

## Allegato MADIT D8-03/MWEIT-D8-03/MICIT-D8-03

### Scheda metodologica/protocollo

#### 1. Scelta delle aree di indagine

Gli organismi marini vengono prelevati in stazioni posizionate in parte entro e in parte oltre le 12 miglia nautiche, in numero tale da assicurare una copertura spaziale adeguata e rappresentativa dell'area (possibilmente prevedendo il riutilizzo delle stesse stazioni nel tempo).

Il posizionamento delle stazioni viene effettuato in relazione a quanto previsto per il monitoraggio dei contaminanti chimici nel biota.

#### 2. Strategia di campionamento nell'area di indagine

In ciascuna stazione vengono prelevati un numero rappresentativo di organismi appartenenti alla specie *Mullus barbatus*, selezionando organismi entro una certa taglia (12-18 cm) e che non siano in riproduzione. Gli organismi vengono prelevati nelle stesse identiche stazioni in cui si prelevano gli organismi su cui vengono eseguite le analisi di bioaccumulo (BIOTA).

Da ciascun animale vengono prelevati i tessuti/organi (sangue, fegato, cervello, muscolo) ed opportunamente conservati (v. Trasporto e conservazione dei campioni) per eseguire le diverse analisi di biomarker.

Lo stato di salute degli organismi e gli effetti legati a specifiche classi di contaminanti vengono valutati attraverso biomarker di effetto, biomarker di esposizione (già utilizzati a livello internazionale es. OSPAR, ICES, MedPol) e parametri supplementari.

In particolare, le "principali" analisi da eseguire sono:

- la stabilità delle membrane lisosomiali (LMS) nel fegato, per uno screening dello stato generale dell'organismo;
- l'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE) nel cervello e/o nel muscolo, indice di alterazione neurotossica;
- la frequenza dei micronuclei (MN) negli eritrociti, indice di danno al DNA.

I "parametri supplementari" di supporto alle analisi di biomarker sono:

- biometrie (lunghezza e peso) di ciascun pesce, per definire il fattore di condizione (CF);
- peso del fegato di ciascun pesce, per definire l'indice epatosomatico (HSI);

Le analisi ed i parametri "facoltativi" sono:

- l'attività dell'etossiresorufina-O-deetilasi (EROD) nel fegato, indice di attivazione del sistema di biotrasformazione da parte di xenobiotici organici;
- i livelli di metallotioneine (MT) nel fegato, indice di esposizione a metalli in traccia come Hg, Cd, Cu, Zn;
- le patologie del fegato;
- genere di ciascun pesce;
- stadio maturativo;
- peso delle gonadi di ciascun pesce, per definire l'indice gonadosomatico (GSI);

- temperatura, salinità e ossigeno disciolto dell'acqua in cui vengono campionati.

### 3. Frequenza di campionamento

Il campionamento di organismi in ciascuna sottoregione va effettuato 1 volta ogni 3 anni, quindi 2 volte nell'arco dei 6 anni previsti in ogni ciclo, cercando di evitare il periodo riproduttivo della specie (si suggerisce di campionare ad Aprile oppure Ottobre).

Il periodo di campionamento sarà possibilmente lo stesso di anno in anno, per poter stabilire un eventuale trend. Tale periodo deve possibilmente coincidere con (o essere molto vicino a) il periodo di campionamento stabilito per le analisi chimiche (SEDIMENTI e BIOTA) in modo da poter integrare i dati.

### 4. Strumenti di campionamento e indagine

I campionamenti delle specie ittiche verranno effettuati mediante l'utilizzo di imbarcazioni ed attrezzi da pesca convenzionali, tipicamente utilizzati dalle marinerie locali (cfr. Allegati tecnici per i contaminanti chimici nel BIOTA: MADIT-D8-02, MWEIT-D8-02, MICIT-D8-02).

Relativamente agli eventuali parametri chimico fisici dell'acqua da misurare, ci si può avvalere di una sonda multiparametrica.

### 5. Metodo di campionamento

I campioni di tessuto/organo vengono preparati nel più breve tempo possibile dal momento dell'avvenuto decesso degli organismi.

Prima della preparazione dei campioni, vengono registrati, per ciascun organismo, le misure dei seguenti parametri:

- lunghezza (*total lenght* con precisione al mm inferiore)
- peso totale (con precisione al g)
- peso del fegato (con precisione a 0,01 g)

ed eventualmente di:

- genere (M/F)
- peso delle gonadi (con precisione a 0,01 g)
- stadio maturativo (cfr. FAO, 2019).

