



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE
DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE VETERINARIE *CURRICULUM* “MORFOFISIOLOGIA E
BIOTECNOLOGIE APPLICATE”
XXXIII Ciclo S.S.D.VET/02

***MUGIL CEPHALUS* BIOINDICATORE DEL CARICO ANTROPICO DI ALCUNI
METALLI PESANTI NEL LAGO DI FARO: INFLUENZA STAGIONALE E
MONITORAGGIO DEI “*BLOOD BIOMARKERS*”**

Tesi di Dottorato di Ricerca della
Dott.ssa Concetta Ida SAOCA

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Rosaria LAURÀ

Tutor

Chiar.mo Prof. Francesco FAZIO

Amio Padre

***MUGIL CEPHALUS* BIOINDICATORE DEL CARICO ANTROPICO DI
ALCUNI METALLI PESANTI NEL LAGO DI FARO: INFLUENZA
STAGIONALE E MONITORAGGIO DEI “*BLOOD BIOMARKERS*”**

SUMMARY

The aim of this study was: 1) to evaluate in striped mullet *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758), a sentinel fish species captured exposed to heavy metal pollution, the capacity of bioaccumulation in different tissues and organs. 2) to determine the seasonal variations in the concentration of some heavy metals (cadmium Cd; Lead Pb; chromium Cr and mercury Hg) in different tissues (muscle, gills, liver, stomach and intestine) of this species. 3) to evaluate haematological and haematochemical response of fish in relation to the different bioaccumulation of metals in different season, in order to identify possible blood biomarkers useful to biomonitoring the aquatic environment exposed to heavy metal pollution. For this purpose, 80 *M. cephalus* (20 for each season) were captured in three different stations of Faro Lake, Messina, Sicily. Biometric indices (weight, fork length and total length) of each fish were registered.

The physico-chemical parameters of the water of the study area were also measured and the content of heavy metal in water and sediment was determined. On all fish, haematological (white blood cell, WBC; red blood cell,

RBC; haemoglobin concentration, Hb; haematocrit, Hct; mean corpuscular volume, MCV; mean corpuscular haemoglobin, MCH; mean corpuscular haemoglobin concentration, MCHC; thrombocytes count, TC), haematochemical parameters (aspartate aminotransferase, AST; alanine aminotransferase, ALT; alkaline phosphatase, ALP; lactate dehydrogenase, LDH) and the concentration of heavy metals in different tissues in the four seasons were assessed.

Our results showed that different tissues of *M. cephalus* have a different heavy metal bioaccumulation capacity; gills were the tissue with the highest concentration of metals while the muscle with the lowest. The results of statistical analysis of the data, after the application of one-way analysis of variance (ANOVA) showed statistically significant differences in the haematological, haematochemical parameters and in the tissue concentration of heavy metals in the different seasons. Our research provides a valid contribute to techniques concerning environmental biomonitoring and, therefore, to the control of pollution and water management, it also contributes to expanding the studies, carried out to date in this field, to improve the health and sustainability of aquatic environments.

1. INTRODUZIONE

1.1. *L'inquinamento dei metalli pesanti nell'ambiente acquatico*

L'inquinamento delle acque, attualmente, rappresenta un fenomeno che ha assunto soprattutto negli ultimi anni, dimensioni sempre più preoccupanti, causando seri danni alla vita acquatica e allo stato di salute dell'ambiente e degli esseri viventi in generale, uomo compreso (Karbassi et al., 2006; Al-Masri, 2002). I sistemi acquatici infatti, così come animali e vegetali, sono esposti ad una notevole varietà di sostanze chimiche estranee all'organismo e potenzialmente tossiche, che possono essere di origine naturale o antropogenica. Questi inquinanti comprendono i cosiddetti metalli pesanti e numerose molecole e composti sia organici che inorganici. Negli ultimi anni è stata prestata particolare attenzione proprio all'inquinamento dell'ambiente acquatico da metalli pesanti, i quali hanno assunto notevole importanza a causa dell'elevato rischio di tossicità ad essi associato e del loro bioaccumulo nella catena trofica (Mansour e Sidky, 2002; Gochfeld, 2003).

