Passeri ed è iniziata una lunga diatriba sulla possibilità che acque inquinate, ma conformi ai parametri previsti ai fini della potabilità, potessero essere destinate al consumo umano. Le indagini e le attività di accertamento svolte sia dagli inquirenti (Pubblico Ministero

e Corpo Forestale dello Stato), sia dagli enti pubblici e privati interessati alla vicenda (ARTA, ACA, ATO n. 4, Commissario Straordinario per l'emergenza, Solvay-Solexis, etc.) si svilupparono quindi su due filoni paralleli: l'accertamento e lo studio della contaminazione delle matrici ambientali e la possibilità di immettere nell'acquedotto pubblico acqua inquinata in miscela con altra acqua non contaminata. In effetti, nonostante le sostanze inquinanti presenti fossero pericolosissime per l'uomo, ACA ha continuato a destinare al consumo umano le acque dei pozzi in quanto i successivi accertamenti di ARTA (ripetuti in data 28/12/04, 19/1/05), evidenziavano solo il superamento dei limiti di cui al D. Lgs 152/06 (o D.M. 471/99) e non del D. Lgs 31/01.

La classificazione tossicologica dei composti per i quali sono stati verificati dei superi dei limiti di legge imposti dal D.Lgs 152/06 (o dalle integrazioni introdotte dall'Istituto Superiore della Sanità) in una delle matrici ambientali analizzate è riportata nella Tabella 7.1. In particolare, la tabella citata contiene la classificazione della sostanza così come riportato nella Direttiva 92/32/CEE e la classificazione dell'eventuale cancerogenicità secondo l'Environmental Protection Agency (EPA).

**Tabella 7.1.** Tossicologica dei parametri che superano i limiti del D.Lgs 152/06 (o i valori limite proposti dall'Istituto Superiore della Sanità) nei terreni e/o nelle acque di falda.

* Valore limite proposto dall'ISS (2000-2001)
(1) Idrogeno arseniato di piombo Cat. 1 / Altri composti del piombo Cat. 3
(2) Classificazione riportata nell'allegato I della Direttiva 92/32/CEE e s.m.i.
(3) numero indice.

| **Composti inorganici** | | **Limite D.Lgs 152/06 e integrazioni per siti ad uso industriale [mg/kg]** | **Classificazione europea della sostanza** | **Cancerogenicità della sostanza – Classe EPA** |
|---|---|---|---|---|
| Cromo totale | | 800 | Cancerogeno Cat. 2<br>Pericoloso per l'ambiente | - |
| Vanadio | | 250 | - | - |
| Mercurio | | 5 | Tossico<br>Pericoloso per l'ambiente | D |
| Piombo Totale | | 1000 | Cancerogeno Cat. 1/3(1) | B2 |
| Rame | | 600 | - | D |
| **Aromatici policiclici** | | | | |
| Fenantrene | * | 50 | Cancerogeno Cat. 2 | D |
| Fluorantene | * | 50 | - | D |
| Pirene | | 50 | - | D |
| Benzo (a) Antracene | | 10 | Cancerogeno Cat. 2<br>Pericoloso per l'ambiente | B2 |
| Crisene | | 50 | Cancerogeno Cat. 2<br>Mutageno Cat. 3<br>Pericoloso per l'ambiente | B2 |
| Benzo (a) Pirene | | | Cancerogeno Cat. 2 | |

| Composti inorganici | | Limite D.Lgs 152/06 e integrazioni per siti ad uso industriale [mg/kg] | Classificazione europea della sostanza | Cancerogenicità della sostanza – Classe EPA |
|---|---|---|---|---|
| | | 10 | Mutageno Cat. 2<br>Tossico per il ciclo Riproduttivo Cat. 2<br>Pericoloso per l'ambiente | B2 |
| Benzo (k) fluorantene | | 10 | Cancerogeno Cat. 2<br>Pericoloso per l'ambiente | B2 |
| Indeno (1,2,3-c,d) Pirene | | 5 | - | B2 |
| Benzo (a,h) Antracene | | 10 | Cancerogeno Cat. 2<br>Pericoloso per l'ambiente | B2 |
| Benzo (g,h,i) Perilene | | 10 | - | D |
| Dibenzo (a,l) Pirene | | 10 | - | - |
| **Alifatici clorurati cancerogeni** | | | | |
| Diclorometano | | 5 | Cancerogeno Cat. 3 | B2 |
| Tetracloroetilene | | 20 | Cancerogeno Cat. 3<br>Pericoloso per l'ambiente | B2 |
| Tricloroetilene | | 10 | Cancerogeno Cat. 2<br>Mutageno Cat. 3<br>Irritante | B2 |
| Triclorometano (Cloroformio) | | 5 | Nocivo Irritante<br>Cancerogeno Cat. 3 | B2 |
| Cloruro di vinile | | 0.1 | Altamente infiammabile<br>Cancerogeno Cat. 1 | A |
| **Alifatici clorurati non cancerogeni** | | | | |
| 1,1,2,2 Tetracloroetano | | 10 | Molto Tossico<br>Pericoloso per l'ambiente | C |
| Esaclorobutadiene | * | 10 | - | C |
| **Alifatici alogenati cancerogeni** | | | | |
| Tetraclorometano | * | 5 | Cancerogeno Cat. 3<br>Tossico<br>Pericoloso per l'ambiente | |
| Esacloroetano | * | 10 | - | C |
| Piombo Tetraetile | * | 0.068 | - | - |

Dopo aver visionato tutti risultati delle analisi, anche di quelle ripetute, sulle acque superficiali, sulle acque di falda e sul terreno, le principali conclusioni della consulenza tecnica sulla contaminazione possono essere schematicamente riassunte come di seguito riportato:

- l'intero sito industriale e l'area individuata in prossimità della stazione ferroviaria di Bussi (zona Tre Monti) sono pesantemente contaminate da composti organici clorurati, mercurio, piombo ed idrocarburi policiclici aromatici;
- le sostanze organiche clorurate sono prevalenti nell'area in zona Tre Monti, mentre piombo e mercurio sono stati rinvenuti in maniera ubiquitaria in tutte le aree esaminate;
- la contaminazione, in modo particolare nella zona Tre Monti e nella discarica 2A, è dovuta all'irregolare smaltimento di rifiuti pericolosi;
- nella discarica 2A, che dovrebbe contenere solo rifiuti inerti, sono invece stati smaltiti anche rifiuti pericolosi contenenti composti organoalogenati, mercurio e piombo;
- sia la falda superficiale sia la falda profonda sino a 100 m dal p.c. risultano contaminate da sostanze organiche clorurate all'interno ed a valle del sito industriale. A monte dello stesso, invece, l'acqua risulta non contaminata. La falda sottostante il campo pozzi di Colle Sant'Angelo risulta contaminata da sostanze organiche clorurate della stessa natura di quelle che contaminano suolo-sottosuolo e acque sotterranee all'interno ed all'esterno del sito industriale di Bussi. Fortunatamente, l'entità della contaminazione è minore per gli ovvi fenomeni di attenuazione naturale (diluizione, dispersione, adsorbimento e degradazione).

I contaminanti più pericolosi presenti nelle acque e nei suoli sono classificabili come:

- sostanze note per gli effetti cancerogeni sull'uomo (cloruro di vinile);
- sostanze che dovrebbero considerarsi cancerogene per l'uomo (tricloroetilene, alcuni IPA);
- sostanze da considerare con sospetto per i possibili effetti cancerogeni sull'uomo (tetracloroetilene, tricloroetano, tetraclorometano, piombo, etc.);
- sostanze tossiche, pericolose per l'ambiente (mercurio).

Inoltre:

- la barriera idraulica realizzata per la messa in sicurezza d'emergenza della falda superficiale non è risultata efficace in quando non impedisce la diffusione degli inquinanti;
- nessun intervento (messa in sicurezza d'emergenza o misure di prevenzione) è stato attuato sull'acquifero profondo, che fino all'ottobre 2007 non era stato neppure caratterizzato;
- a valle della confluenza dei fiumi Tirino-Pescara anche le acque superficiali risultano contaminate da composti organici clorurati;
- anche per ammissione della stessa Ausimont, non vi è alcun dubbio che i principali contaminanti rivenuti nelle varie matrici ambientali (sostanze organiche clorurate, mercurio e piombo) siano connessi con le varie attività produttive, attuali e passate, del sito industriale;
- l'acqua dei pozzi di campo Colle Sant'Angelo è stata ed è destinata ad uso potabile (immessa nell'acquedotto pubblico in miscela con acqua di altra provenienza) nonostante contaminata da sostanze organiche clorurate oltre i limiti per i siti inquinati di cui al D.Lgs 152/06 o D.M. 471/99 e soprattutto a volte oltre i limiti massimi previsti dal D.Lgs 31/01;

- nella documentazione esaminata non sono stati riscontrati referti analitici ufficiali (ARTA) in cui i limiti del D.Lgs 31/01 siano stati superati per campioni prelevati ai punti di utilizzo dell'acqua potabile. Sono spesso presenti contaminanti non derivanti dalle operazioni di disinfezione e non contemplati dal D.Lgs 31/01, ma chiaramente riconducibili a quelli che contaminano la falda sottostante il campo Colle Sant'Angelo.

# 8. OBIETTIVI

Questo studio ha sviluppato un sistema di analisi integrata per la valutazione dello stato di salute di un'ecosistema fluviale, mediante l'utilizzo dei Pesci come biondicatori e biomarkers. È basato su un approccio olistico che consideri diversi livelli dell'organizzazione biologica, al fine di identificare un sistema integrato di "allarme precoce" per la valutazione del rischio sulla salute umana e sull'ambiente.
Una sperimentazione simile è già stata effettuata nel 2015 su un tratto del fiume Aterno-Pescara, da Molina Stazione (AQ) a Manoppello (PE), che attraversa il Sito di Interesse Nazionale (SIN) di Bussi Officine, Piano d'Orta e Alanno (PE) (Giansante, 2016).
Questo lavoro, invece, ha interessato la foce del fiume Pescara, presso l'omonima città, ed è stato condotto sulla specie più presente nel tratto considerato, *Liza ramada* (Risso, 1827, Cefalo Calamita). Le catture sono state effettuate durante il periodo riproduttivo, ottobre - novembre, quando gli individui dei due sessi, durante la frega, si addensano in zone definite, rendendo più facile il prelievo con le reti da posta. Inoltre, in questo periodo, le gonadi sono al massimo dello sviluppo ed eventuali anomalie possono essere più evidenti.

Le attività svolte sono state le seguenti:

- Test di genotossicità del micronucleo sugli eritrociti dei Cefali Calamita
- Valutazione dello stato riproduttivo dei Cefali Calamita
- Analisi dei contaminanti ambientali nei tessuti dei Cefali Calamita.

# 9. MATERIALI E METODI

## 9.1 Area di studio

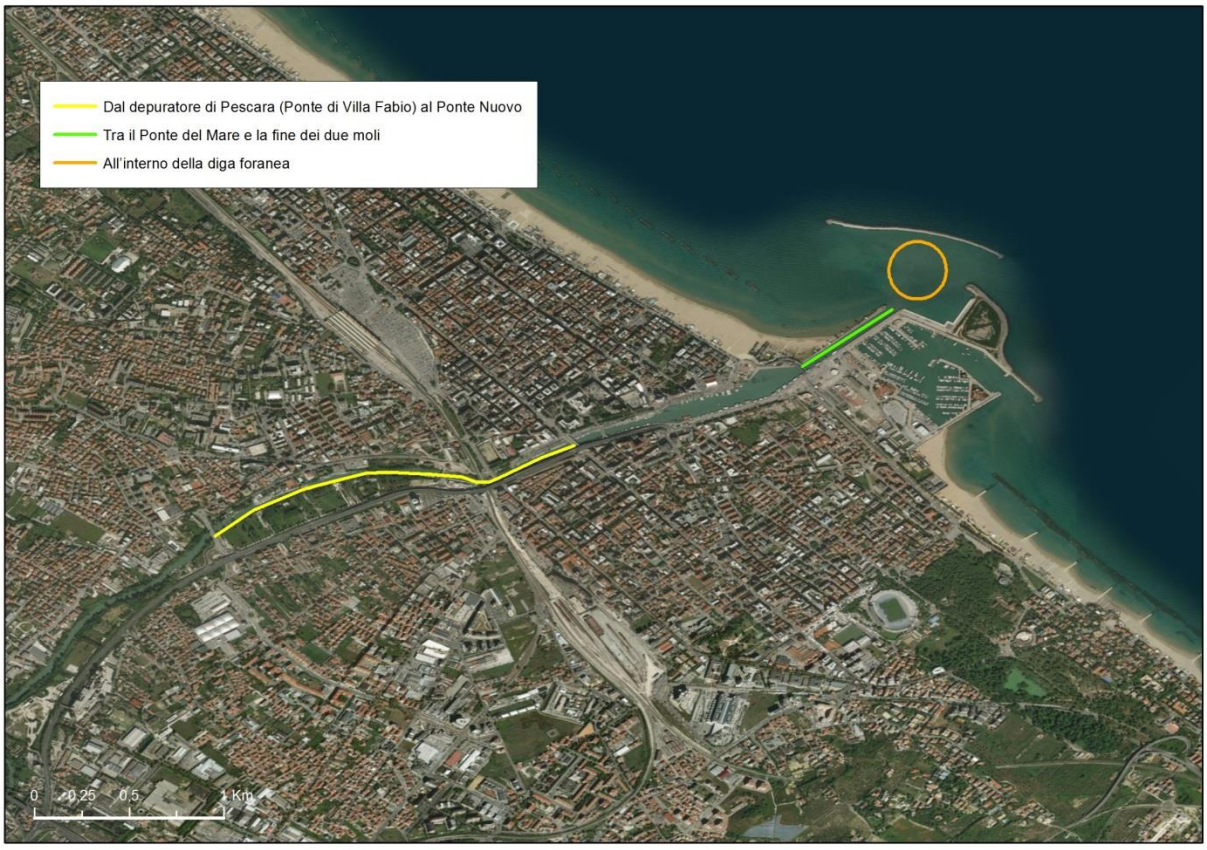
La sperimentazione riguarda un'attività di monitoraggio legata al sito SIN - Bussi sul Tirino (Bussi Officine), istituito e perimetrato con Decreto del Ministro dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare del 29 maggio 2008 e agli altri due siti contaminati di Piano d'Orta e di Alanno (Figura 7.1).

L'area indagata è rappresentata dal tratto finale del fiume Pescara (Figura 9.1), in una zona di transizione, dalle acque dolci a monte della foce alle acque salmastre interne alla diga foranea. Questa scelta è derivata dal presupposto di verificare se le contaminazioni riscontrate nei pesci nel monitoraggio del 2105 (Giansante, 2016), nei punti di campionamento a Bussi Officine (PE) e a Manoppello (PE), siano riscontrabili anche alla foce, a circa 50 km di distanza dal sito SIN.

In questa area sono stati individuati tre tratti:

- Sito 1: tratto tra il Ponte del Mare e la fine dei due moli (molo nord e molo sud)
- Sito 2: tratto tra lo scarico del depuratore di Pescara (Ponte di Villa Fabio) al Ponte Nuovo (ponte di Viale Guglielmo Marconi):
- Sito 3: zona all'interno della diga foranea (acque salmastre)

**Figura 9.1** Tratti monitorati in prossimità della foce del fiume Pescara.



## 9.2 Campionamento di fauna ittica

Per la cattura dei pesci è stata utilizzata una rete da posta della lunghezza di 100 m (tipo "barracuda") con maglia 40 mm calata e salpata da una imbarcazione della piccola pesca (Figura 9.2).

**Figura 9.2** Rete da posta usata per il monitoraggio.

Per il campionamento di fauna ittica, oltre alla rete da posta, sono stati necessari:

- frigobox della capacità di 50 litri;
- tubo di plastica collegato alla pompa dell'acqua per il ricambio continuo all'interno del frigobox;
- guadini di varia misura;
- secchi e mastelli per il mantenimento dei pesci durante il campionamento e per il trasferimento in laboratorio.

I pesci catturati sono stati tutti portati vivi presso la Sezione Diagnostica di Pescara dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" (IZSAM) dove, una volta anestetizzati con estratto di chiodi di garofano (Clove oil), sono stati pesati con una bilancia tecnica con precisione fino al grammo, fotografati con una scala metrica di

riferimento e successivamente misurati (lunghezza massima, lunghezza standard e altezza) al Personal Computer con un programma di analisi di immagine "Image-J" (Fig. 9.3).

