



CRITERI DI CAMPIONAMENTO E PROCEDURE DI CARATTERIZZAZIONE DI ORGANISMI MARINI

Chiara Maggi

ISPRA

Indice

1. Scelta delle specie



2. Periodo di campionamento



3. Frequenza di campionamento



4. Aspetti tecnici del campionamento



5. Preparazione dei tessuti



6. Conservazione del campione



7. Metodi analitici





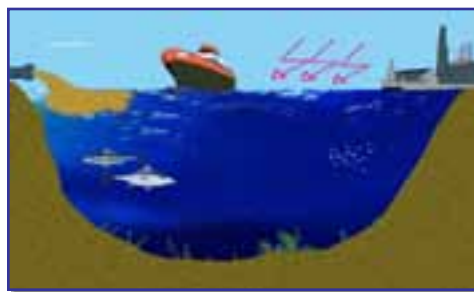
1. Scelta delle specie

Criteri:

accumulo di contaminanti



relazione tra le *concentrazioni di contaminanti* nella specie e le *concentrazioni medie nell'ambiente* circostante;



sedentarietà e *rappresentatività* dell'area;

abbondanza nell'area in esame;



facilità nel campionamento;



facilità nell'identificazione;

1. Scelta delle specie



Criteri:



vita sufficientemente lunga per la divisione
in *classi di età/taglia*

dimensioni tali da permettere le analisi

alto fattore di bioaccumulo per permettere
l'analisi senza preconcentrazione;



tolleranza alle acque salmastre per consentire
confronti tra siti estuarini e off-shore.

1. Scelta delle specie



Bioindicatori

mancanza di meccanismi biochimici o fisiologici in grado di regolare le concentrazioni tissutali dei contaminanti.

misura “integrata nel tempo” e non riferibile al momento del prelievo



evidenza di gradienti di inquinamento sia in senso spaziale che temporale

stima della “biodisponibilità” delle sostanze tossiche e valutazione del rischio legato al trasferimento attraverso le catene alimentari



1. Scelta delle specie



Bivalvi



Da oltre 40 anni i molluschi bivalvi sono i bioindicatori più adoperati nei programmi di monitoraggio marino-costiero

assenza di meccanismi di regolamentazione

abilità nell'accumulare metalli, idrocarburi policiclici aromatici, idrocarburi alifatici, composti organici alogenati, pesticidi organofosforati, ecc.

conoscenza del ciclo biologico e dei fattori naturali e ambientali che influenzano il bioaccumulo.



1. Scelta delle specie



Bivalvi

Grazie alle loro caratteristiche biologiche ed ecologiche il mitilo comune (*Mytilus galloprovincialis*) rappresenta la specie prioritaria da investigare usando sia *popolazioni naturali* che *organismi trapiantati*.



Valide alternative, per importanza ecologica sito-specifica



ostriche
(*Crassostrea spp.*, *Ostrea spp.*)

vongole
(*Chamaelea spp.*, *Tapes spp.*)

1. Scelta delle specie



Pesci:

Per monitorare la presenza di contaminanti chimici possono essere considerati anche alcuni pesci bentonici o demersali.

la triglia (*Mullus barbatus* or *M. Surmuletus*)



la spigola (*Dicentrarchus labrax*)



l'orata (*Sparus aurata*)



il cefalo (*Mugil cephalus*)



l'anguilla (*Anguilla anguilla*)

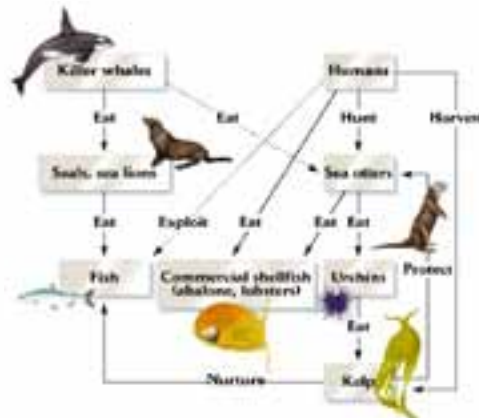


1. Scelta delle specie

Top predator

campionare più specie

livelli trofici differenti



trasferimento attraverso la dieta.

livello più alto della catena trofica

maggiore esposizione

livelli basali alti, es Hg e composti organici

non riflettono la biodisponibilità specifici di un certo sito.

utili per definire il rischio di biomagnificazione in un'area più vasta.