Nell'ambiente acquatico l'inquinamento da metalli pesanti deriva principalmente dalla deposizione degli agenti atmosferici, dagli scarichi del settore industriale, dal drenaggio delle aree urbane e agricole e dalle acque reflue degli impianti di trattamento (Vander Oost et al., 2003). La combustione del carbone rappresenta una delle più importanti fonti di emissione antropogenica di elementi in traccia e di numerosi metalli pesanti (Wagner e Boman, 2003). Quando la contaminazione da metalli pesanti nelle acque e nei

sedimenti raggiunge elevate concentrazioni rappresenta una seria minaccia a causa della loro tossicità, della lunga persistenza e del bioaccumulo e biomagnificazione lungo la catena alimentare (Eisler, 1993; Has-Schön et al., 2006). Le sostanze tossiche, se in concentrazioni sufficientemente elevate, agiscono determinando risposte dannose nel sistema biologico esposto e ne alterano le funzioni anche in modo irreversibile e letale.

I metalli pesanti sono definiti “elementi traccia” in quanto in condizioni fisiologiche sono presenti in piccole concentrazioni negli esseri viventi, infatti alcuni di essi come il rame, Cu; zinco, Zn; cobalto, Co; magnesio Mg e manganese Mn, a basse concentrazioni sono micronutrienti essenziali per la vita, mentre altri, quali il cadmio (Cd), il piombo (Pb), il cromo (Cr) e il mercurio (Hg) non hanno alcun ruolo biologico e sono tossici anche in piccole quantità. Per tale motivo proprio questi ultimi sono i metalli presi in considerazione in questa ricerca.

1.1.1. *Cadmio*

Il Cd presente negli ecosistemi acquatici proviene principalmente da fonti di origine antropica associate alle attività minerarie, alle industrie metallurgiche, all’uso di fertilizzanti, alle industrie di vernici e smalti e alle industrie della galvanoplastica (WHO, 1992). In mare questo metallo si riscontra principalmente sotto forma di ioni cadmio che formano complessi stabili con gli ioni cloro; esso viene trasferito dai sedimenti e si concentra

specialmente nel fitoplancton, nelle macrofite e di conseguenza nei crostacei e nei molluschi. In questi ultimi il fattore di accumulo del metallo è maggiore rispetto ai pesci, nei quali i principali organi bersaglio sono il rene, le branchie e l'epatopancreas (Demirak et al., 2006).

1.1.2. *Piombo*

Il Pb è uno dei metalli tossici più diffusi nell'ambiente in quanto ampiamente utilizzato dall'uomo in diverse attività, esso infatti, viene rilasciato nell'atmosfera dalle industrie di smalti e vernici e durante diversi processi industriali (fusione dell'acciaio, combustione dei carburanti fossili). Viene immesso nell'ambiente acquatico a seguito del dilavamento superficiale del suolo e soprattutto grazie alle deposizioni atmosferiche (fall-out). Il principale meccanismo che regola le concentrazioni di piombo nell'ambiente acquatico è rappresentato dall'assorbimento da parte dei sedimenti.

1.1.3. *Cromo*

Il Cr entra nell'ecosistema acquatico attraverso fonti di origine sia naturale che antropogenica. Esso esiste nell'ambiente in forma trivalente (Cr-III) ed esavalente (Cr-VI); la forma esavalente è altamente tossica per gli organismi acquatici in quanto facilmente biodisponibile (Farag et al. 2006; Velma et al., 2009), tuttavia una volta nell'ambiente il Cr esavalente può essere ridotto nella forma trivalente a seconda delle caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua. Le proprietà tossiche del metallo vengono modificate da diversi fattori biotici e

abiotici, infatti la tossicità della forma esavalente per i pesci varia a seconda della specie, dell'età e dei parametri fisico-chimici dell'acqua (Guertin, 2005). Il modello di bioaccumulo di questo metallo varia notevolmente tra i diversi organismi acquatici (Marchese et al., 2008).

1.1.4. *Mercurio*

Il Hg è un metallo pesante tossico sia per l'uomo che per gli animali (Klarkson, 1997; WHO, 2003), che possiede proprietà fisico-chimiche complesse. È largamente impiegato nelle industrie chimiche e farmaceutiche per la preparazione di diversi prodotti (insetticidi, disinfettanti, batterie, termometri,), nel settore medico e nell'agricoltura (Jarup, 2003). È presente nell'atmosfera principalmente sotto forma, relativamente non reattiva, di elemento gassoso, ma si riscontra nell'ambiente in diverse forme chimiche sia inorganiche che organiche (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 2008), tutte estremamente tossiche, (Bernhoft, 2012).