**Figura 9.3** Esemplare di Cefalo Calamita con riferimento metrico.

Tutti gli esemplari catturati (n. 39) sono stati sottoposti a prelievo di sangue, da utilizzare nel Test del Micronucleo, per mezzo di una siringa monouso da 2,5 ml precedentemente eparinizzata e provvista di un ago da 30 Gauce x 4mm. Dopo il prelievo di sangue i pesci sono stati sacrificati per il prelievo sia di tessuto muscolare per le analisi chimiche sia di tessuto gonadico, per gli esami istologici.
I campioni di muscolo sono stati conferiti per le analisi chimiche a Teramo presso la Sede Centrale dell'IZSAM - Reparto di Bromatologia.
Per la raccolta dei campioni di muscoli e sangue, è stata utilizzata la seguente strumentazione:

- pinzette da laboratorio;
- forbici;
- guanti monouso;
- siringhe sterili monouso da 2,5 ml;
- anticoagulante (eparina sodica),
- vetrini con banda sabbiata per la denominazione del campione.

## 9.3 Indici di condizione

La condizione degli individui è stata valutata mediante l'applicazione di tre indici:

1. il Condition Factor di Fulton (K), che indica i cambiamenti nelle riserve alimentari ed è quindi un indicatore della condizione generale del pesce

il valore di K è stato calcolato nel seguente modo, Froese (2006):

$$K = 100 * (PT/LT\ 3)$$

dove:
K è il fattore di condizione o coefficiente di condizione, spesso chiamato semplicemente "fattore K".
PT è il peso totale del pesce in grammi (g);
LT è la lunghezza totale del pesce in millimetri (mm), elevata al cubo poiché la crescita del peso è proporzionale alla crescita in volume.

Il valore di K è influenzato dai seguenti fattori: specie, età del pesce, sesso, stagione, fase di maturazione, pienezza dell'intestino, tipo di cibo consumato, quantità di riserva di grasso e grado di sviluppo muscolare. In alcune specie ittiche, le gonadi possono pesare fino al 15% o più del peso corporeo totale. Nelle femmine, il valore K tende a diminuire rapidamente dopo che le uova vengono emesse. Per tale motivo questo indice riflette le circostanze fisiche e biologiche, le fluttuazioni della disponibilità alimentare, le infezioni parassitarie e i fattori fisiologici (Le Cren, 1951).

2. L'indice epatosomatico (IES) che dà una stima dello sviluppo del fegato, organo in cui sono concentrate molte delle attività di detossificazione dell'organismo

il valore di IES è stato calcolato nel seguente modo:

$$IES = 100 * (PF/PT)$$

dove:
IES è è il rapporto percentuale tra peso del fegato e peso del corpo;
PT è il peso totale del pesce in grammi (g);
PF è il peso del fegato del pesce in grammi (g).

Questo indice è utilizzato come risposta dell'organismo ad uno stress non specifico. Esso può essere considerato tra gli indicatori biologici che si manifestano a livello fisiologico nell'organismo ed assume generalmente valori più elevati in organismi che vivono in condizioni più stressanti. Infatti, per questo indice sono state osservate differenze tra siti con diversi livelli di contaminazione da xenobiotici ed, in particolare, sono stati rilevati valori maggiori in corrispondenza dei siti più contaminati. Altri fattori, però, quali, ad esempio, l'età degli individui, lo stato nutrizionale e la quantità di ormoni riproduttivi in circolo, possono

causare un innalzamento dei valori di IES. Conseguentemente l'associazione tra taglia del fegato e contaminazione del sito può essere fatta solo combinando la misura dell'indice epatosomatico con misure di accumulo di contaminanti nel tessuto e con studi istopatologici.

3. L'indice gonadosomatico (IGS) che dà una stima dello sviluppo della gonade, organo deputato alla riproduzione

il valore di IGS è stato calcolato secondo la seguente formula (Fernandez-Delgado *et al.*, 1988):

$$IGS = 100 * (PG/PT)$$

dove:
IGS è il rapporto percentuale tra peso della gonade e peso del corpo;
PT è il peso totale del pesce in grammi (g);
PG è il peso della gonade del pesce in grammi (g).

## 9.4 Analisi riproduttiva

### 9.4.1 Valutazione del sesso

La valutazione del sesso dei pesci catturati è stata effettuata sia ad un livello macroscopico, nel momento in cui è stata estratta la gonade dal pesce, sia ad un livello microscopico, mediante osservazione del preparato istologico di una porzione del tessuto gonadico. Una volta definito il sesso è stato possibile calcolare la *Sex ratio* (SR) come il rapporto tra maschi (MM) e femmine (FF).

### 9.4.2 Valutazione dello stato di maturità

Lo stadio di maturità dei maschi e delle femmine è stato valutato mediante identificazione macroscopica e microscopica, assegnando alla gonade uno stadio di maturità secondo le Tabelle 9.1 e 9.2.

### 9.4.3 Preparazione dei campioni per analisi istologiche

Dalla emigonade destra di ciascun pesce è stata prelevata una porzione di tessuto di circa 0,2 cm di spessore dalla parte centrale ed è stata fissata in formaldeide tamponata al 4%.
Tutti i prelievi di gonade sono stati sottoposti ad esami istologici.

### 9.4.4 Istologia

I campioni fissati sono stati disidratati, passandoli in concentrazioni di etanolo crescenti, e inclusi in paraffina. Sezioni di circa 5 µm sono state colorate in ematossilina-eosina. L'analisi morfologica e le fotografie delle sezioni sono state effettuate al microscopio (Wild Leitz GMBH) dotato di una macchina fotografica digitale (Polaroid Digital Microscope Camera DMC 1). Dai vetrini realizzati sono stati fotografati dei campi istologici caratteristici mediante obiettivi 5x e 10x.

**Tabella 9.1**. Caratteristiche macroscopiche degli stadi di maturità e descrizione istologica degli ovari dei cefali campionati (Tyler & Sumpter, 1996 modificato).

| Stadio di maturità | Descrizione macroscopica | Descrizione istologica |
|---|---|---|
| Stadio 0<br>Indifferenziato / Immaturo | Ovari filiformi, lunghi meno di 1/3 della cavità celomatica. Appaiono di colore bianco traslucido. Non sono visibili ad occhio nudo le lamelle ovariche o gli oociti. | Presenza di nidi di oogonia lungo le lamelle ovigere |
| Stadio I<br>Immaturo | Ovari piccoli ma più spessi rispetto ad una gonade alla stadio 0, lunghi meno di 1/3 della cavità celomatica. Appaiono grosso modo di colore bianco opaco. Non sono visibili ad occhio nudo le lamelle ovariche o gli oociti. | Presenza di oociti primari e secondari tutti in stadio di pre-vitellogenesi |
| Stadio II<br>In maturazione | Ovari lunghi circa i 2/3 della cavità celomatica. Appaiono di colore bianco-rosato aranciato. Sono visibili ad occhio nudo sia le lamelle ovariche che gli oociti. | Elevata presenza di oociti in vitellogenesi e ridotta presenza di oociti primari e secondari (cefali: maturazione sincrona). |
| Stadio III<br>Maturo in deposizione | Ovari gonfi che riempiono completamente la cavità ventrale. Il colore passa da aranciato ad arancio. La consistenza è morbida e l'irrorazione dei vasi molto evidente. Le lamelle ovariche e gli oociti sono visibili ad occhio nudo. | Gli oociti sono in fase di vitellogenesi avanzata con il citoplasma ricco di granuli di tuorlo e il nucleo migra verso il polo animale. La maturazione finale è caratterizzata dalla dissoluzione della membrana e dall'idratazione dell'oocita. |
| Stadio IV<br>Fase Post-Riproduttiva | Ovario parzialmente svuotato di colore grigio-rossastro. Sono visibili ancora uova mature di colore arancione insieme ad oociti bianco-opachi. | Sono presenti sia oociti in vitellogenesi avanzata sia oociti atresici caratterizzati da un rivestimento vitellino frammentato e dalle cellule follicolari ipertrofiche. |

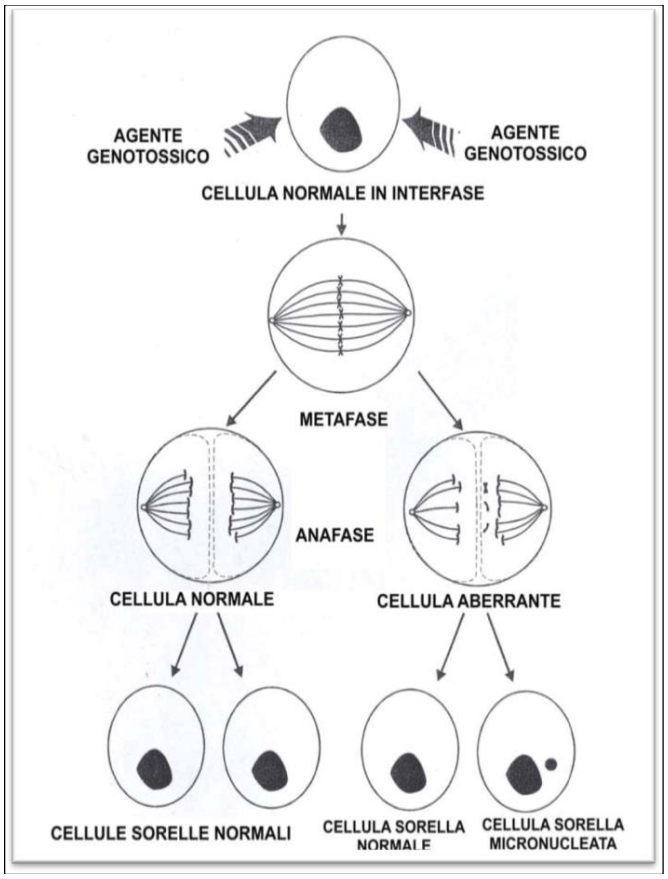
**Tabella 9.2.** Caratteristiche macroscopiche degli stadi di maturità e descrizione istologica del testicolo dei cefali campionati (Tyler & Sumpter, 1996 modificato).

| Stadio di maturità | Descrizione macroscopica | Descrizione microscopica |
|---|---|---|
| Stadio I<br>Immaturo | Testicoli filiformi e di colore bianco opaco. | I tubuli sono chiusi, contenenti estese cisti di spermatogoni e spermatociti |
| Stadio II<br>In maturazione | I testicoli, di colore bianco, aumentano di dimensioni e spessore fino ad occupare i 2/3 della cavità celomatica. Hanno una forma sub-triangolare e una consistenza compatta. | Elevata presenza di cisti di spermatociti e spermatidi nella parete del tubulo e una piccola presenza di spermatozoi maturi nel lume dei tubuli seminiferi |
| Stadio III<br>Maturo/Fluente | I testicoli sono grandi, completamente sviluppati per l'intera lunghezza della cavità addominale. La consistenza è morbida e ii colore bianco-latte. Una leggera pressione provoca il rilascio di sperma. | Alta densità di spermatozoi maturi nei tubuli seminiferi e minore presenza di cisti di cellule in maturazione nelle parete dei tubuli |
| Stadio IV<br>Fase Post-Riproduttiva | I testicoli appaiono parzialmente o totalmente svuotati, di consistenza flaccida e di colore grigio-biancastro. | Pochi spermatozoi residui nei tubuli e nel dotto deferente. |

## 9.5 Test del Micronucleo (MN)

Il Test del Micronucleo si basa sulla valutazione della presenza di micronuclei negli eritrociti del sangue periferico dei Pesci e, da oltre 20 anni (Ayllon & Garcia-Vazquez, 2001), è utilizzato in studi citogenetici sia come indicatore biologico di inquinamento degli ecosistemi acquatici (studi *in situ*) sia per la valutazione genotossica di agenti fisici e chimici dopo esposizione diretta o indiretta (Bahari *et al*, 1994; Nepomuceno *et al.*, 1997; Campana *et al.*, 1999; Sanchez-Galan *et al.*, 2001; Lemos *et al*, 2001, 2007; Cavaş & Gözükara, 2005).
Questo test è considerato rapido, sensibile ed affidabile per evidenziare eventuali danni al DNA a livello cromosomico (Lemos *et al.*, 2008).
I Pesci rispondono alle sostanze chimiche in modo simile a quello dei Vertebrati Superiori, per cui vi è un crescente utilizzo di questo metodo come sistema modello (Powers, 1989).
Il test consiste nel rilevare al microscopio ottico i micronuclei originati dal DNA degli eritrociti sia da frammenti acentrici derivanti da rotture cromosomiche sia dalla mancata incorporatura nel nucleo principale, dopo la mitosi, dei cromosomi in ritardo nella divisione cellulare, durante l'anafase (Fig. 9.4).

**Figura 9.4.**Illustrazione delle fasi che caratterizzano la formazione di micronuclei ad opera di un agente tossico (Cajaraville *et al.*, 2003).




### 9.5.1 Preparazione degli strisci di sangue

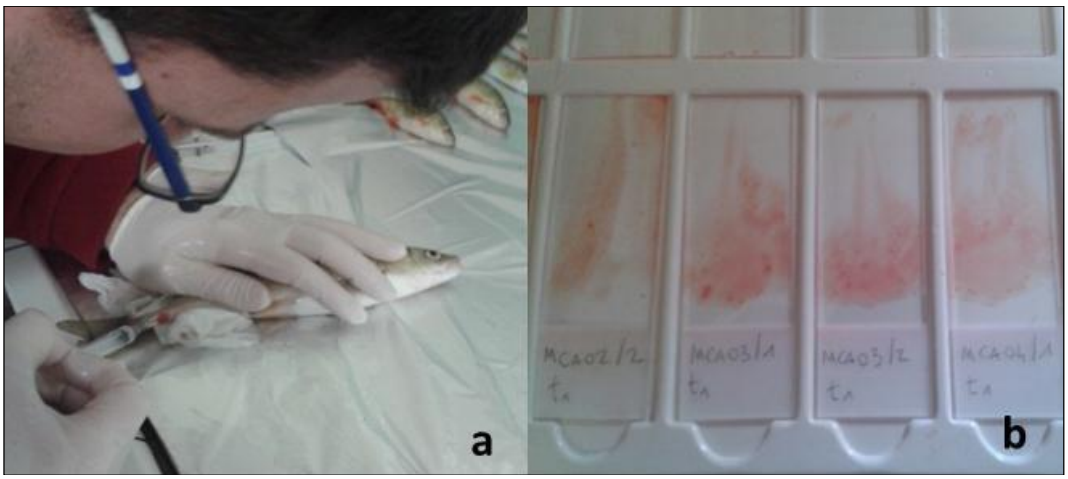
Per l'osservazione dei micronuclei è stato necessario preparare uno striscio di sangue venoso da colorare e leggere al microscopio ottico.
Il prelievo del sangue venoso attraverso la vena caudale è stato effettuato nel modo seguente:

- per evitare la coagulazione del sangue, per ciascun esemplare, con una siringa in plastica monouso sterile da 2,5 ml, la stessa utilizzata per il prelievo, sono stati aspirati 2 ml di eparina sodica, distribuendo la sostanza sulle pareti interne della siringa ed eliminando l'eccesso;
- dopo aver adagiato il campione sul banco da lavoro e averlo immobilizzato su un fianco, il prelievo di sangue venoso è stato effettuato sulla vena caudale, in prossimità della pinna anale.

Una volta effettuato il prelievo, sono stati allestiti gli strisci di sangue su vetrino (previa pulizia degli stessi con alcol etilico). Per ciascun campione sono stati allestiti 2 - 3 vetrini per aumentare la probabilità di una buona esecuzione dello striscio per una lettura ottimale.
La metodica utilizzata è stata la seguente (APAT, 2005):

- su un vetrino pulito e asciutto è stata depositata una piccola goccia di sangue a circa 0,5 cm dalla banda sabbiata;
- è stato preso un secondo vetrino ed è stato posto verticalmente al centro del primo vetrino;
- il secondo vetrino è stato fatto arretrare, con un inclinazione di 45° circa, fino a toccare la goccia di sangue, che si diffondeva rapidamente lungo la linea di contatto dei due vetrini;
- il secondo vetrino è stato spostato rapidamente in avanti, con movimento deciso e uniforme, mantenendo l'inclinazione, fino a distendere completamente la goccia di sangue;
- lo striscio così allestito è stato fatto asciugare all'aria per 24h (Fig 9.5) .