2. Periodo di campionamento



La concentrazione di contaminante può essere influenzata da fattori ambientali e biologici

fattori ambientali che influenzano la biodisponibilità:



temperatura

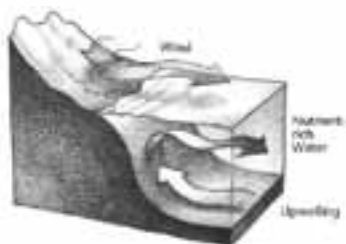


circolazione

sostanza organica
e nutrienti



input di acqua dolce



fenomeni di up-welling

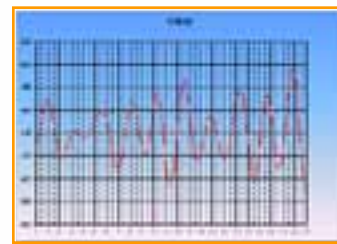


2. Periodo di campionamento



Le principali variabili biologiche :

la fase del ciclo riproduttivo



lo sviluppo gonadico durante la gametogenesi



cambiamenti della composizione tissutale

perdita di peso durante il periodo di spawning



Considerare le fluttuazioni stagionali per discriminare **variabilità naturale** da **impatto antropico**

2. Periodo di campionamento

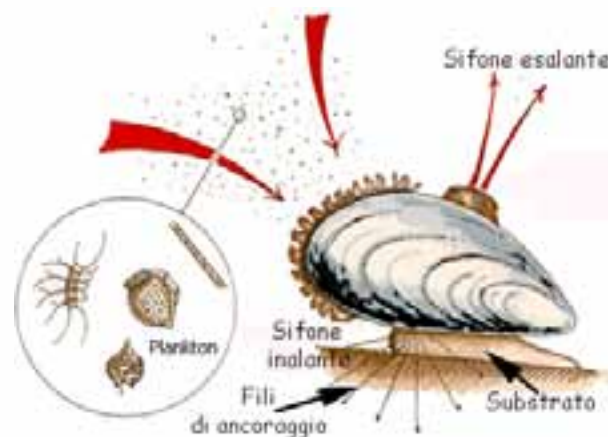


Eeguire il campionamento durante un periodo dell'anno in cui la **concentrazione** di contaminanti **non** sia **condizionata** da **variazioni** nei **meccanismi fisiologici** dell'organismo



periodi **fuori** dal ciclo di spawning

periodi in cui la **domanda di cibo** è praticamente **costante**



2. Periodo di campionamento



In accordo con la strategia e gli obiettivi del piano di monitoraggio si raccomanda di scegliere in anticipo il periodo di campionamento, possibilmente corrispondente al periodo di prespawning



Il periodo pre-estivo buono per diverse specie



In *letteratura* si trovano informazioni dettagliate riguardo al ciclo biologico e al miglior periodo di campionamento per molti organismi.

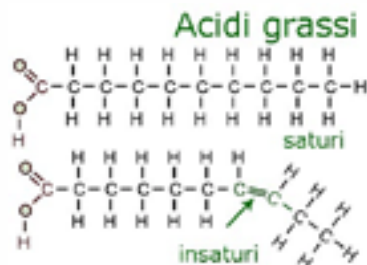
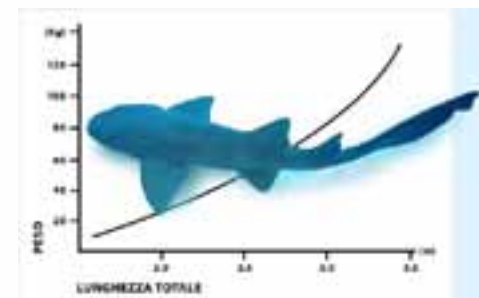


2. Periodo di campionamento



In alternativa bisogna considerare che tali fenomeni possono causare:

variazioni del peso corporeo



variazioni della concentrazione e composizione lipidica



variazioni nella concentrazione di contaminanti

Le variazioni stagionali legate allo sviluppo gonadico o alle condizioni trofiche possono essere tenute in conto misurando gli indici di condizione (IC).