Nell'ambiente marino, subisce la trasformazione in composti organici, come il metilmercurio, ad opera di microrganismi negli strati superficiali dei sedimenti. Il metilmercurio riveste particolare importanza a causa della sua elevata solubilità in acqua e capacità di bioaccumulo; esso entra nella catena trofica attraverso il plancton per passare, poi, attraverso gli invertebrati e i pesci situati ai più bassi livelli della catena trofica, ai grandi predatori. I pesci eliminano il mercurio assorbito con grande difficoltà.

1.2. *Bioindicatori: preziose sentinelle dell'ambiente acquatico*

Con il termine di “indicatore biologico”, o “bioindicatore”, si intende un sistema biologico in grado di indicare, attraverso modificazioni biochimiche, fisiologiche, morfologiche, comportamentali etc., l'azione delle variazioni ambientali causate da una probabile attività antropica, soprattutto di tipo negativo. Esiste, infatti, una stretta correlazione tra organismo e l'ambiente in cui vive. Un organismo nel suo ambiente tende a mantenere “l'omeostasi”, cioè quella condizione di equilibrio dinamico che autoregola la stabilità interna dell'organismo. Quando esso viene esposto a contaminanti, questo equilibrio è minacciato e si attivano dei meccanismi compensatori che portano ad un aumento o ad una riduzione di uno o più processi, a modificazioni delle funzioni fisiologiche e a cambiamenti strutturali.

Un organismo o un intero sistema biologico, per essere considerato un bioindicatore, deve necessariamente possedere alcuni requisiti: innanzitutto deve essere facilmente reperibile, rappresentativo per il loro ruolo ecologico nell'ambiente esaminato, ben conosciuto dal punto di vista genetico e funzionale, e presentare una sensibilità verificata nei confronti dell'elemento inquinante oggetto di studio, il quale deve comunque essere ben identificabile rispetto altri possibili fattori di stress presenti in quell'ambiente.

L'utilizzo dei bioindicatori consente di fare una biovalutazione dell'azione che un determinato elemento ha nell'ambiente considerato, tuttavia i dati ottenuti non hanno ovviamente la precisione che può essere ottenuta con le

rilevazioni strumentali, che restano quindi necessarie' I dati ottenuti con la biovalutazione devono essere correttamente interpretati in quanto la vita dell'organismo dipende dall'interazione di tutte le componenti ambientali, alle quali tende ad adattarsi; essi completano i dati di rilevazione strumentale tradizionali permettendo un confronto nel tempo dei vari parametri osservati ed una correlazione alle variazioni dei fattori ambientali. Nel complesso rappresentano il punto di partenza per la definizione degli indici ecologici, oggi indispensabili per inquadrare un'area di osservazione dal punto di vista ambientale.

La scelta dell'organismo bioindicatore, deve tener conto della sua cosiddetta "nicchia trofica", cioè dell'insieme di quelle caratteristiche relative alla sua fisiologia, all'habitat, allo stile di vita, al tipo di alimentazione, etc. che rappresentano le funzioni di specie nella comunità, e delle interazioni con la componente biotica e abiotica (Bargagli et al., 1998). Un altro elemento importante nella scelta del bioindicatore è la sua mobilità; infatti l'informazione che viene fornita dal l'organismo bioindicatore è relativa all'area vitale dove l'organismo si muove e si alimenta.

Tra gli organismi acquatici, i pesci sono stati spesso utilizzati per la valutazione dell'esposizione a sostanze inquinanti quali i metalli pesanti (Adam et al., 1989; Southworth et al., 1994), che possono permanere per periodi più o meno lunghi negli organi e nei tessuti, in concentrazioni superiori a quelle presenti nella matrice acquosa.

I pesci quindi, sono considerati significativi bioindicatori negli ambienti acquatici soprattutto per quanto concerne l'inquinamento da metalli pesanti (Authman, 2008; Rashed, 2001). Essi offrono il vantaggio di dare una valida descrizione delle caratteristiche naturali dei sistemi acquatici e di consentire una valutazione dei cambiamenti ambientali (Lamas et al., 2007). Inoltre trovandosi alla fine della catena trofica acquatica, i pesci possono accumulare metalli che vengono trasferiti all'uomo attraverso il cibo causando patologie croniche o acute (Al Yousuf et al., 2000).