**Figura 9.5.** (a) prelievo del sangue periferico dalla vena caudale; (b) asciugatura degli strisci all'aria.




Una volta asciugati, i vetrini sono stati sottoposti a colorazione Giemsa nel seguente modo:

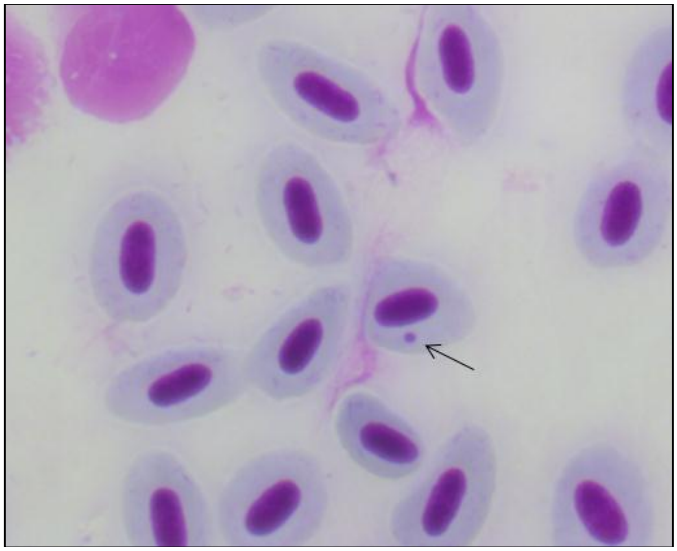
- immersione degli strisci per 10' in una vaschetta per colorazioni contenente alcool metilico assoluto;
- idratazione degli strisci con immersione in una vaschetta contenente acqua di rubinetto;
- immersione degli strisci in una soluzione di Giemsa al 10% (10 ml Giemsa + 90 ml acqua di rubinetto) per 15 minuti;
- risciacquo con acqua distillata e asciugatura all'aria.

### 9.5.2 Lettura dei vetrini ed elaborazione dei dati

La lettura dei vetrini è stata realizzata per mezzo di un microscopio ottico in campo chiaro LEICA DMR, con obiettivo 100x ad immersione. Il microscopio era dotato di fotocamera LEICA DFC, che attraverso il programma LAS V4.2, ha permesso l'acquisizione, l'archiviazione e l'elaborazione delle immagini.
Per la lettura dei vetrini sono state identificate delle aree con una distribuzione accettabile di eritrociti, dove almeno il 50% di essi era distinguibile dagli altri, con il citoplasma ben

definito e separato. Due eritrociti potevano toccarsi, ma non sovrapporsi, ad accezione del caso in cui la porzione sovrapposta interessava una piccola parte del citoplasma e i confini cellulari erano visibili in trasparenza. Rispettati i criteri di accettabilità nella lettura degli eritrociti, si è proceduto ad individuare un'area all'interno dei campi ottici da cui partire per iniziare il conteggio, prendendo le coordinate di riferimento x,y, al fine di rendere replicabile la prova. Quindi si è proceduto alla lettura verso destra o sinistra di 2.000 eritrociti normali, prendendo nota dei cambi di direzione nelle coordinate del vetrino.
Le letture sono state fatte da un singolo operatore. I micronuclei sono stati identificati per mezzo delle loro caratteristiche chiave: forma rotondeggiante, misura della grandezza che varia da 1/10 a 1/30 rispetto al nucleo principale, capacità di non rifrangere la luce a differenza degli artefatti della colorazione (Fig. 9.6). Se per la lettura del campione sono stati utilizzati più vetrini, il numero dei micronuclei è stato dato dalla media del numero di micronuclei riscontrati in tutti i vetrini.

**Figura 9.6** Immagine di un campo di uno striscio visualizzato con obiettivo 100x; la freccia indica il micronucleo presente.



I dati sono stati elaborati sulla base del calcolo delle frequenze di micronuclei per 1.000 cellule di eritrociti (FMN‰), utilizzando la seguente formula:

$FMN‰ = (nMN/2000EN) \times 1000$
dove:
n = numero dei micronuclei individuati
EN = eritrociti normali.

## 9.6 Analisi chimiche

Per quanto riguarda la contaminazione chimica, sono state prese in considerazione molecole già riscontrate nei siti contaminati di Bussi Officine.
Sui campioni di muscolo di pesce sono state effettuate a Teramo presso la Sede Centrale dell'IZSAM - Reparto di Bromatologia, le seguenti analisi chimiche:

- composti inorganici (metalli pesanti): arsenico, cadmio, piombo, cromo, mercurio;
- composti organici: diossine (su prodotto intero), PCB diossina-simili (su prodotto intero), PCB non diossina simili (su prodotto intero), diossine + PCB diossina-simili WHO-TEQ-05 (su prodotto intero), Pesticidi organoclorurati, Pesticidi organofosfati.

Metodi di analisi:

- UNI EN 15763:2010 – Determinazione di elementi in tracce. Determinazione di arsenico, cadmio, mercurio e piombo nei prodotti alimentari per mezzo di spettrometria di massa con plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) dopo digestione sotto pressione.
- EPA Method 8280B:1998 "Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by high resolution gas chromatography/low resolution mass spectrometry (HRGC/LRMS)".
- prEN 16215 "Animal feed: determination of dioxins and dioxin-like PCBs by HRGC/HRMS and of indicator PCBs by GC/MS (HRMS or LRMS)" - DRAFT 03 2009
- Determinazione dei residui di pesticidi organo-clorurati negli alimenti per l'uomo, nei mangimi e nelle acque (metodo GC E GC-MS), (Torreti *et al.*, 1987).
- Determinazione dei residui di pesticidi organo-fosforati negli alimenti per l'uomo, nei mangimi e nelle acque (metodo GC E GC-MS) (Pagliuca *et al.*, 2005; Torreti *et al.*, 1987).

## 9.7 Analisi statistiche

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando i software MS Excel e la versione 2.13 di Past (Hammer *et al.*, 2001). Per l'elaborazione dei dati sono stati utilizzati test-non parametrici, visto il numero ridotto dell'unità campionaria (<20-30 esemplari) e quindi l'assenza di una distribuzione normale. Le differenze tra i dati sono state analizzate per mezzo del test di Kruskal-Wallis (1952); le differenze significative ($p < 0,05$) risultanti dal test sono state analizzate ulteriormente con il test di Mann-Whitney (1947) attraverso la comparazione a coppie per determinare le differenze significative tra i gruppi testati.

# 10.RISULTATI

## 10.1 Campionamento di fauna Ittica

In totale sono stati campionati 39 esemplari di pesci, tutti appartenenti alla specie *Liza ramada* (Risso, 1826). Nella Tabella 10.1 sono ripartiti nel dettaglio le date e i siti del campionamento in cui sono avvenute le catture, oltre al numero di esemplari pescati.

**Tabella 10.1**. Esemplari catturati nei 3 siti di campionamento.

| Data Campionamento | Sito di campionamento | N° esemplari | Specie |
|---|---|---|---|
| 16 ottobre 2017 | 1 - Tratto tra lo scarico del depuratore di Pescara (Ponte di Villa Fabio) al Ponte Nuovo (ponte di Viale Guglielmo Marconi). | 17 | Cefalo Calamita |
| 24 ottobre 2017 | 2 - Tratto tra il Ponte del Mare e la fine dei due moli (molo nord e molo sud). | 16 | Cefalo Calamita |
| 6 novembre 2017 | 3 - Zona all'interno della diga foranea (acque salmastre). | 6 | Cefalo Calamita |

## 10.2 Dati biometrici

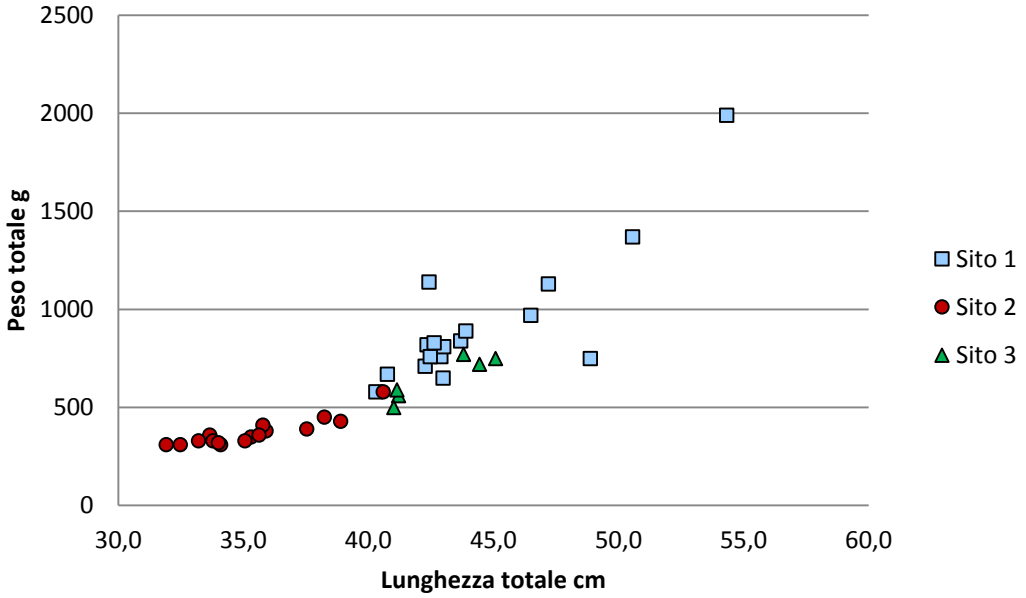
I dati biometrici valutati nello studio sono stati la lunghezza standard e totale, l'altezza, il peso totale e il peso della gonade e del fegato.
I valori medi e le relative deviazioni standard sono riportate in Tabella 10.2. I pesci catturati nel Sito 1 sono risultati mediamente più grandi in termini sia di lunghezza/altezza sia di peso totale e degli organi, mentre i valori medi dei pesci catturati nel Sito 2 sono risultati i più piccoli.
Tutti i parametri dei pesci catturati nei tre siti di campionamento sono stati valutati mediante il test di Kruskal-Wallis, il quale in tutti ha indicato la presenza di una differenza significativa tra i siti campionati ($p < 0,05$). Le differenze significative tra i gruppi sono state valutate con il test di Mann-Whitney e i risultati sono riportati in tabella 10.2.

**Tabella 10.2** Valori medi e deviazioni standard delle lunghezze (Ls=lunghezza standard; Lt=Lunghezza totale; H=Altezza), del peso totale e del peso degli organi nei pesci catturati nei 3 siti di campionamento. Per ciascun parametro sono state testate le differenze tra i Siti di campionamento mediante confronti a coppie con il test di Mann-Whitney. Gli esponenti $^{a,b,c}$ indicano la presenza di differenze significative tra i dati (p-value<0,05).

| | Sito 1 | Sito 2 | Sito 3 |
|---|---|---|---|
| **Ls (cm)** | 38,8 ± 3,7 $^{a}$ | 30,2 ± 2,1 $^{b}$ | 36,8 ± 2 $^{a}$ |
| **Lt (cm)** | 44,5 ± 3,7 $^{a}$ | 35,4 ± 2,4 $^{b}$ | 42,8 ± 1,9 $^{a}$ |
| **H (cm)** | 8,6 ± 0,9 $^{a}$ | 6,7 ± 0,5 $^{b}$ | 7,4 ± 0,6 $^{c}$ |
| **Peso (g)** | 921,8 ± 340,5 $^{a}$ | 371,9 ± 70,6 $^{b}$ | 648,3 ± 112,7 $^{c}$ |
| **Peso Gonade (g)** | 75,8 ± 46,7 $^{a}$ | 1,3 ± 2,2 $^{b}$ | 22,2 ± 25,6 $^{c}$ |
| **Peso Fegato (g)** | 11,1 ± 4,5 $^{a}$ | 3,9 ± 1,5 $^{b}$ | 6,4 ± 4,4 $^{b}$ |

La Figura 10.1 mostra graficamente la distribuzione degli esemplari catturati nei tre siti di campionamento in termini di lunghezza totale e peso totale. Dal grafico è possibile osservare una parziale sovrapposizione delle taglie dei pesci del Sito 3 sia con i pesci del Sito 1 sia con i pesci del Sito 2.

**Figura 10.1**. Distribuzione delle taglie degli esemplari catturati nei tre siti di campionamento.




## 10.3 Indici di condizione

GIi indici di condizione valutati nello studio sono stati il condition factor (K), l'indice epatosomatico (IES) e l'indice gonadosomatico (IGS). I valori medi e le relative deviazioni standard sono riportate in Tabella 10.3. I valori medi più elevati per gli indici di condizione esaminati sono stati registrati per i pesci catturati nel Sito 1. I pesci catturati nel Sito 2, invece, hanno mostrato un valore medio dell'IGS nettamente più basso rispetto agli altri.

**Tabella 10.3.** Valori medi e deviazioni standard degli indici di condizione (K=condition factor; IGS=Indice gonado somatico; IES=indice epatosomatico), nei pesci catturati nei 3 siti di campionamento.

| | Sito 1 | Sito 2 | Sito 3 |
|---|---|---|---|
| **K** | 1 ± 0,2 | 0,8 ± 0,1 | 0,8 ± 0,1 |
| **IGS** | 8 ± 2,7 | 0,3 ± 0,5 | 3,1 ± 3,2 |
| **IES** | 1,2 ± 0,3 | 1 ± 0,3 | 0,9 ± 0,5 |

## 10.4 Analisi riproduttiva

### 10.4.1 Valutazione del sesso

In Tabella 10.4 sono riportati i dati relativi alla valutazione del sesso dei pesci catturati nei tre siti monitorati in base all'osservazione macroscopica e a seguito dell'osservazione microscopica dei preparati istologici. Per le gonadi dei pesci campionati nei Siti 1 e 3, è stata osservata una totale sovrapposizione tra la valutazione macroscopica e quella microscopica (100%), al contrario per i pesci del Sito 2, in 6 casi su 16 (37,5 %), si è dovuto riassegnare il genere a seguito dell'osservazione del preparato istologico. La sex ratio è risultata a vantaggio delle femmine per i pesci campionati nei Siti 1 e 3 e leggermente a favore dei maschi per il Sito 2.

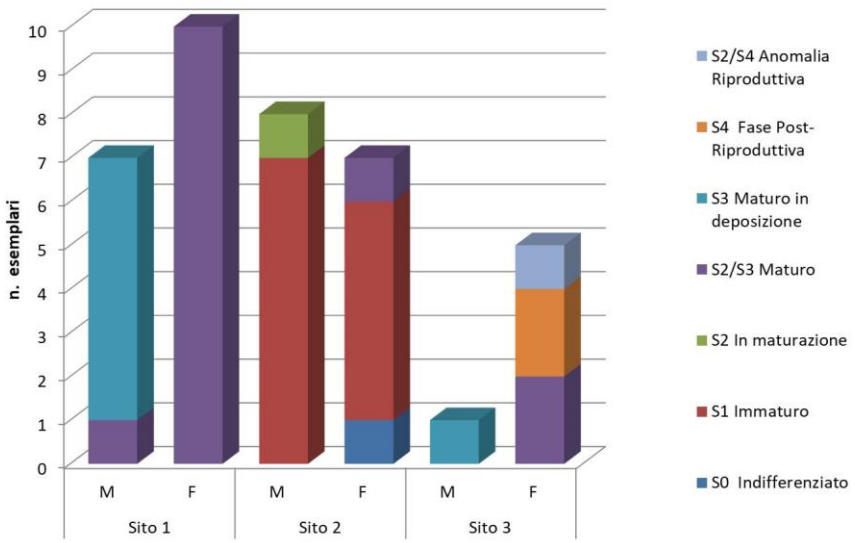
**Tabella 10.4**. Assegnazione del genere in base all'osservazione macroscopica e microscopica delle gonadi dei pesci pescati nei tre siti di campionamento. M = maschio; F = femmina, I = indeterminato.

| **Osservazione** | **Assegnazione del genere (M/F/I)** | | |
|---|---|---|---|
| | **Sito 1** | **Sito 2** | **Sito 3** |
| **Macroscopica** | 7/10/0 | 8/4/4 | 1/5/0 |
| **Microscopica** | 7/10/0 | 8/7/1 | 1/5/0 |

### 10.4.2 Valutazione dello stato di maturità

Lo stadio di maturità dei maschi e delle femmine, valutato mediante identificazione microscopica, secondo quanto riportato nelle Tabelle 9.2 e 9.3, è riassunto nella Figura 10.2.

**Figura 10.2**. Stadio di maturazione delle gonadi maschili e femminili dei pesci pescati nei tre siti di campionamento .



Nel Sito 1, le gonadi maschili e femminili sono risultate tutte ad uno stadio di piena maturazione, con le femmine che erano prossime all'evento di deposizione (Figura 10.3) e i maschi che avevano una elevata quantità di spermatozoi liberi e maturi nei tubuli seminiferi e nei dotti deferenti (Figura 10.4).

**Figure 10.3.** Gonade femminile di *L. ramada* catturata nel Sito 1. Prevalenza di ovociti in avanzato stadio di vitellogenesi (OVG), presenza di un numero ridotto di ovociti primari (OP).