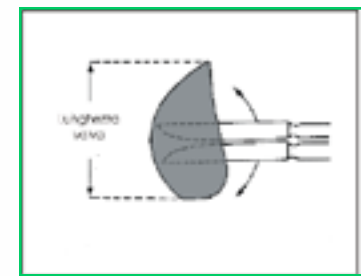
2. Periodo di campionamento



Indici di condizione



Per i bivalvi: peso del tessuto
lunghezza della conchiglia



Per i pesci:

Indice epatosomatico: peso del fegato
peso dell'intero corpo

Indice gonadosomatico: peso delle gonadi
peso dell'intero corpo



Si tratta di misure indirette, non costose (**bilancia** e **calibro**), la cui utilità è largamente documentata.

3. Frequenza di campionamento



Non c'è una frequenza di campionamento ideale.

Le strategie di monitoraggio più comuni adoperano frequenze mensili, stagionali, semestrali o anche annuali.

Frequenza di campionamento più appropriata:

tempo di vita dei contaminanti investigati

la finalità del progetto di monitoraggio

la presenza di input antropogenici

la disponibilità di risultati precedenti nell'area in esame.



3. Frequenza di campionamento



Il tempo di vita (o turnover) di un contaminante riflette la rapidità con cui, una volta accumulato dall'organismo, questo composto può essere **metabolizzato** o **escretato**.

Cadmio e Piombo : un turnover piuttosto lungo (circa sei mesi)
 → un certo evento può essere registrato dall'organismo in questo arco di tempo.

Rame o IPA : un turnover più breve (3-6 settimane)
 → un evento episodico potrebbe non essere visto dopo un tempo più lungo.

3. Frequenza di campionamento



Importante è anche la finalità del progetto

se l'area non è sottoposta a particolari pressioni → monitoraggio di sorveglianza → bassa frequenza
semestrale o annuale



frequenza più elevata (mensile o stagionale)
 in aree caratterizzate dalla presenza di specifici impatti e/o specifiche forme di inquinanti (aree industriali, portuali ecc.)

3. Frequenza di campionamento

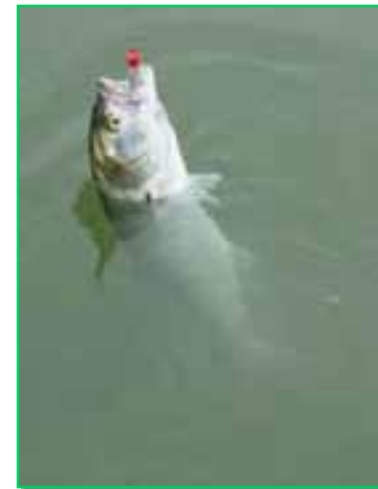


attività temporanea, es. dragaggio

→ campionamenti prima, durante le varie fasi e dopo la fine delle operazioni.



area mai investigata → frequenza più elevata (1-2 mesi), che può essere abbassata a seconda dei risultati ottenuti.



4. Aspetti tecnici del campionamento



Biomonitoraggio passivo: raccolta di popolazioni naturali



Biomonitoraggio attivo: trasferimento/trapianto di organismi

Scelta delle stazioni di monitoraggio

Tempo di esposizione noto

Riduzione della variabilità tra individui

Pooling



Può presentarsi la necessità di mettere insieme i tessuti degli organismi così da ottenere una quantità sufficiente di materiale per le analisi chimiche.

Per i **bivalvi** e per **alcuni tessuti di pesci** è quasi sempre necessario effettuare dei pools.

Nei campionamenti effettuati tra i diversi anni, è importante mantenere lo stesso numero di individui per pool nelle varie classi di taglia.



Importante è anche mantenere lo stesso numero di pools in ogni campionamento

4. Aspetti tecnici del campionamento



Biomonitoraggio passivo: Bivalvi

I mitili possono essere campionati con le mani o mediante l'impiego di un sommizzatore. Usare sempre i guanti.