Il prelievo del sangue viene effettuato preferibilmente dalla vena caudale, utilizzando una siringa eparinizzata, prima della dissezione degli altri tessuti/organi (cervello, fegato e muscolo).

Inoltre, se possibile, viene registrata la temperatura, la salinità e l'ossigeno disciolto del sito di prelievo al momento della cattura.

### 6. Metodo di analisi dei campioni o di indagine

I protocolli da utilizzare devono essere standardizzati oppure riconosciuti a livello internazionale o nazionale. Di seguito vengono indicati alcuni protocolli che potrebbero essere utilizzati:

- per LMS-CYT (nel fegato) metodo citochimico descritto in Moore et al. (2004);

- per AChE (nel muscolo e/o cervello) metodo spettrofotometrico descritto in Boquenè and Galgani (1998);
- per MN in eritrociti metodo tramite osservazione al microscopio ottico descritto in Davies and Vethaak (2012) oppure Gorbi et al. (2009);
- per MT (nel fegato) metodo spettrofotometrico descritto in UNEP/RAMOGÉ (1999), Viarengo et al. (1997), Hylland (1999);
- per EROD (nel fegato) metodo spettrofluorimetrico descritto in Stagg et al. (2016);
- per patologie del fegato metodo descritto in Feist et al. (2004);
- per la valutazione dello stadio maturativo metodo descritto in FAO (2019);
- per i fattori di condizione metodo descritto in Hansson et al. (2017).

## 7. Trasporto e conservazione dei campioni

Una volta dissezionati, gli organi/tessuti target, quali fegato, cervello e muscolo, vengono immediatamente congelati in azoto liquido, trasportati in laboratorio e successivamente conservati a -80° C fino al momento delle analisi. I campioni di sangue vengono conservati a +4°C fino al momento dell'analisi.

## 8. Raccolta e restituzione dei dati e delle informazioni

I risultati delle analisi vengono restituiti sia come medie e deviazioni standard, che come singoli dati relativi a ciascun animale analizzato, nelle unità di misura di seguito indicate:

- min per LMS-CYT;
- nmol/min/mg proteine per l'AChE;
- ‰ per MN;
- equivalenti di GSH nmoli/mg di proteine opp. µg/g di tessuto fresco per MT;
- pmoli/min/mg proteine per l'EROD.

Inoltre, vanno restituiti i dati relativi ai “parametri supplementari” (Cfr. paragr. 2. “Strategia di campionamento”), oltre alle coordinate e date di campionamento. Specificare anche metodo di conservazione e trasporto dei campioni effettuato.

## Riferimenti bibliografici:

- Boquenè G. and F. Galgani, 1998 (ICES TIMES n. 22) Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds.
- Davies I.M. and D. Vethaak, 2012. ICES Cooperative Research Report. No. 315. Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects.
- FAO, 2019. Atlas of the maturity stages of Mediterranean fishery resources. Studies and review 99.
- Feist S.W., Lang T., Stentiford G.D., Köhler A., 2004 (ICES TIMES n. 38). Biological effects of contaminants: Use of liver pathology of the European flatfish dab (*Limanda limanda* L.) and flounder (*Platichthys flesus* L.) for monitoring.

- Hansson T., Thain J., Martínez-Gómez C., Hylland K., M. Gubbins, L. Balk, 2017 (ICES TIMES n. 60). Supporting variables for biological effects measurements in fish and blue mussel.
- Hylland K., 1999 (ICES TIMES n. 26). Biological effects of contaminants: Quantification of metallothionein (MT) in fish liver tissue.
- Moore M.N., Lowe D. and A. Kohler, 2004 (ICES TIMES n. 36). Biological effects of contaminants: Measurement of lysosomal membrane stability.
- Stagg R., McIntosh A. and M.J. Gubbins, 2016 (ICES TIMES n. 57). Determination of CYP1A dependent mono-oxygenase activity in dab by fluorimetric measurement of EROD activity in S9 or microsomal liver fractions.
- UNEP/RAMOGÉ, 1999. Manual on the biomarkers Recommended for the UNEP/MAP MED POL Biomonitoring Programme.
- Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., and Fabbri R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, 44: 69-84.