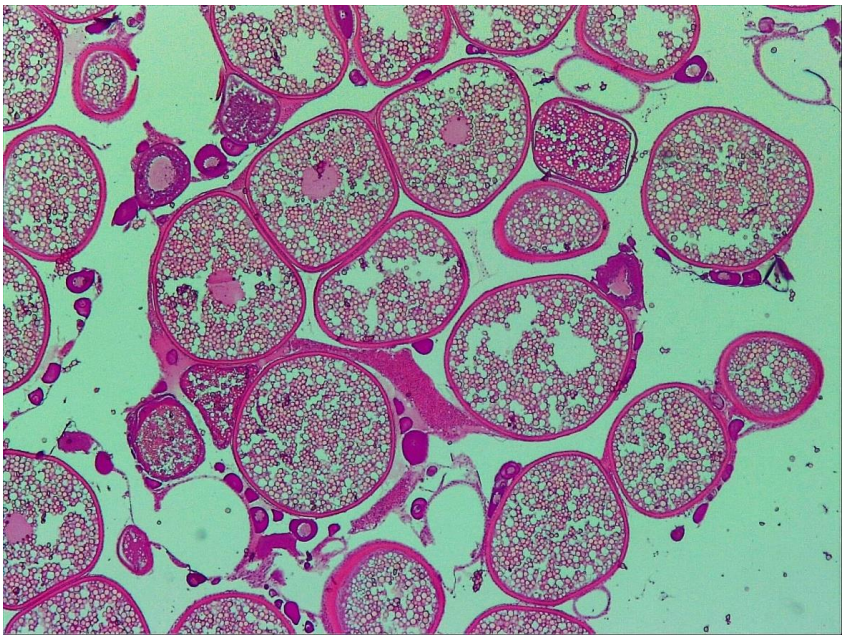
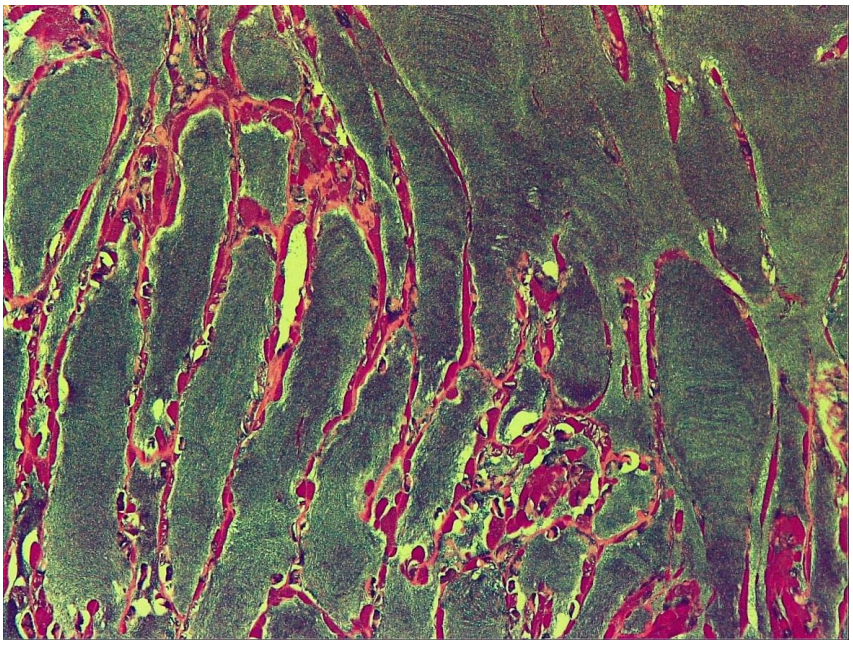


**Figura 10.4.** Gonade maschile di *L. ramada* catturata nel Sito 1. Estesa presenza di spermatozoi (SPZ) nei tubuli seminiferi e nei dotti deferenti.



Nel Sito 2, le gonadi maschili e femminili sono risultate prevalentemente immature. La maggior parte delle femmine (71,4 %) presentavano una gonade caratterizzata dalla presenza di oociti primari e secondari tutti in stadio di pre-vitellogenesi (Figura 10.5). Un esemplare (14,3 %) è stato classificato come femmina in fase di differenziazione (Figura 10.6) e infine, la gonade di un esemplare (14,3 %) è stata classificata matura (Figura 10.3).
L'87,5 % dei maschi è risultato immaturo con tubuli seminiferi chiusi, contenenti cisti di spermatogoni e spermatociti (Figura 10.7), il testicolo di un solo esemplare è stato classificato in fase di maturazione in quanto presentava un'elevata presenza di cisti di spermatociti e spermatidi nella parete del tubulo e una piccola presenza di spermatozoi maturi nel lume dei tubuli seminiferi (Figura 10.8).

**Figura 10.5.** Gonade femminile immatura osservata in esemplare di *L. ramada* pescato nel Sito 2. Presenza di oociti primari e secondari.

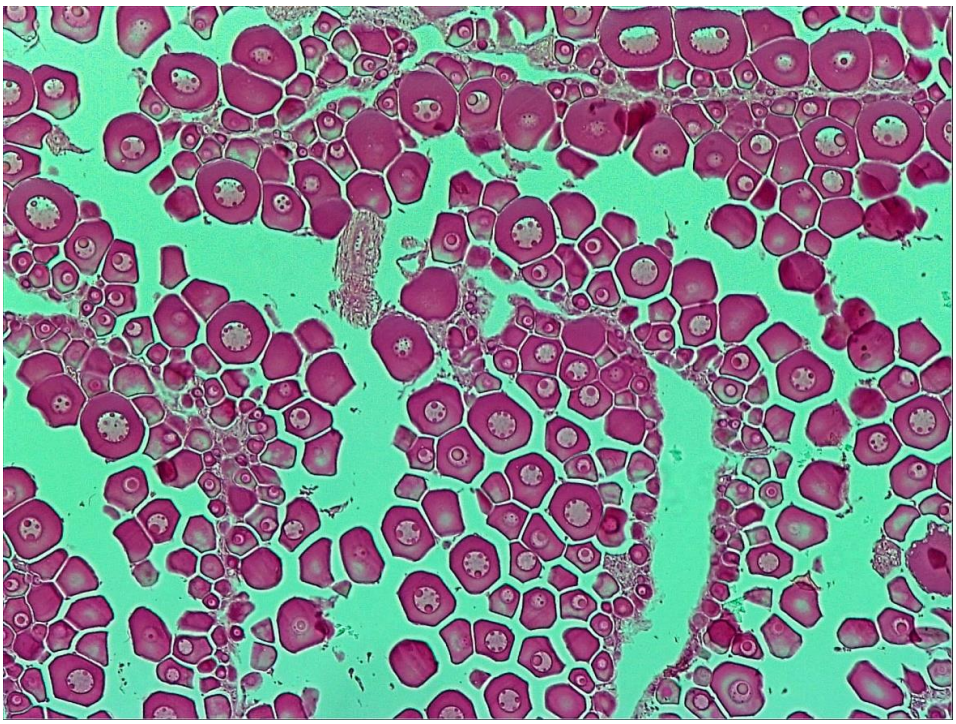


**Figura 10.6.** Gonade femminile in differenziazione osservata in esemplare di *L. ramada* pescato nel Sito 2. Presenza di nidi di oogonia lungo le lamelle ovigere.

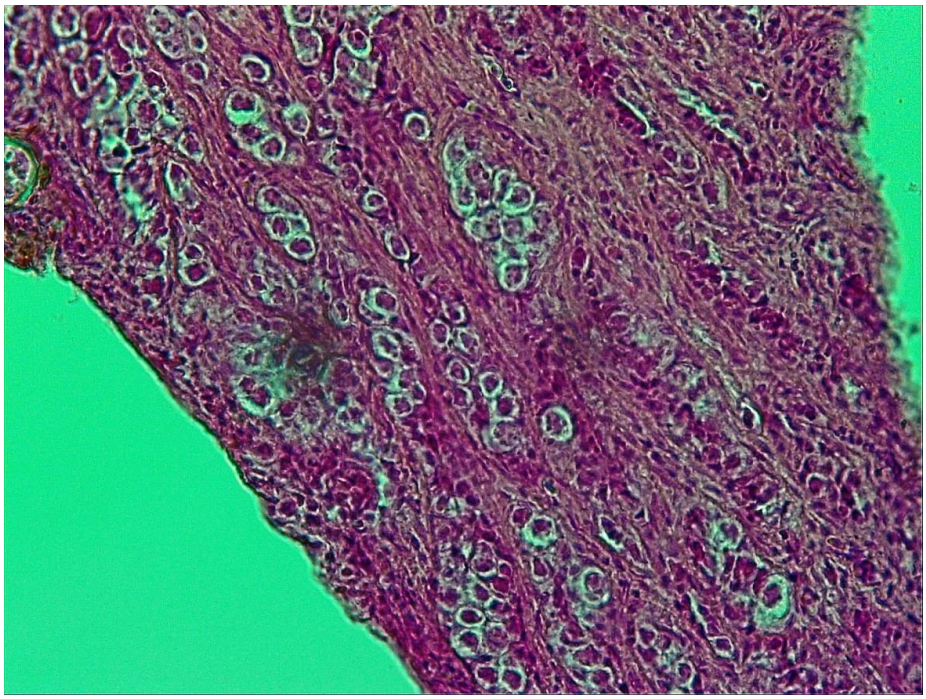


**Figura 10.7.** Gonade maschile immatura osservata in esemplare di *L. ramada* pescato nel Sito 2. A: presenza di tubuli seminiferi chiusi, contenenti cisti di spermatogoni e spermatociti, ingrandimento 10X. B: ingrandimento 40X.

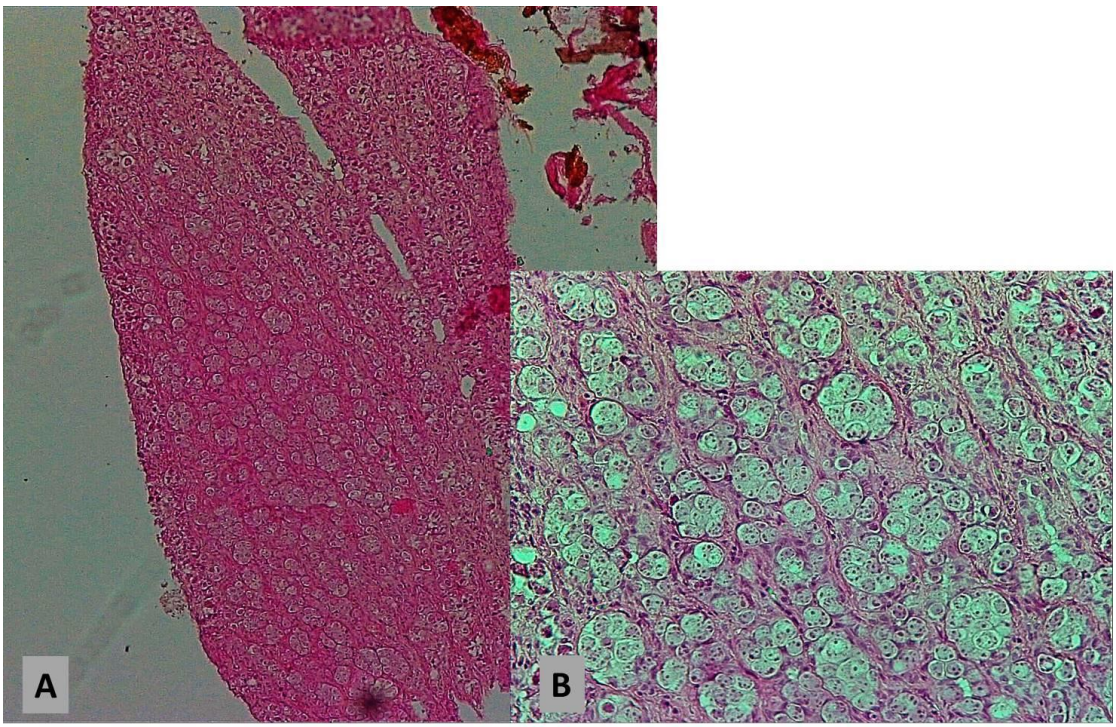
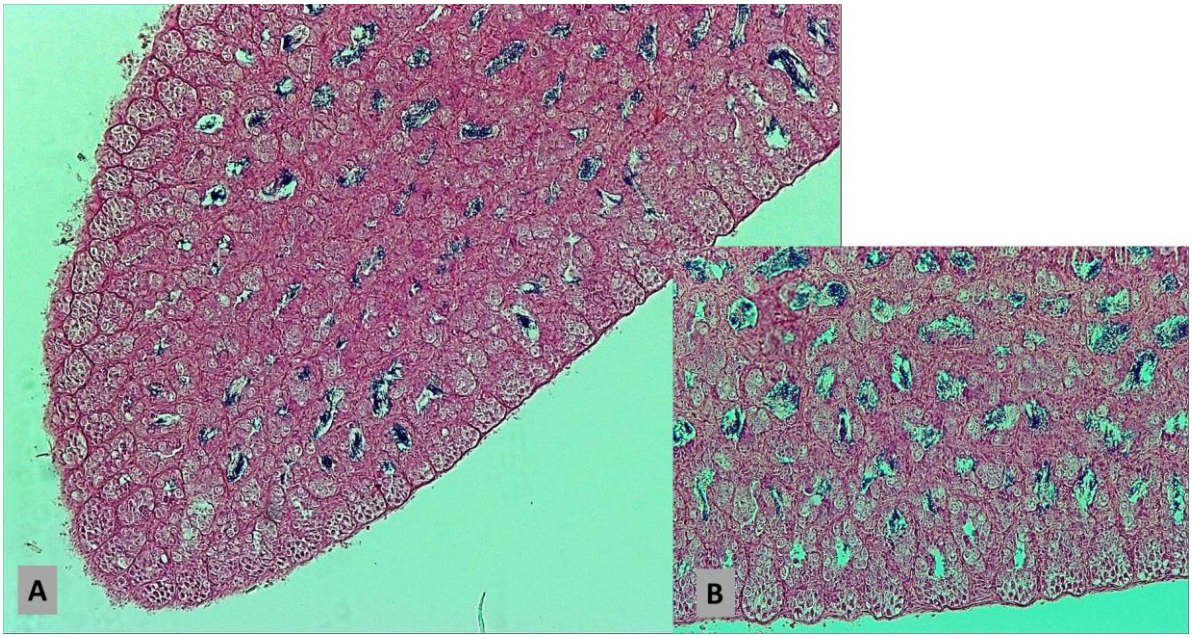


**Figura 10.8.** Gonade maschile in maturazione osservata in esemplare di *L. ramada* pescato nel Sito 2. Elevata presenza di cisti di spermatociti e spermatidi nella parete del tubulo e una piccola presenza di spermatozoi maturi nel lume dei tubuli seminiferi. A: ingrandimento 10X, B: ingrandimento 40X.




Nel Sito 3, il testicolo dell'unico esemplare maschio catturato è risultato alla stadio maturo/fluente con un alta densità di spermatozoi maturi nei tubuli seminiferi e una minore presenza di cisti di cellule in maturazione nelle parete dei tubuli. Delle cinque femmine catturate 2 presentavano un'ovario con oociti in vitellogenesi avanzata e sono state classificate come mature prossime alla deposizione, mentre altre due sono state classificate in fase post-riproduttiva perchè mostravano la presenza di oociti primari e secondari, follicoli post-ovulatori e un'elevata quantità di oociti atresici caratterizzati da un rivestimento vitellino frammentato e dalle cellule follicolari ipertrofiche (Figura 10.9). Infine, un esemplare ha mostrato un *pattern* ovarico particolare in quanto erano presenti, contemporaneamente e in proporzioni simili, oociti in tutti gli stadi di sviluppo, da quello primario alla fase di atresia (Figura 10.10).

**Figura 10.9**. Gonade femminile in fase Post-riproduttiva osservata in esemplari di *L. ramada* pescati nel Sito 3. Presenza di oociti primari e secondari, follicoli post-ovulatori e anche un'elevata quantità di oociti atresici caratterizzati da un rivestimento vitellino frammentato e dalle cellule follicolari ipertrofiche.