Le vongole possono essere prelevate con le rasche.

Si possono adoperare mezzi commerciali come le turbosoffianti.

Devono essere campionati individui preferibilmente privi di materiale vegetativo o conchigliare.

4. Aspetti tecnici del campionamento



Biomonitoraggio **passivo**: Bivalvi

Numero di organismi sufficiente per l'intero set di analisi chimiche

selezionare almeno **150 individui** di taglia compresa tra il **70-90% della media delle taglie massime** osservate.

Se questo non è possibile si ricorre all'impiego di organismi trapiantati.

raggruppare in pools, composto ciascuno da **3 a 5 replicati**, ciascuno a sua volta composto da **3-5 individui**.

refrigerare a circa **4°C in ambiente umido**, non in acqua, e trasportare entro 24 in laboratorio per la dissezione.

In alternativa dissezionare in loco e subito congelare.

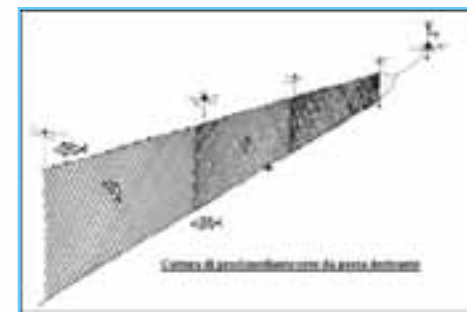
4. Aspetti tecnici del campionamento



Biomonitoraggio passivo: Pesci



vengono campionati con **reti** da imbarcazioni di ricerca o in alternativa, commerciali.



tempo di raccolta dalla rete molto breve per evitare stress e danno all'organismo



Usare sempre i guanti.

Sciacquare con acqua di mare pulita per allontanare materiale aderente alla superficie.



4. Aspetti tecnici del campionamento



Biomonitoraggio **passivo**: Pesci

Il numero di organismi campionati può dipendere dal metodo di cattura

il numero ottimale deve consentire la formazione di **3-5 replicati** per ciascuna classe di contaminanti



a seconda della taglia e del peso dei tessuti si possono considerare campioni provenienti da **singoli individui** o da **individui raggruppati**.

Per **tessuti come il fegato** normalmente viene fatto un pool proveniente da diversi individui.

4. Aspetti tecnici del campionamento



Biomonitoraggio attivo

raccolta di organismi provenienti da un sito di controllo o di allevamento e trasloco in gabbie per 4 settimane nell' area da monitorare.



Le analisi di organismi trapiantati forniscono un'informazione integrata nell'arco di 4 settimane.

Non riflettono un'esposizione cronica o comunque di lungo effetto.

4. Aspetti tecnici del campionamento



Biomonitoraggio attivo

Valutare la biodisponibilità attuale di un certo composto o la relazione tra la *concentrazione di esposizione e l'effetto*.

Il biomonitoraggio attivo è ampiamente praticato con i mitili (*Mytilus spp*), molto meno con i pesci che spesso non tollerano le procedure di trasloco.
L'anguilla sembra la specie più tollerante.

5. Preparazione dei tessuti



Bivalvi

Dissezionare l'intero tessuto quando sono ancora vivi ed evitare danneggiamenti al tessuto



I parametri biometrici, per calcolare l'indice di condizione, come **lunghezza della conchiglia** e **peso del tessuto** devono essere registrati prima della formazione dei pools.

L'acqua nella conchiglia deve essere allontanata.
In aree con elevata torbidità il tessuto deve essere risciacquato con acqua di mare pulita dopo la dissezione.

5. Preparazione dei tessuti



Pesci

La dissezione degli organismi deve avvenire a bordo o in alternativa in laboratorio entro 4-6 ore dal prelievo



Vanno registrati parametri biometrici come lunghezza e peso dell'organismo, peso del fegato e delle gonadi per calcolare gli indici di condizione.

La scelta del tessuto appropriato può essere influenzata dallo scopo del monitoraggio, dalle classi di composti chimici da ricercare, dalla disponibilità di tessuto.