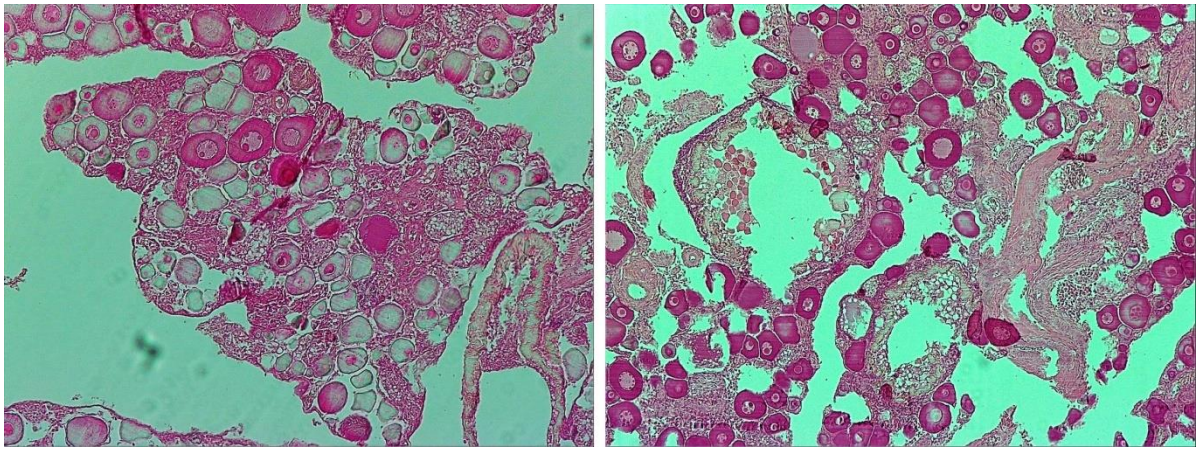
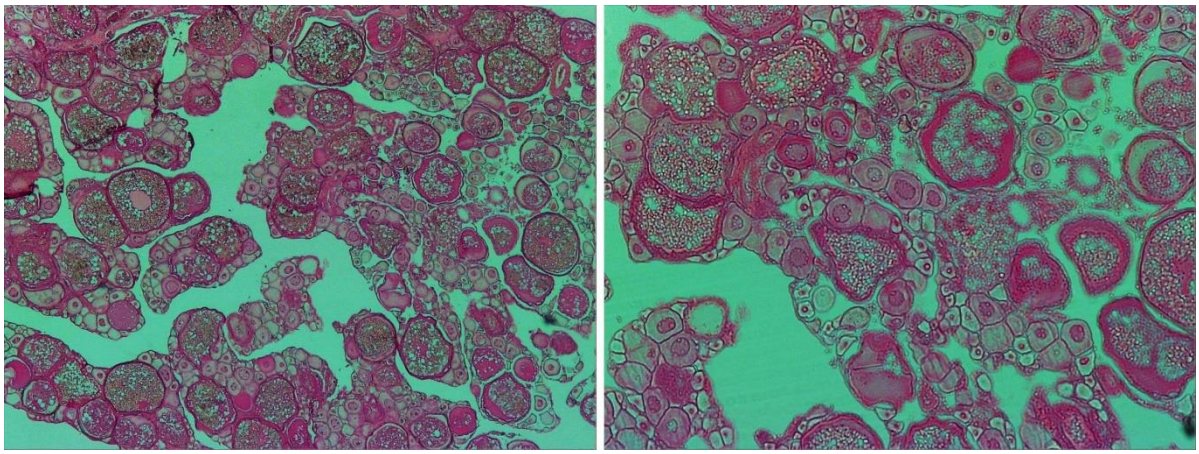


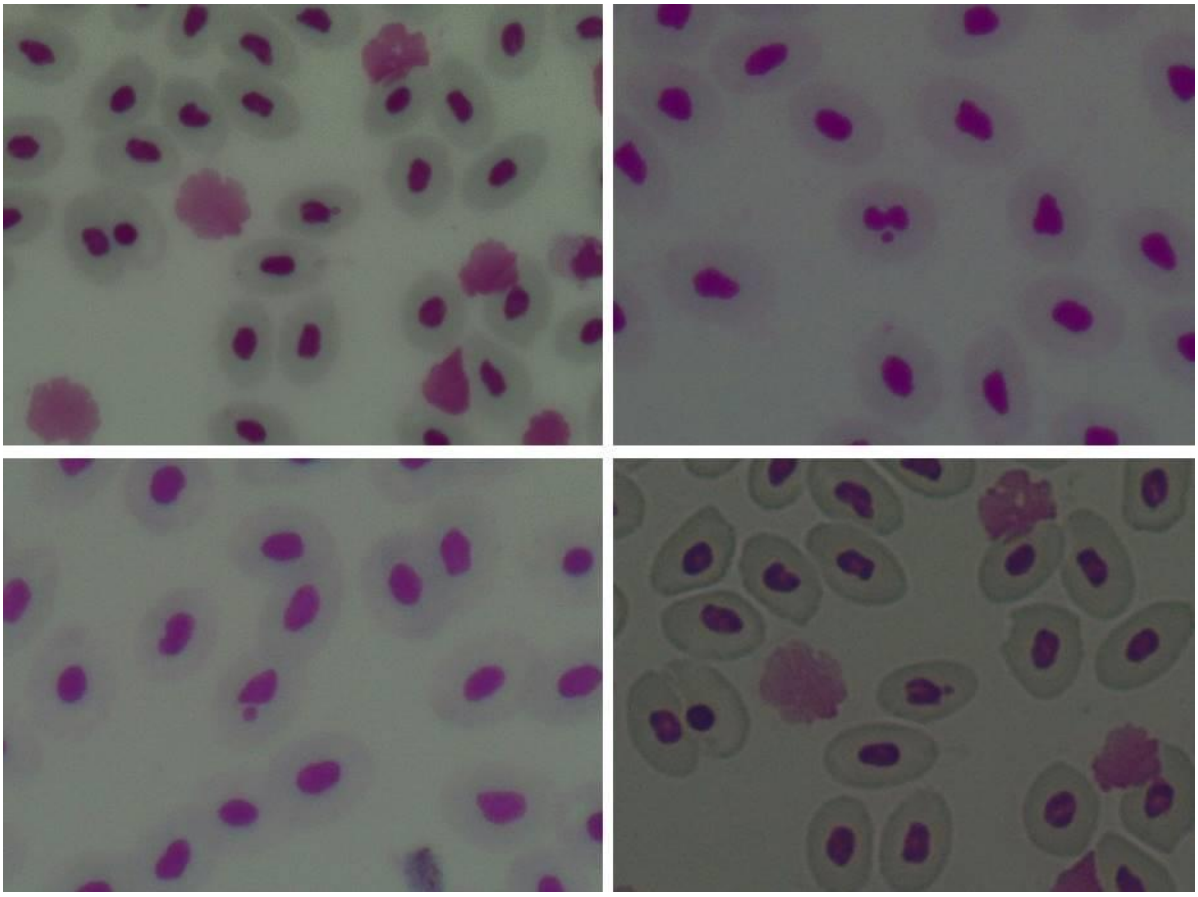
**Figura 10.10.** Gonade femminile con pattern anomalo: esemplare di *L. ramada* pescato nel Sito 3. Presenza di oociti primari e secondari, oociti in vitellogenesi ed elevata quantità di oociti atresici caratterizzati da un rivestimento vitellino frammentato e dalle cellule follicolari ipertrofiche.



## 10.5 Test del Micronucleo

Nella Figura 10.11 sono mostrati alcuni esempi di micronuclei osservati in eritrociti dei Cefali catturati.

**Figura 10.11.** Eritrociti di Cefalo Calamita con micronuclei presenti nel citoplasma.



Nella Tabella 10.5 sono riportati i valori medi e le relative deviazioni standard della frequenza di Micronuclei su 1.000 eritrociti (FMN‰) per gli esemplari di Cefali catturati nei tre siti di campionamento. Il test non-parametrico di Kruskal-Wallis non ha evidenziato differenze significative tra i gruppi analizzati ($p = 0.13$).

**Tabella 10.5** Numero medio e deviazione standard dei micronuclei per mille eritrociti rilevati negli esemplari catturati nei tre siti di campionamento.

| | Sito 1 | Sito 2 | Sito 3 |
|---|---|---|---|
| **FMN‰** | 1,5 ± 1,6 | 2,1 ± 1,6 | 0,8 ± 0,4 |

## 10.6 Analisi chimiche nei muscoli dei Cefali Calamita

### 10.6.1 Metalli Pesanti

Nel muscolo di tutti i Pesci catturati (n. 39) sono stati determinati mercurio, piombo, cadmio, cromo e arsenico.
Nella Tabella 10.6 sono riportati i valori medi e le deviazioni standard relativi alle analisi di arsenico, cromo e mercurio nel muscolo dei cefali catturati nei tre siti di campionamento. I valori di questi tre metalli sono risultati per tutti i pesci analizzati al di sopra del limite di rilevazione del metodo utilizzato e su questi valori sono stati condotti test non-parametrici di Kruskal-Wallis per valutare eventuali differenze tra i siti di campionamento che però in nessun caso sono state significative ($P < 0,05$).
Per il mercurio, il valore limite di 0,50 mg/kg, stabilito per i pesci dal Regolamento 1881/2006/CE del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, non è stato mai superato. Per l'arsenico e per il cromo non sono previsti valori-limite per la loro concentrazione negli alimenti.

**Tabella 10.6.** valore medio e deviazione standard per arsenico (As), cromo (Cr) e mercurio (Hg) rilevato nel muscolo dei pesci dei tre siti campionati.

| | Sito 1 | Sito 2 | Sito 3 |
|---|---|---|---|
| **As** | 0,30 ± 0,11 | 0,39 ± 0,17 | 0,33 ± 0,11 |
| **Cr** | 0,03 ± 0,01 | 0,04 ± 0,02 | 0,03 ± 0,01 |
| **Hg** | 0,05 ± 0,02 | 0,04 ± 0,02 | 0,03 ± 0,01 |

I valori del cadmio sono risultati per tutti i campioni al di sotto dei limiti di rilevabilità e quindi ampiamente al di sotto del valore limite nel muscolo di pesce pari a 0,050 mg/kg. Anche i valori del piombo sono risultati non rilevabili nel 76,5% dei campioni per il Sito 1, nel 56,3% per il Sito 2 e nell'83,3% per il Sito 3 e comunque sono risultati sempre ampiamente al di sotto del valore limite (0,30 mg/kg) previsto dal Regolamento (CE) N. 1881/2006

### 10.6.2 Diossine e PCB

Per quanto riguarda la determinazione delle diossine e dei PCB, gli esemplari sono stati raggruppati in pool in base al peso e al sito di campionamento come indicato in tabella 10.7.

**Tabella 10.7.** Criterio di raggruppamento dei pesci per la determinazione di PCB e diossine. NRG = numero di registro generale di riferimento.

| NRG | Nome Pool | Identificativo pesce | Numero pesci | Intervallo di peso (g) del pool |
|---|---|---|---|---|
| **1841** | Sito 1 - FOCE 1 | 4 – 10 - 17 | 3 | 580-670 |
| **1842** | Sito 1 - FOCE 2 | 1 – 9 – 12 - 14 | 4 | 710-760 |
| **1843** | Sito 1 - FOCE 3 | 2 – 3 – 5 – 8 – 15 | 5 | 820-890 |
| **1844** | Sito 1 - FOCE 4 | 6 – 7 – 13 - 16 | 4 | 970-1370 |

| NRG | Nome Pool | Identificativo pesce | Numero pesci | Intervallo di peso (g) del pool |
|---|---|---|---|---|
| **1845** | Sito 2 – INTERNO 01 | 1 – 5 – 6 – 7 – 11 – 12 – 13 – 14 – 15 -16 | 10 | 310-360 |
| **1846** | Sito 2 – INTERNO 01 | 2 – 4 – 8 – 9 – 10 | 5 | 380-450 |
| **1838** | Sito 3 – DIGA 01 | 1 – 3 – 6 | 3 | 500-590 |
| **1840** | Sito 3 – DIGA 02 | 2 – 4 - 5 | 3 | 720-770 |

I valori delle diossine WHO-TEQ-05, diossine + PCB diossina-simili WHO-TEQ-05, PCB diossina-simili e di PCB non diossina-simili ICES-6 sono stai calcolati come somma *upper bound* e sono riportati in tabella 10.8.

**Tabella 10.8.** Valori delle diossine WHO-TEQ-05 somma upper bound, diossine + PCB diossina-simili WHO-TEQ-05 somma upper bound e PCB diossina-simili somma upper bound espressi in pg-TE/g, e di PCB non diossina-simili ICES-6 somma upper bound espressi in ng/g, per i pesci campionati e raggruppati in pool.

| NGR | Pool | Diossine WHO-TEQ-05 | Diossine+PCB diossina-simili WHO-TEQ-05 | PCB Diossina-simili WHO-TEQ-05 | PCB non Diossina-simili ICES-6 |
|---|---|---|---|---|---|
| **1841** | 1 - FOCE 1 | 0,215 ± 0,036 | 1,291 ± 0,209 | 1,076 ± 0,173 | 18,69 ± 2,24 |
| **1842** | 1 - FOCE 2 | 0,087 ± 0,015 | 0,664 ± 0,107 | 0,577 ± 0,093 | 10,95 ± 1,33 |
| **1843** | 1 - FOCE 3 | 0,047 ± 0,008 | 0,608 ± 0,098 | 0,561 ± 0,090 | 10,02 ± 1,18 |
| **1844** | 1 - FOCE 4 | 0,347 ± 0,058 | 2,391 ± 0,387 | 2,044 ± 0,329 | 48,95 ± 5,84 |
| **1845** | 2 – INTERNO 01 | 0,024 ±0,004 | 0,166 ± 0,027 | 0,142 ± 0,023 | 2,98 ± 0,33 |
| **1846** | 2 – INTERNO 02 | 0,103 ± 0,017 | 0,278 ± 0,045 | 0,175 ± 0,028 | 3,56 ± 0,41 |
| **1838** | 3 – DIGA 01 | 0,148 ± 0,025 | 1,128 ± 0,182 | 0,980 ± 0,158 | 18,05 ± 2,31 |
| **1840** | 3 – DIGA 02 | 0,161 ±0,027 | 1,224 ± 0,198 | 1,063 ± 0,171 | 17,95 ± 2,24 |

Come per i metalli pesanti, anche per le diossine e i PCB non sono stati superati i valori limite, previsti dal Regolamento 1881/2006/CE del 19 dicembre 2006, modificato dal Regolamento 1259/2011/CE del 2 dicembre 2011 per PCB diossina-simili e PCB diossina non simili su prodotto intero negli alimenti come riportato in Tabella 10.9).

**Tabella 10.9.** Valori-limite per metalli pesanti, diossine e PCB nei pesci selvatici.

| Parametro | Valore-limite |
|---|---|
| Diossine WHO-TEQ-05 | 3,5 pg/g |
| Diossine+PCB diossina-simili WHO-TEQ-05 | 6,5 pg/g |
| PCB non diossina-simoli ICES-6 | 125 ng/g |

Per i PCB WHO-TEQ-05 non sono previsti valori limite negli alimenti.
I valori più alti di diossine e PCB sono stati trovati nei pesci di maggior peso catturati nel Sito 1 (range peso: 970 - 1370 g; Sito 1 - FOCE 4), mentre quelli più bassi nei cefali di taglia più piccola, campionati nel Sito 2 (range peso: 310 - 360 g; Codice: Sito 2 – INTERNO 01). Un confronto statistico, effettuato mediante il test di Kruskal-Wallis, non ha evidenziato differenze significative tra i valori delle diossine e PCB dei tre siti di campionamento ($P < 0,05$)

### 10.6.3 Pesticidi organoclorurati e organofosforati

La determinazione dei pesticidi organoclorurati e organofosforati è risultata non rilevabile per tutti i campioni.

# 11. DISCUSSIONE

Lo studio ha indagato lo stato di salute dei Cefali Calamita (*Liza ramada* (Risso, 1827) del tratto terminale del fiume Aterno-Pescara e si collega ad una precedente sperimentazione effettuata nel 2015 (Giansante, 2016) su un tratto dello stesso fiume, situato a monte, tra Molina (AQ) e Manoppello (PE). Come il precedente, lo studio è stato basato su un approccio olistico che vede i Pesci, comunemente usati come bioindicatori negli ecosistemi acquatici, capaci di rispondere agli stress ambientali ai diversi livelli dell'organizzazione biologica, dai livelli subcellulari a quelli di comunità (Adams *et al.*, 2000; Scardi *et al.*, 2006; Van der Oost *et al.*, 2002).
Per il tratto terminale del fiume Aterno-Pescara come bioindicatore è stato scelto il Cefalo Calamita, appartenente alla famiglia dei *Mugilidae*, che è stato già proposto come organismo sentinella di inquinamento ambientale in studi precedenti (Tancioni *et al.*, 2015). Su questa specie sono stati valutati, mediante *biomarkers*:

4. segnali di anomalie riproduttive,
5. presenza di danni genetici,
6. accumulo di sostanze chimiche persistenti nel tessuto muscolare.

## 11.1 Valutazione dello stato riproduttivo

Disturbi sessuali nei pesci, come la riduzione del peso e del volume delle gonadi, atresia gonadica, mancato sviluppo gonadico e aumento dell'incidenza di intersessualità (Blazer *et al.*, 2007; Scholz & Klüver, 2009; Puy-Azurmendi *et al.*, 2013; Bizarro *et al.*, 2014), sono stati identificati come *biomarkers* di esposizione a contaminanti chimici in molti ambienti acquatici in tutto il mondo (Mills & Chichester, 2005; Hecker *et al.*, 2006; Metcalfe *et al.*, 2010; Jobling *et al.*, 1998; Puzzi *et al.*, 2005; Snyder *et al.*, 2015). In particolare, questi disturbi sono stati associati all'esposizione a *Endocrine Chemichal Disrupters* (ECD) (Scholz & Klüver, 2009) e ad altri contaminanti rilasciati con scarichi civili e industriali (Jobling *et al.*, 1998; Van Aerle *et al.*, 2001, Tetreault *et al.*, 2011). La valutazione anatomica, istologica e biochimica dello stato delle gonadi nelle popolazioni di pesci selvatici è quindi sempre più utilizzata per valutare l'impatto dell'inquinamento sugli ecosistemi acquatici (Blazer *et al.*, 2007; Scholz & Klüver, 2009; Puy-Azurmendi *et al.*, 2013; Bizarro *et al.*, 2014), anche rispetto ai possibili riflessi sulla salute umana. Anche gli indici di condizione, epatosomatico e gonadosomatico possono fornire informazioni relative allo stato di salute del pesce, rispetto allo stato di maturità riproduttiva, alle loro riserve energetiche, a possibili malattie ed esposizione a stress esogeni (Mayer et al, 1992; Schmitt & Dethloff, 2000). Alterazioni sessuali sono state osservate in pesci di acqua dolce (Jobling *et al.*, 1998; Van Aerle *et al.*, 2001, Tetreault *et al.*, 2011), in particolare a valle degli scarichi dei depuratori (Jobling *et al.*, 1998; Van Aerle *et al.*, 2001) in quanto un ruolo importante sembra che sia svolto dagli alchilfenoli, derivati dalla degradazione dei tensioattivi (Soares *et al.*, 2008), ma anche in pesci marini eurialini, come i cefali, che vivono in ecosistemi inquinati, come recentemente osservato da Ortiz-Zarragoitia *et al.* (2014). Diversi studi condotti sulla famiglia dei Mugilidi (Puy-Azurmendi *et al.*, 2013;

Bizarro *et al.*, 2014; Tancioni *et al.*, 2015) hanno riportato l'insorgenza di intersessualità, sebbene le specie appartenenti a questa famiglia siano considerate gonocoriche, cioè a sessi nettamente separati. Fenomeni di ermafroditismo e anomalie gonadiche sembrano essere rari tra gli esemplari che vivono in ambienti non inquinati (McDonough *et al.*, 2005). All'interno della famiglia dei Mugilidi, il Cefalo Calamita *Liza ramada* (Risso, 1827), che è stato utilizzato in questo studio, è una delle specie più frequenti negli ecosistemi fluviali grazie alla sua alta adattabilità alle basse salinità e all'inquinamento delle acque (Cardona, 2006). Gli avannotti migrano in branchi numerosi dal mare agli estuari, alle lagune e nei tratti terminali dei fiumi, dove trovano condizioni trofiche più favorevoli, prima di tornare in mare per la fase di deposizione delle uova (Crosetti & Cataudella, 1995; Ortiz-Zarragoitia *et al.*, 2014). I giovanili (un anno di età) rimangono nelle acque interne durante le fasi di crescita e di maturazione sessuale. La completa maturità viene raggiunta a 2-3 anni nei maschi e a 3-4 anni nelle femmine, quando la lunghezza totale del pesce è compresa tra 25 e 32 cm (Crosetti & Cataudella, 1995; Maitland & Campbell, 1992; Pombo *et al.*, 2005). Il periodo riproduttivo, nel bacino del mar Mediterraneo, va da settembre a dicembre. In questo studio, il campionamento dei Cefali Calamita è stato effettuato volutamente nei mesi di ottobre – novembre, ossia durante il periodo riproduttivo, quando gli individui dei due sessi avrebbero dovuto avere le gonadi al massimo dello sviluppo ed eventuali anomalie sarebbero potute essere più evidenti come proposto da Tancioni *et al.* (2015).

Il primo campionamento è stato effettuato il 16 ottobre 2017 in una zona in prossimità della foce. In quel momento, in quella zona, un grande branco di cefali si era radunato, probabilmente per motivi trofici o per motivi riproduttivi, infatti l'analisi delle gonadi ha mostrato tutti pesci maturi con gonadi fluenti per i maschi e prossimi alla deposizione per le femmine. Anche il valore medio dell'indice gonadosomatico (8 ± 2,7) è risultato compatibile ad una gonade in piena maturazione e prossima alla deposizione (Mordenti *et al.*, 2007). In tutti questi pesci non sono state osservate anomalie gonadiche.

Il secondo campionamento, effettuato dopo 8 giorni dal primo campionamento (24/10/2017) nel tratto di fiume più interno, di fronte ad uno scarico civile, ha portato alla cattura di cefali di taglia significativamente inferiore (Lt = 35,4 ± 2,4 cm; Pt = 371,9 ± 70,6 g), ma comunque di taglia potenzialmente riproduttiva (Crosetti & Cataudella, 1995; Maitland & Campbell, 1992; Pombo *et al.*, 2005). Sia l'indice gonadosomatico, sia l'analisi istologica delle gonadi hanno evidenziato la mancata maturazione degli organi riproduttivi maschili e femminili che si trovavano, in entrambi i sessi, ad uno stadio totalmente immaturo, con la sola eccezione di una femmina e un maschio che erano in fase di maturazione. Per questi due esemplari, i valori dell'IGS sono comunque risultati molto bassi (2,11 e 0,11 rispettivamente per la femmina e per il maschio) e molto lontani da uno stadio di maturazione completa. Lo studio degli organi riproduttivi e del loro stato di maturazione, quindi, può essere considerato uno strumento prezioso per rilevare eventuali effetti dannosi sui pesci causati da inquinamento (Tetreault *et al.*, 2011; Harries et al, 2000; Prado *et al.*, 2011) e di conseguenza può essere considerato un utile *biomarker.*

Il campionamento nel terzo sito, del 06/11/2017, è stato realizzato a distanza di 21 e 13 giorni dal primo e dal secondo campionamento rispettivamente, nella zona interna della diga foranea, dove sono stati catturati solamente n. 6 esemplari, un maschio e cinque femmine.

Le taglie di questi cefali sono risultate parzialmente sovrapponibili a quelle dei cefali del primo e del secondo sito. In questo campionamento è stata osservata una variabilità più marcata per quanto riguarda lo stato riproduttivo rispetto a quella registrata negli altri due siti, poichè erano presenti sia pesci maturi (due femmine e un maschio), sia pesci in fase post-riproduttiva (due femmine con molti oociti atresici e follicoli post-ovulatori) e infine una femmina con un *pattern* ovarico che è stato definito anomalo. Infatti questo esemplare presentava contemporaneamente oociti a più stadi di sviluppo e numerosi oociti in fase di riassorbimento e di atresia, sebbene in *L. ramada* le ovaie maturino in modo sincrono. Una possibile spiegazione potrebbe essere che questo pesce, di taglia riproduttiva, avesse avuto un'induzione ormonale insufficiente e/o un brusco arresto del reclutamento e della maturazione di tutti gli oociti, causati da fattori esterni o da anomalie fisiologiche.
In questo studio, non sono state osservate gonadi intersessuali o di forma irregolare come avvenuto in Cefali Calamita catturati a valle del depuratore di Roma sud (Tancioni *et al.*, 2015) o in altre specie di cefali come *Mugil cephalus* dall'estuario del Douro, nel nord del Portogallo (Ferreira et al, 2004), e *Chelon labrosus* nel Golfo di Biscaglia, nel nord della Spagna (Puy-Azurmendi *et al.*, 2013; Bizarro *et al.*, 2014), ma sono stati osservati fenomeni di mancata maturazione gonadica in pesci di taglia riproduttiva che potrebbero essere dovuti ad un ritardo nella maturazione delle gonadi legato alla specificità geografica o anche ad una inibizione ormonale nell'asse ipofisi-ipotalamo dovuta alla scarico civile presente nel sito 2.

## 11.2 Test del Micronucleo

L'esposizione ai composti genotossici non è di per sé letale per gli organismi acquatici, tuttavia può innescare meccanismi di selezione che con il tempo portano alla riduzione della vitalità, della salute e del successo riproduttivo degli individui (Da Silva Souza & Fontanetti, 2006; Gravato & Santos, 2002). In ambienti cronicamente contaminati questo fenomeno può provocare a lungo andare la perdita della diversità genetica (Serrano-García & Montero-Montoya, 2001). La ricerca dei micronuclei (MN), attraverso il Test del Micronucleo, è un utile strumento negli studi che utilizzano gli organismi acquatici come bioindicatori e consente di capire se, in un determinato sito, siano presenti sostanze genotossiche (Ossana *et al.*, 2010; Wirz *et al.*, 2005).
Questo metodo è stato applicato al fine di conoscere lo stato di salute dell'ecosistema del fiume Pescara nel tratto terminale del suo corso.
In tutti e tre i siti di campionamento, le analisi condotte hanno mostrato la presenza di micronuclei negli eritrociti della maggior parte dei cefali campionati. Il sito nel quale sono stati catturati pesci con la frequenza media di micronuclei più alta (2,1 ‰) è stato il Sito 2, situato nel tratto più interno del fiume di fronte allo scarico civile, seguito dal Sito 1 (1,5 ‰), tratto prossimo alla foce, ed infine dal Sito 3, zona di mare antistante la diga foranea (0,8 ‰). Sebbene tra i siti di campionamento siano state osservate differenze rispetto alle frequenze medie di MN, queste non sono risultate tra loro significative ($p > 0,05$). Le frequenze medie di MN osservate sembrerebbero relativamente alte, tenendo presente che i valori di MN negli eritrociti di pesce > 0,3 ‰ di solito riflettono situazioni di inquinamento da parte di sostanze genotossiche (Minissi *et al.*, 1996; Porto *et al.*, 2005; Rybakovas *et al.*, 2009).

Frequenze medie di micronuclei < 0,2 ‰, invece, sono considerate fisiologiche in studi su trote (Kim & Hyun, 2006), su carassi (Arkhipchuk & Garanko, 2005) e su spigole (Gravato & Santos, 2003). In pesci di acqua dolce, frequenze di micronuclei fino a 3,1 ‰ nei barbi e gobioni e fino a 1,5 ‰ e 1,9 ‰ nelle rovelle e nei cavedani rispettivamente, sono state osservate in siti ritenuti molto inquinati (Tancioni *et al.*, 2014, Piccoli *et al.*, 2010).
Studi condotti su cefali, esposti a diversi livelli di contaminazione, hanno rivelato valori paragonabili a quelli trovati nel presente lavoro (Ergene *et al.*, 2007; Tsangaris *et al.*, 2011; Carolla *et al.*, 2014). Ad esempio, in uno studio realizzato nel Delta del fiume Goksu (Turchia), i cefali campionati nelle aree di riferimento (a monte delle zone inquinate) avevano una frequenza media di MN pari a 1,26 ‰. Questo valore è salito fino a 3,86 ‰ nelle aree considerate inquinate (Ergene *et al.*, 2007). Una tendenza simile, ma con frequenze leggermente più basse, è stata osservata in cefali campionati nel golfo di Saronikos, Grecia (Tsangaris *et al.*, 2011) e in estuari portoghesi (Carolla *et al.*, 2014) dove i valori delle frequenze medie di MN nei siti ritenuti di controllo sono oscillate tra 0,2 e 0,82 ‰ e nelle aree più inquinate hanno raggiunto valori tra 0,75 e 2,0 ‰. Su altre specie marine, come il pagello e il sarago fasciato, Arslan *et al.* (2015) hanno osservato frequenze di MN molto più alte: fino a 18 ‰ nella zona ritenuta di controllo e fino a 53,3 ‰ nella zona ritenuta inquinata (Baia di Aliagă, Turchia).
Le frequenze medie di MN, rinvenute in questo studio, sebbene appaiano leggermente più alte rispetto a quelle normalmente osservate per questa specie in siti ritenuti di controllo, potrebbero risentire del particolare momento nel quale è stato condotto il campionamento. Carollla *et al.*, 2014 hanno osservato una frequenza più alta di MN in cefali campionati in autunno/inverno rispetto alla primavera/estate, così come osservato da Çavas & Ergene-Gözükara (2005). Questi autori hanno ipotizzato che questa differenza stagionale nella frequenza dei MN potesse essere correlata ad un differente rilascio, sempre stagionale, di inquinanti. Un'ulteriore ipotesi potrebbe essere la concomitanza del campionamento con il periodo riproduttivo che può generare forte stress cellulare, ma tale ipotesi deve essere supportata da ulteriori e specifici campionamenti.

## 11.3 Inquinamento chimico da metalli pesanti, diossine e PCB

I metalli pesanti si trovano naturalmente negli ambienti acquatici in bassissime quantità, alcuni di essi sono considerati essenziali per la vita degli organismi viventi (Fe, Al, Zn, Cu, Cr), altri sono tossici anche a concentrazioni in tracce (Cd, Hg, Pb e Ni) (Perugini *et al.*, 2014). Tutti i metalli, compresi quelli essenziali, però, se presenti in concentrazioni troppo elevate, possono diventare pericolosi per gli organismi viventi. Processi di origine antropica possono rilasciare grandi quantitativi di metalli che vanno ad accumularsi nel suolo, nei sedimenti e nelle acque, determinando forme di inquinamento ambientale più o meno gravi (Nriagu, 1989). La loro presenza in elevate concentrazioni è quindi di per sè un buon indicatore di inquinamento di origine antropica (Goodyear & McNeill, 1999). Conoscere la concentrazione di metalli negli ambienti acquatici, spesso però, non è sufficiente per valutare il reale livello di inquinamento ambientale e il generale stato di salute degli organismi presenti, dal momento che un certo numero di altre variabili (come la biodisponibilità, le interazioni, le

miscele) possono svolgere un ruolo chiave sugli effetti biologici (López-Doval *et al.*, 2012). Per tale ragione, i metalli sono ricercati anche negli organismi viventi, oltre che nel sedimento e nell'acqua. Per gli organismi considerati alimenti, sono stati stabiliti dei livelli di concentrazione massima ammissibili nelle carni e sono stati inclusi nei regolamenti dell'Unione Europea per contaminanti nei prodotti alimentari (CE 2006, 2008, 2011).
Le diossine e i PCB sono inquinanti di origine industriale. Queste molecole sono molto stabili e persistenti nell'ambiente, inoltre si diffondono facilmente in quanto aderiscono al particolato organico e sono trasportate a grandi distanze dal vento e dall'acqua. Un'altra caratteristica è quella di essere fortemente liposolubili e quindi, nel tempo, si accumulano nei tessuti grassi degli organismi (bioaccumulo) e risultano maggiormente concentrate salendo nella catena trofica (biomagnificazione). Anche per le diossine e PCB, come per i metalli, sono stati stabiliti dei livelli di concentrazione massima ammissibile nelle carni per definire il rischio sanitario. La valutazione di questi rischi è compito di organizzazioni preposte alla sicurezza alimentare, come l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), che forniscono indicazioni sui problemi della sicurezza dei cibi, derivanti da pareri espressi in specifiche commissioni.
Le norme europee (CE 2006; 2008), per i prodotti della pesca, stabiliscono la concentrazione massima di 0,5 mg/kg per il mercurio, 0,3 mg/kg per il piombo, 0,05 mg/kg per il cadmio, 3,5 pg/g per diossine WHO-TEQ-05, 6,5 pg/g per diossine+PCB diossina-simili WHO-TEQ-05 e 125 ng/g per PCB non diossina-simili ICES.
In questo studio la presenza di metalli pesanti, diossine e PCB è stata ricercata nel muscolo dei cefali catturati in tre siti del tratto terminale del fiume Aterno-Pescara. Tutti i pesci analizzati sono risultati con concentrazioni di mercurio, piombo e cadmio molto al di sotto dei limiti di legge. Anche per le diossine e i PCB i valori determinati sono risultati tutti ampiamente al di sotto dei limiti massimi consentiti e, infine, non è stata registrata alcuna contaminazione di pesticidi organoclorurati e organofosforati.
I valori del mercurio sono risultati inferiori a quelli rilevati in uno studio precedente (Caracciolo *et al.*, 1972), nel quale sono state osservate concentrazioni medie di mercurio ampiamente oltre i limiti di legge (2,3 mg/kg) per campioni di pesce prelevati proprio alla foce del fiume Pescara, con un valore massimo di 15,650 mg/kg. Nello stesso studio anche due specie bentoniche di pesci catturate in mare avevano mostrato valori medi di mercurio al di sopra dei limiti di legge (0,707 mg/kg e 4,405 mg/kg). Più recentemente, Perugini *et al.* (2014) hanno riscontrato valori medi di mercurio oltre i limiti di legge sul prodotto ittico catturato con reti a strascico nell'Adriatico centrale, in particolare negli astici (0,97 mg/kg) e nel nasello (0,59 mg/kg).
Un fattore importante che determina l'accumulo di metalli pesanti o di diossine e PCB nell'organismo è la capacità di depurazione dalle sostanze assorbite, che negli organismi giovani è stato dimostrato essere più alto rispetto agli individui più vecchi (Elder & Collins, 1991; Douben, 1989; Canli & Furness, 1993; Nussey *et al.*, 2000; Widianarko *et al.*, 2000). Viste le differenze significative tra le taglie dei cefali catturati nei tre siti, è stato valutato il grado di accumulo delle diverse sostanze chimiche tra i pesci dei siti campionati, ma non sono state trovate differenze significative.
L'assunzione delle sostanze chimiche da parte degli organismi acquatici (bioaccumulo) dipende fortemente dalla loro concentrazione nell'ambiente acquatico (bioconcentrazione),

dal trasferimento nelle reti trofiche (biodisponibilità) e, per alcune sostanze lipofile, dalla percentuale di contenuto in grasso dell'organismo. Un altro fattore che può influenzare il contenuto di metalli, diossine e PCB è determinato dalla specie analizzata (Kljaković Gašpić *et al.*, 2002), in quanto soprattutto l'ecologia trofica di ciascuna di esse determina il diverso assorbimento delle sostanze chimiche che sono disponibili nell'ambiente, in modo differente. In questo studio è stata analizzate la specie *L. ramada*, appartenente alla Famiglia dei Mugilidi, che, pur non trovandosi al vertice della catena alimentare, ha comunque un ecologia trofica classificabile come detritivora-filtratrice ed è in grado, quindi, di alimentarsi sia sulla colonna d'acqua sia sul fondo marino dove teoricamente dovrebbe venire in contatto con le sostanze chimiche.