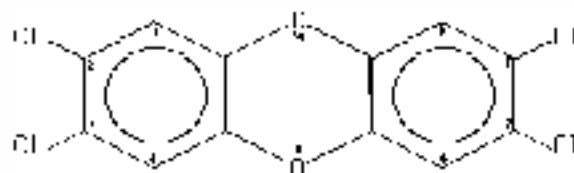
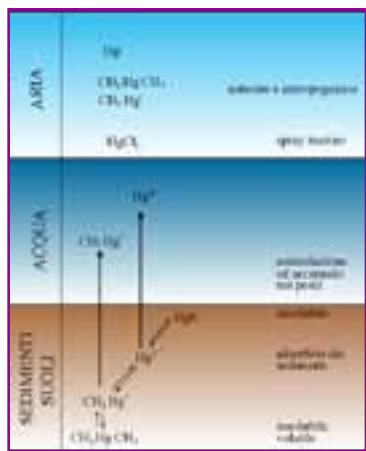
5. Preparazione dei tessuti



Muscolo:

il tessuto muscolare normalmente è in quantità sufficiente per le analisi

riflette la porzione edibile



generalmente accumula contaminanti lipofili come composti alogenati e metilmercurio.

Bisogna valutare attentamente il livello trofico dell'organismo nel confronto con altre specie.

5. Preparazione dei tessuti



Muscolo:

L'accumulo di contaminanti nel tessuto muscolare è un processo a lungo termine, mediato dal trasferimento lungo la catena trofica e fortemente influenzato dalla biomagnificazione.

Non riflette la biodisponibilità attuale nè le variazioni recenti nel livello chimico di questi composti.

Non è un buon indicatore per composti come IPA o idrocarburi alifatici e per molti metalli in traccia.

5. Preparazione dei tessuti



Fegato:

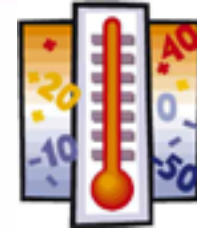
E' certamente un tessuto indicatore molto importante per *tutte le classi di composti chimici*.

Riflette la biodisponibilità attuale dei contaminanti.



La quantità di tessuto a disposizione normalmente *non è sufficiente* per le analisi (a meno di preparare un campione derivante da più organismi).

6. Conservazione del campione



Se il campione non viene analizzato subito deve essere immediatamente congelato e conservato a -20°C

I contenitori debbono essere di materiale adeguato per le rispettive analisi chimiche.

metalli:

Falcon, HDPE, vetro, teflon



composti organici:

fogli di alluminio decontaminati, vetro, teflon
o in alternativa anche Falcon.



7. Metodi analitici



Composti organici

Le procedure di analisi di contaminanti organici nel biota comprendono l'estrazione dal campione con solvente organico, eliminazione dei lipidi, purificazione, frazionamento e determinazione con HPLC o GC con rivelatore fluorimetrico, a cattura di elettroni o spettrometro di massa.



Si raccomanda di *lavorare sul campione secco* e di convertire poi il dato in peso umido

7. Metodi analitici



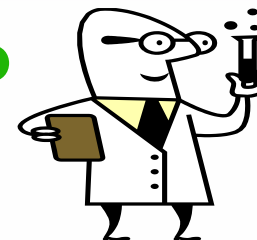
Metalli

La determinazione di metalli in traccia nel biota normalmente include la digestione acida del campione e l'analisi attraverso tecniche spettrometriche come assorbimento atomico, plasma induttivamente accoppiato, fluorescenza a raggi X.



Prima della digestione il campione deve essere seccato a peso costante. La temperatura non deve essere superiore a 50°C per evitare perdite di elementi più volatili (es. Hg).

8. Restituzione del dato analitico



Si raccomanda di lavorare sul campione secco poichè differenze nel contenuto d'acqua possono influenzare il confronto tra campioni e, nel caso dei metalli, l'acqua può dare interferenze con la procedura di digestione.

Peso umido e peso secco devono essere attentamente misurati per *normalizzare* il dato analitico.

Si possono determinare anche i lipidi totali e usare il dato per *normalizzare* i risultati analitici.

La *normalizzazione rispetto al contenuto grasso* è solo addizionale e non sostitutiva della normalizzazione rispetto al peso.