# 12. CONCLUSIONI

Questo studio ha indagato, in termini di valutazione del rischio sulla salute umana e sull'ambiente, il tratto terminale del corso del fiume Aterno-Pescara. Rispetto allo studio condotto nel 2015 nel medio corso dello stesso bacino idrografico (Giansante, 2016), questo ha indicato minori criticità, anche se la specie ittica utilizzata è differente.
*L. ramada* è, comunque, considerata un valido indicatore per ambienti di transizione come lagune, estuari e foci di fiumi.
I risultati analitici non hanno evidenziato, negli esemplari analizzati, né superamento dei limiti di legge per le sostanze chimiche nel muscolo né fenomeni di intersessualità nelle gonadi. La presenza di micronuclei negli eritrociti dei pesci e il mancato sviluppo delle gonadi per gli esemplari catturati nel Sito 2 che, per taglia, sarebbero dovuti essere pesci maturi, però, non escludono la presenza di altri possibili inquinanti, che non sono stati presi in considerazione.
In conclusione, i risultati che emergono da questo studio, sebbene preliminari e quindi incrementabili, sembrano indicare che nel tratto terminale del fiume Aterno-Pescara:

- è possibile utilizzare i cefali come organismi sentinella poiché tra i tre gruppi di esemplari studiati sono state osservate differenze come ad esempio le alterazioni gonadiche nella fase di pre-spawning;
- i metalli pesanti, le diossine ed i PCB hanno mostrato basse concentrazioni nei muscoli dei pesci analizzati, inferiori ai limiti di legge previsti;
- le frequenze dei micronuclei (danni genetici) negli eritrociti dei cefali analizzati nei tre punti di campionamento sono risultate elevate rispetto ad una condizione fisiologica riscontrabile in siti definiti di controllo e ulteriori indagini sono necessarie per valutarne le cause;
- le informazioni ottenute da questo studio possono essere utilizzate per futuri confronti e ulteriori approfondimenti volti a valutare il rischio di esposizione a sostanze genotossiche e ad altri inquinanti, in generale, nel tratto terminale del fiume Aterno-Pescara.

## 13. BIBLIOGRAFIA

1. Adams, S.M., Greeley, M.S.Jr.; Ryon, M.G., 2000. Evaluating effects of contaminants on fish health at multiple levels of biological organization. Extrapolating from lower to higher levels. Hum. Ecol. Risk Assess. 6, 15–27
2. Al-Sabti, K., Metcalfeb, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Volume 343, Issues 2–3, pp. 121–135
3. APAT, 2005, Valutazione della genotossicità di inquinanti in ambienti acquatici: messa a punto di metodi per l'esecuzione del test del micronucleo in eritrociti di specie ittiche. Manuali e linee guida 32/2005
4. Arkhipchuk, V.V., Garanko, N.N., 2005. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fishfin cells. Ecotoxicology and Environmental Safety. 62, pp. 42–52
5. Arslan, Ö.Ç., Boyacioglu, M., Parlak, H., Katalay, S., Ali Karaaslan, M., 2015. Assessment of micronuclei induction in peripheral blood and gill cells of some fish species from Aliagă Bay Turkey. Marine Pollution Bulletin. 94, 48–54
6. Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2001. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Ecotox. Environ. Saf. 49 (3), 221–225
7. Ayllón, F., Suciu, R., Gephard, S., Juanes, F., Garcia-Vazquez, E., 2000. Conventional armament wastes induce micronuclei in wild brown trout *Salmo trutta*. Mutation Research. 470, 169–176
8. Bahari, I.B., Noor, F.M., Daud, N.M., 1994. Micronucleated erythrocytes as an assay to assess actions by physical and chemical genotoxic agents in *Clarias gariepinus*. Mutation Research, 313: 1-5
9. Bizarro, C.; Ros, O.; Vallejo, A.; Prieto, A.; Etxebarria, N.; Cajaraville, M.P.; Ortiz-Zarragoitia, M., 2014**.** Intersex condition and molecular markers of endocrine disruption in relation with burdens of emerging pollutants in thicklip grey mullets (*Chelon labrosus*) from Basque estuaries (South-East Bay of Biscay). Mar. Environ. Res. 96, 19–28
10. Blazer, V.S.; Iwanowicz, L.R.; Iwanowicz, D.D.; Smith, D.R.; Young, J.A.; Hedrick, J.D.; Foster, S.W.; Reeser, S.J., 2007. Intersex (testicular oocytes) in smallmouth bass, *Micropterus dolomieu*, from the Potomac River and selected nearby drainages. J. Aquat. Anim. Health. *19*, 242–253.
11. Bolognesi, C., Hayashi, M., 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. Mutagenesis. 26:205–213
12. Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D. M., Sciutto, A., 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. Aquatic Toxicology. 78S, S93–S98
13. Bolognesi, C., Venier, P., 2003. Monitoraggio della genotossicità in matrici ambientali: acqua. In "Mutagenesi ambientale" di Autori vari pp. 263-280, Zanichelli. 63
14. Bonora, K., Rocco, R., 2003. Acqua e paesaggio. Environmental, Ambiente e Territorio in Valle d'Aosta, n. 23

15. Bosveld, A. T. C., Berg, M. V. D., 2002. Reproductive failure and endocrine disruption by organohalogens in fish-eating birds. Toxicology. 181, 155-159
16. Brunner, W., Sutherland, F.H., Focht, D.D., 1985. Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls in soil by analog enrichment and bacterial inoculation. J. Environ. Qual. 14, 324-328
17. Cairns, J.Jr., van der Schalie, W.H., 1980. Biological monitoring, Part I: Early warning systems. Water Research. 14, 1179-1196
18. Cajaraville, M.P., Hauser, L., Carvalho, G., Hylland, K., Olabarrieta, I., Lawrence, A.J., Lowe, D.; Gokoyr, A., 2003. *Chapter 2: Links between genetic damage by xenobiotics at the individual level and the molecular /cellular response to pollution*. In: Effects of Pollution on Fish: molecular effects and population responses. AJ LAWRENCE & KL HEMINGWAY (eds.), Blackwell Science Ltd, Oxford, pp 14-82
19. Campana, M.A., Panzeri, A.M., Moreno, V.J., Dulout, F.N., 1999. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. Mutation Research. 438, 155-16
20. Canli, M., Furness, R.W., 1993. Toxicity of heavy metals dissolved in sea water and influences of sex and size on metal accumulation and tissue distribution in the Norway lobster Nephrops norvegicus. Mar. Environ. Res. 36, 217–236
21. Caracciolo, S., Perna, A., Di Silvestro, C., 1972. Ricerche sul contenuto in mercurio totale di pesci e altri prodotti della pesca catturati alla foce del fiume Pescara e nel mare antistante Pescara. Quaderni di Merceologia. 11, 1-11
22. Cardona, L., 2006. Habitat selection by grey mullets (Osteichthyes: *Mugilidae*) in Mediterranean estuaries: The role of salinity. Sci. Mar. 70, 443–455.
23. Carrola, J., Santos, N., Rocha, M.J., Fontainhas-Fernandes, A., Pardal M.A., Monteiro, R.A.F., Rocha, E., 2014. Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries—Portugal. Environmental Science and Pollution Research. 21, Issue 9, pp 6057–6068
24. Cavaş, T., Gözükara, S. E., 2005. Micronucleus test in fish cells: A bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. Environmental and Molecular Mutagenesis. Volume 46, Issue 1, pages 64–70
25. Crosetti, D.; Cataudella, S., 1995. Grey mullet culture. In *World Animal Science 34B: Production of Aquatic Animals*; Nash, C.E., Ed.; Elsevier B.V.: Burlington, MA, USA; pp. 271–288
26. Da Silva Souza, T., Fontanetti, C. S., 2006, Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. Mutat. Res., 605: 87-93. 10.1016/j.mrgentox.2006.02.010
27. Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152: Norme in materia ambientale, G. U. 14 aprile 2006.
28. Decreto Legislativo del 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. G. U. 3 marzo 2001, n. 52, S.O.

29. Decreto Ministero Ambiente e Tutela del Territorio e del Mare (MATTM), 29 maggio 2008. Istituzione e perimentrazione del SIN-Bussi sul Tirino, Abruzzo. G. U. 24 luglio 2008
30. Decreto Ministero dell'Ambiente e Tutela del Territorio e del Mare. (MATTM), 8 novembre 2010, n. 260, Regolamento recante i criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali. Supplemento ordinario alla G.U. n. 30 del 7 febbraio 2011
31. Decreto Ministero dell'Ambiente e Tutela del Territorio e del Mare. (MATTM), 25 Ottobre 1999, n. 471, Regolamento recante criteri, procedure e modalita' per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'articolo 17 del decreto legislativo 5 febbraio 1997, n. 22, e successive modificazioni e integrazioni. G.U. 293 del 15-12-1999 S.O. 218
32. Della Croce, N., Cattaneo Vietti, R., Danovaro, R., 1997. Ecologia e protezione dell'ambiente marino costiero, UTET, 416 pp
33. Di Molfetta, A., Fracassi, F., 2008. Consulenza tecnica sulla contaminazione in atto nell'area del polo industriale di Bussi, Procura della Repubblica presso il Tribunale di Pescara, procedimento n. 12/2006 R.G.N.R.
34. 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, G.U L 327 del 22/12/2000 pag. 0001 - 0073
35. Direttiva del 30-4-1992 n. 32. Direttiva del Consiglio recante settima modifica della direttiva 67/548/CEE concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose. Pubblicata nella G.U.C.E. 5 giugno 1992, n. L 154
36. Douben, P.E., 1989. Lead and cadmium in stone loach (*Noemacheilus barbatulus* L.) from three rivers in Derbyshire. Ecotox. Environ. Safe. 18, 35–58
37. EFI+ CONSORTIUM, 2009. Manual for the application of the new European Fish Index – EFI+. A fish-based method to assess the ecological status of European running waters in support of the Water Framework Directive
38. Ehrich, M., 1998 - Organophasphates. In Encyclopedia of Toxicology. Ed. P. Wexler, pp. 467-461. San Diego, CA: Academic Press
39. Elder, J.F., Collins, J.J., 1991. Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface systems. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 122, 37–79
40. EPA, 2003. Evaluation Guidelines For Ecological Indicators. EPA/620/R-99/005
41. Ergene, S., Çavaş, T., Çelik, A., Köleli, N., Kaya, F., Karahan, A., 2007. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Göksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. Ecotoxicology 16:385–391
42. Evans, H.J., Nearya, G. J., Williamsona, F.S., 1959. The Relative Biological Efficiency of Single Doses of Fast Neutrons and Gamma-rays on *Vicia faba* Roots and the Effect of Oxygen. International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine Volume 1, Issue 3

43. Fernandez-Delgado, C., Hernando, J.A., Herrera, M. & Bellido, M., 1988. Life-history Patterns of the sandsmelt *Atherina boyeri*, Risso, 1810 in the Estuary of the Guadalquivir river, Spain. Est., Coast. Shelf Sci., 27: 697-706
44. Ferreira, M.; Antunes, P.; Gil, O.; Vale, C.; Reis-Henriques, M.A., 2004. Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as bioindicator species for environmental monitoring. Aquat. Toxicol. 69, 347–357
45. Forneris, G., Merati, F., Pascale, M., Perosino, G.C., 2007. Indice Ittico. I.I. Biologia Ambientale, 21 (I): 43 – 60
46. Froese, R., 2006. Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. Journal of Applied Ichthyology 22:241–253 DOI 10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x.
47. Fukuto, T.R., 1987 - Organophosphorus and carbamate esters: the anticholinesterase insecticides. In: J.W. Biggar & J. N. Seiber (Eds.), Fate of pesticides in the environment. Proceedings of a technical seminar (pp. 5-18). Oakland, CA: Agricultural Experiment Station, Division of Agriculture and Natural Resources, University of California
48. Giansante, C., 2016. Studio di un ecosistema fluviale ad elevato rischio ambientale mediante un approccio olistico basato sull'utilizzo di bioindicatori di diversi livelli dello spettro biologico, Regione Abruzzo, L.R. 59/1982, Relazione finale
49. Goodyear, K.L., McNeill, S., 1999. Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macro-invertebrates of different feeding guilds: a review. The Science of the Total Environment. 229, 1-19
50. Gravato, C., Santos, M.A., 2002. Juveniles Sea Bass liver biotransformation and erythrocytic genotoxic responses to pulp mill contaminants. Ecotoxicol. Environ Saf., 53: 104-112.
51. Gravato, C., Santos, M.A., 2003. Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. Ecotoxicol. Environ. Safety, 55: 352-358
52. Gray, J.S., 2002. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. Marine Pollution Bulettin. 45, 46-52 pp
53. Grisolia, C. K., Cordeiro, C.M.T., 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. Genet. Mol. Biol. 23:235-239
54. Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D., 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica. 4, 1–9
55. Harries, J.E.; Janbakshs, A.; Jobling, S.; Matthiessen, P.; Sumpter, J.P.; Tyler, C.R. 1999. Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom. Environ. Toxicol. Chem. 18, 932–937
56. Harries, J.E.; Runnalls, T.; Hill, E.; Harris, C.A.; Maddix, S.; Sumpter, J.P.; Tyler, C.R. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). Environ. Sci. Technol. 34, 3003–3011
57. Hecker, M.; Murphy, M.B.; Coady, K.K.; Villeneuve, D.L.; Jones, P.D.; Carr, J.A.; Solomon, K.R.; Smith, E.E.; van der Kraak, G.; Gross, T.; *et al.,* 2006. Terminology of gonadal anomalies in fish and amphibians resulting from chemical exposures. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 187, 103–131

58. Hestermann, E.V., Stegeman, J.J., Hahn M.E., 2000. Serum alters the uptake and relative potencies of halogenated aromatic hydrocarbons in cell culture bioassays. Toxicol. Sci. 53, 316-325
59. ISPRA, 2012, Bioindicatori ed Ecotossicologia, sintesi e atti dei workshop 2008-2009.
60. IUCN/UNEP/WWF, 1980. Living Resource Conservation for Sustainable Development. World Conservation Strategy
61. IZS TE B3.1.4 SOP087. Metodi di riferimento per indagini chimiche su PCB NDL. IZS TE
62. IZS TE B3.1.4 SOP119. Metodi di riferimento per indagini chimiche su PCB DL. IZS TE
63. Jobling, S.; Nolan, M.; Tyler, C.R.; Brighty, G.; Sumpter, J.P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. Environ. Sci. Technol. 32, 2498–2506
64. Kamlesh, K.Y., Sunil, P.T., 2009. Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish*, Channa punctate*. Chemosphere. 77, 1495–1500
65. Kidd, K.A., Bootsma, H.A., Hesslein, R.H., Muir, D.C.G., Hecky, R.E. 2001. Biomagnification of DDT through the benthic and pelagic food webs of Lake Malawi, East Africa: importance of trophic level and carbon source. Environ Sci Technol. 35, 14–20
66. Kim, I.Y., Hyun, C.K., 2006. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organism. Ecotoxicol. Environ. Safety. 64, 288-297
67. Kiriluk, R.M., Servos, M.R., Whittle, M.D., Cabana, G., Rasmussen, J.B., 1995. Using ratios of stable nitrogen and carbon isotopes to characterize the bio-magnification of DDE, mirex, and PCB in a Lake Ontario pelagic food web. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 52, 2660 - 2674
68. Kljaković Gašpić, Z., Znovarić, T.,Vrgoč, N., Odžak, N., & Barić, A., 2002. Cadmium and lead in selected tissues of two commercially important fish species from the Adriatic Sea. Water Research. 36, 5023–5028
69. Konen, S., Cavas, T., 2008. Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test. Environmental and Molecular Mutagenesis. 49(6), 434-8
70. Kruskal, W.H., Wallis, W.A.,1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. Journal of the American Statistical Association. 47 (260), 583–621
71. Kucklick, J.R., Baker, J.E., 1998. Organochlorines in Lake Superior's food web. Environ Sci Technol. 32(9), 1192-1198
72. Le Cren, E.D., 1951. The lenght-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and conditions in the perch *Perca fluviatilis*. Journal of Animal Ecology, London,. 20 (2), 201-219
73. Legge Regionale 22 dicembre 2010, n. 59, Disposizioni per l'adempimento degli obblighi della Regione Abruzzo derivanti dall'appartenenza dell'Italia all'Unione Europea. Attuazione delle direttive 2006/123/CE, 92/43/CEE e 2006/7/CE, BURA 2/2011
74. Lemos, C.T., Iranço, F.A., Oliveira, N.C.D., Souza G.D., Fachel. J.M.G., 2008. Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: *Characidae*) at sites under petrochemical influence. Science of the Total Environment. 406, 337-343

*75.* Lemos, C.T., Rodel, P.M., Terra, N.R., Oliveira, N.C, Erdtmann, B., 2007. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes Ecotoxicology and Environmental Safety. 66, 391–401

76. Lemos, C.T., Röedel, P.M., Terra, N.R., Erdtmann, B., 2001. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. Environ Toxicol Chem. 20(6),1320–4

77. López-Doval, J.C., De Castro-Català, N., Andrés-Doménech, I., Blasco, J., Ginebreda, A., Muñoz, I., 2012. Analysis of monitoring programmes and their suitability for ecotoxicological risk assessment in four Spanish basins. Science of the Total Environment. 440, 194–203

78. Maitland, P.S.; Campbell, R.N., 1992. Freshwater Fishes of the British Isles. Harper Collins Publishers: London, UK. p. 368.

79. Mann, H.B., Whitney, D.R., 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. Annals of Mathematical Statistics. 18, 50-60

80. Mayer, F.L.; Versteeg, D.J.; McKee, M.J.; Folmar, L.C.; Graney, R.L.; McCume, D.C.; Rattner, B.A., 1992. Physiological and nonspecific biomarkers. In *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*; Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L., Eds.; Lewis Publishers: Boca Raton, FL, USA, pp. 5–86

81. McDonough, C.J.; Roumillat, W.A.; Wenner, C.A., **2005**. Sexual differentiation and gonad development in striped mullet (*Mugil cephalus* L.) from South Carolina estuaries. Fish Bull. 103, 601–619

82. Metcalfe, C.D.; Kidd, K.A.; Sumpter, J.P., 2010. Chemically induced alterations to gonadal differentiation in fish. In *Fish Diseases and Disorders*. *Non-Infectious Disorders*, 2nd ed.; Leatherland, J.F., Woo, P.T.K., Eds.; CABI Publishing: Preston, UK. 2, pp. 144–165

83. Millennium Ecosystem Assessment, 2005. Ecosystems and Human Well-being: Synthesis. Island Press, Washington, DC

84. Mills, L.J.; Chichester, C., **2005**. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? Sci. Total. Environ. 343, 1–34

85. Minissi, S., Ciccotti, E., Rizzoni, M., 1996. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. Mutat Res Genet Toxicol. 367, 245–251

86. Ministero Ambiente, 2010. Priorità e obiettivi per la valutazione e gestione del rischio per la salute umana e la qualità ambientale da esposizione a Interferenti Endocrini. Proposta di Piattaforma AMBIENTE E SALUTE, Roma

87. Moore, D.R.J., Sample, B.E., Suter, G.W., Parkhurst, B.R., Scott Teed, R., 1999. A probabilistic risk assessment of the effect of methylmercury and PCB on mink and kingfishers along east fork poplar creek, Oak ridge, Tennessee USA. Environ. Toxicol. and Chem. 18, 2941-2953

88. Mordenti, O., Scaravelli, D., Trentini, M., Zaccaroni, A., Gamberoni M., 2007. Reproduction of *Aphanius fasciatus* induced by ecophysiologycal conditioning and hormonal treatment. Biol. Mar. Mediterr. 14 (2), 276-277
89. Munkittrick, K.R., McCarty, L.S., 1995. An integrated approach to ecosystem health management: top-down, bottom-up or middle-out? J. Aquatic Ecosystem Health. 4, 77-90 pp
90. Munro, A.D., Scott, A.P., Lam, T.J., 1990. Reproductive Seasonality in Teleosts: Environmental Influences. 254 pp
*91.* Nagpure, N.S., Srivastava, R., Kumar, R., Dabas, A., Kushwaha, B., Kumar, P., 2015. Assessment of pollution of river Ganges by tannery effluents using genotoxicity biomarkers in murrel fish *Channa punctatus*. Indian Journ of Experim Biology. 53, 476-483
92. Nepomuceno, J.C., Ferrari, I., Sanò, M.A., Centino, A.J., 1997. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. Environmental and Molecular Mutagenesis. 30, 293-297
93. Nriagu, J.M., 1989. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals, Nature. 338, 47-49
94. Nussey, G., Van Vuren, J.H.J., du Preez, H.H., 2000. Bioaccumulation of chromium, manganese, nickel and lead in the tissues of the moggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae), from Witbank dam, Mpumalanga. Water Sa. 26, 269–284
95. Ortiz-Zarragoitia, M.; Bizarro, C.; Rojo-Bartolomé, I.; Diaz de Cerio, O.; Cajaraville, M.P.; Cancio, I., 2014. Mugilid fish are sentinels of exposure to endocrine disrupting compounds in coastal and estuarine environments. Mar. Drugs. 12, 4756–4782
96. Ossana, N.A., Castañé, P.M., Polettta, G.L., Mudry, M.D., Salibián A., 2010, Toxicity of waterborne copper in premetamorphic tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 84: 712-715.
97. Pagliuca, G., Gazzotti, T., Zironi, E., Sticca, P., 2005. Residues analysis of organophosphorus pesticides in animal matrices by dual column capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorusdetection. Journal of Chromatography A, 1071, 67-70 pp
98. Paynem, J.F., Fancey, L.L, Rahimtula, A.D., Porter, E.L., 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. Compar Biochem Physiol. 86C, 233-245
99. Perugini, M., Visciano, P., Manera, M., Zaccaroni, A., Olivieri, V., Amorena, M., 2014. Heavy metal (As, Cd, Hg, Pb, Cu, Zn, Se) concentrations in muscle and bone of four commercial fish caught in the central Adriatic Sea, Italy. Environ. Monit. Assess. 186:2205–2213. DOI 10.1007/s10661-013-3530-7
100. Piccoli, F., Dragani, L. K., Vetti, C., Celli, N., Calabrese, R., Marchetti, R., Pantani, C., Pagliani, T., 2010. Indagine ecotossicologica del fiume Pescara (Abruzzo): genotossicità e bioconcentrazione in *Leuciscus cephalus* di idrocarburi policiclici aromatici e metalli pesanti. Qualità Ambientale. 04, 63-70
101. Pombo, L.; Elliot, M.; Rebelo, J.E., 2005. Environmental influences on fish assemblage distribution of an estuarine costal lagoon, Ria De Aveiro (Portugal). Sci. Mar. 69, 143–

159
102. Porto, J.I.R., Cleusa, A.S.O., Feldberg, E., 2005. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleustest on three Amazonian fish species. Environmental Research. 97, 287–292
103. Powers, A., 1989. Fish as model system. Science Vol. 246 no. 4928, 352-358
104. Prado, P.S.; Souza, C.C.; Bazzoli, N.; Rizzo, E., 2011. Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 1879–1887
105. Puy-Azurmendi, E.; Ortiz-Zarragoitia, M.; Villagrasa, M.; Kuster, M.; Aragón, P.; Atienza, J.; Puchades, R.; Maquieira, A.; Domínguez, C.; López de Alda, M.; *et al.,* 2013. Endocrine disruption in thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) from the Urdaibai Biosphere Reserve (Bay of Biscay, Southwestern Europe). Sci. Total. Environ. 443, 233–244.
106. Puzzi, C.; Bottero, S.; Cevasco, A.; Massari, A.; Monteverde, M.; Pedemonte, F.; Bertolotti, R.; Viganò, L.; Mandich, A, 2005. Fish community characterization in two stretches upstream and downstream of the Lambro River confluence with the Po River. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1040, 439–443
107. Regolamento 1100/2007/CE del 18 settembre 2007 che istituisce misure per la ricostituzione dello stock di anguilla europea. G.U. 248/17.
108. Regolamento 1259/2011/CE del 2 dicembre 2011 che modifica il Regolamento 1881/2006/CE del 19 dicembre 2006 per quanto riguarda i tenori massimi per i PCB diossina-simili e i PCB non diossina-simili nei prodotti alimentari, G.U. 03.12.2011
109. Regolamento 1881/2006/CE del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, G.U. 20.12.2006
110. Regolamento 629/2008/CE del 2 luglio 2008 che modifica il Regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, G.U. 03.07.2008
111. Rocha, P.S., Luvizotto, G.L., Kosmehl, T., Böttcher, M., Storch, V., Braunbeck, T., Hollert, H., 2009. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay vs. in situ micronucleus assay studies. Ecotoxicol Environ Saf. 72, 1842–1848
112. Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. Ecotoxicology and Environmental Safety. 56 , 442–448
113. Rybakovas, A. Barsiene, J., Lang, T., 2009. Environmental genotoxicity and cytotoxicity in the offshore zones of the Baltic and the North Seas. Mar Environ Res. 68, 246–256
114. Sanchez-Galan, S., Lin de, A.R., Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2001. Induction of micronuclei in Eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy Metals. Ecotoxicology and Environmental Safety. 49, 139-143
115. Scardi, M., Cataudella, S., Di Dato, P., Fresi, E., Tancioni, L., 2007. An expert system based on fish assemblages for evaluating the ecological quality of streams and rivers. Ecological Informatic. vol. 3, 55-63, ISSN: 1574-9541

116. Scardi, M.; Tancioni, L.; Cataudella, S., 2006. Monitoring methods based on fish. In *Biological Monitoring of Rivers: Applications and Perspectives*; Ziglio, G., Siligardi, M., Flaim, G., Eds.; Wiley: London, UK; pp. 134–153.
117. Schmitt, C.J.; Dethloff, G.M., 2000. *Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) Program: Selected Methods for Monitoring Chemical Contaminants and Their Effects in Aquatic Ecosystems. U.S. Geological Survey*; Information and Technology Report USGS/ BRD-2000–0005; Biological Resources Division: Columbia, MO, USA; p. 81.
118. Scholz, S.; Klüver, N. 2009. Effects of endocrine disrupters on sexual, gonadal development in fish. Sex. Dev. 3, 136–151
119. Serrano-García, L., Montero-Montoya, R., 2001, Micronuclei and chromatid buds are the results of related genotoxic events. Environ. Mol. Mutagen. 38, 38-45,
120. Snyder, E.M.; Snyder, S.A.; Kelly, K.J.; Gross, T.S.; Villeneuve, D.L.; Fitzgerald, S.D.; Villalobos, S.A.; Geisy, J.P., 2015. Reproductive responses of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed in *Int. J. Environ. Res. Public Health*. *12,* 1831
121. Snyder, M.J., 2000. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. Aquat Toxicol. Apr 1;48(4), 529-547
122. Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B.; Cartmell, E.; Lester, J.N., 2008. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. Environ. Int. 34, 1033–1049
123. Tancioni, L., Caprioli, R., Dawood Al-Khafaji, A.H., Mancini, L., Boglione, C., Ciccotti, E., Cataudella, S., 2015. Gonadal Disorder in the Thinlip Grey Mullet *(Liza ramada,* Risso 1827) as a Biomarker of Environmental Stress in Surface Waters. International Journal of Environmental Research and Public Health (12), 1817-1833
124. Tancioni, L., Iori, R., Gustavino, B., Boglione, C., Caprioli, R., Mancini, L., Scardi, M., Cataudella, S., 2014. Assessing effects of anthropogenic stress on aquatic ecosystems using a multilevel indicators approach: the case study of Sacco River (Latium, Italy). Scientific Symposium "Small solutions for big water-related problems - Innovative microarrays and small sensors to cope with water quality and food security" 26-28 October, Rome, Italy
125. Tancioni, L., Scardi, M., Cataudella, S., 2005. Fish-based assessment methods for the ecological status of aquatic systems. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, 41(3), 399-402
126. Tancioni, L., Scardi, M., Cataudella, S., 2006. Riverine fish assemblages in temperate rivers. In: Ziglio, G., Siligardi, M., Flaim, G (eds.), Biological Monitoring of Rivers: Applications and Perspectives. Wiley, London: 47-69
127. Tancioni, L.; Caprioli, R.; Dawood Al-Khafaji, A.H.; Mancini, L.; Boglione, C.; Ciccotti, E.; Cataudella, S., 2014. Anthropogenic threats to fish of interest in aquaculture: Gonad intersex in a wild population of thinlip grey mullet *Liza ramada* (Risso, 1827) from a polluted estuary in central Italy. Aquac. Res. 10, doi:10.1111/are.12604
128. Tetreault, G.R.; Bennett, C.J.; Shires, K.; Knight, B.; Servos, M.; McMaster, M.E., 2011. Intersex and reproductive impairment of two species of wild fish exposed to multiple municipal wastewater discharges. *Aquat. Toxicol*. 104, 278–290

129. Torreti, L., Simonella, A., Falgiani, A., Filipponi, C., Gramenzi F., 1987. Rapid determination of organochlorine pesticide residues in feeds by capillary gas chromatography. Journal of HRC& CC, 10 510-515.
130. Tsangaris, C., Vergolyas, M., Fountoulaki, E., Nizheradze, K., 2011. Oxidative stress and genotoxicity biomarker responses in grey mullet (*Mugil cephalus*) from a polluted environment in Saronikos Gulf, Greece. Arch Environ Contam Toxicol. 61, 482–490
131. Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. Rev. Fish. Sci. 6, 287–318
132. US EPA, 1980. Ambient water quality criteria for chromium. EPA 440/5-80-035. Office of water regulations and standards criteria and standards division, Washington, DC
133. US EPA, 1997. Mercury study report to congress. Volume VI:. EPA-452/R-97-008. Offic of Air Quality Planning and Standards and Office of Research and Development 1997, Washington, DC
134. US EPA, 2004. Guidelines for Water Reuse. EPA/625/R-04/108
135. Van Aerle, R.; Nolan, M.; Jobling, S.; Christiansen, L.B.; Sumpter, J.P.; Tyler, C.R., 2001. Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2841–2847
136. Van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E., 2002. Fish bioaccumulation and biomarkers in environment risk assessment: A review. Environ. Toxicol. Pharmacol., 13, 57–149
137. Van der Putte, I., Brinkhorst, M. A., Koeman, J. K., 1981. *Effect of pH on the acute toxicity of hexavalent chromium to rainbow trout (Salmo gairdneri*). Aquat. Toxicol. 1: 129-142
138. Van Gestel, C. A. M., Van Brummelen, T. C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. Ecotoxicology. Volume 5, Issue 4, pp 217-225
139. Wallace, R.A., Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Amer.Zool. 21, 325-343.
140. Walters, D.M., K.M. Fritz, B.R. Johnson, J.M. Lazorchak, and F.H. McCormick., 2008. Influence or trophic position and spatial location on polychlorinated biphenyl (PCB) bioaccumulation in a stream food web. Environmental Science and Technology. 42, 2216--2223
141. Ward, J. V., 1989. The Four-Dimensional Nature of Lotic Ecosystems. Journal of the North American Benthological Society. 8, No. 1 (Mar., 1989), pp. 2-8
142. Widianarko, B., Van Gestel, C.A.M., Verweij, R.A., Van Straalen, N.M., 2000. Associations between trace metals in sediment, water, and guppy, Poecilia reticulata (Peters), from urban streams of Semarang, Indonesia. Ecotox. Environ. Safe. 46, 101–107
143. Wirz, M.V.M.A., Saldivia, P.H., Freire-Maia, D.V., 2005, Micronucleus test for monitoring genotoxicity of polluted river water in *Rana catesbeiana tadpoles*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 75, 1220-1227.
144. Zerunian, S., 1982. Una proposta di classificazione della zonazione longitudinale dei corsi d'acqua dell'Italia centro-meridionale. Atti XLIX Conv. U.Z.I., Bari, Boll. Zool., 49 (suppl.): 200

145. Zerunian, S., Goltara, A., Schipani, I., Boz B., 2009. Adeguamento dell'Indice dello Stato Ecologico delle Comunità Ittiche alla Direttiva Quadro sulle Acque 2000/60/CE. Biologia Ambientale, 23 (2): 15-30

## Siti consultati