L'utilizzo dei pesci come bioindicatori può, quindi, rivelarsi un modello sperimentale importante per valutare gli effetti a lungo termine dell'accumulo dei metalli pesanti, la reale biodisponibilità di un inquinante nei diversi comparti ambientali, le modifiche subite lungo la catena trofica, e l'influenza dei fattori chimico-fisici sulla tossicità di un contaminante e di fattori biologici naturali quali la fisiologia, l'età e il sesso.

1.2.1. *Mugil cephalus*: caratteristiche biologiche e ruolo di bioindicatore

Il cefalo striato *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) (Figura 1) è un pesce teleosteo appartenente all'ordine dei Mugiliformi, famiglia dei Mugilidi, presenta un corpo fusiforme e robusto, compresso lateralmente procedendo verso la coda; testa tozza e bocca piccola terminale; può raggiungere 4 kg di peso e 60 cm di lunghezza. Il dimorfismo sessuale in questa specie non è molto accentuato ma le femmine sono distinguibili dai maschi in quanto generalmente

sono di dimensioni maggiori. È un pesce eurialino cosmopolita presente principalmente nelle acque (sia marine che interne costiere) delle zone tropicali e temperate che predilige temperature superiori ai 16 °C. Abita i fondali sabbiosi e le praterie di posidonie e, abitualmente, non si spinge a profondità elevate (oltre i 200 m), si nutre di invertebrati bentonici e materiale in decomposizione; è in grado di tollerare ampi intervalli di temperatura (5-37 °C) e valori elevati di salinità.

Il cefalo striato è in grado di accumulare in modo significativo metalli pesanti e altri inquinanti e l'elevata lunghezza del suo intestino gli consente di aumentare l'efficienza di assorbimento dei contaminanti ingeriti (Odum, 1970). *M. cephalus* tende a stazionare nelle regioni del sedimento; a tal riguardo, uno studio condotto da Kilgour (1991) indica che gli animali che vivono a stretto contatto con il sedimento mostrano concentrazioni relativamente alte di metalli nel corpo.

Il cefalo è il mugilide maggiormente diffuso in acquacoltura e una delle specie più importanti nel Mar Mediterraneo, e nonostante non sia una specie particolarmente pregiata ha un discreto interesse commerciale e costo elevato. Il suo utilizzo come bioindicatore di inquinamento ambientale è dovuto al fatto che si tratta di una specie particolarmente resistente all'acqua inquinata e quindi ottimale per il monitoraggio ambientale. In precedenti lavori infatti il *M. cephalus* è stato utilizzato come specie "sentinella", rappresentando un valido

bioindicatore di inquinamento ambientale. (Fazio et al., 2014; Fazio et al., 2019 a, b; Fazio et al., 2020a, b).



Figura 1. Cefalo stiato *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758).

1.3. *Il bioaccumulo dei metalli pesanti nei teleostei*

Gli effetti tossici dei metalli nei pesci sono causati principalmente dal “bioaccumulo” (Eroglu et al., 2015). Con il termine di bioaccumulo si intende l’accumulo di sostanze inquinanti le quali, riversandosi nelle acque ed essendo idrofobiche, si concentrano all’interno degli esseri viventi e vengono trasferite da un organismo all’altro attraverso la catena alimentare, subendo, di conseguenza, un progressivo e consistente aumento di concentrazione mediante il processo di “amplificazione biologica” durante il passaggio nella catena alimentare.

Il bioaccumulo può avvenire attraverso diversi meccanismi quali la captazione diretta, da parte dell'organismo, delle sostanze tossiche disciolte nell'acqua; l'ingestione di cibo contaminato; l'assorbimento attraverso epiteli quali le branchie, la pelle e il tratto digestivo (Burger et al., 2002; Erickson et al., 2008) oppure attraverso il sedimento (Bervoets et al., 2001), che costituisce il principale serbatoio di sostanze inquinanti e metalli nei sistemi acquatici. I metalli che entrano quindi nel corpo attraverso queste vie vengono rilasciati nel corpo attraverso il sistema circolatorio (Zhai et al., 2017); alcuni di essi vengono eliminati attraverso il rene e le branchie, altri si accumulano nei tessuti e diventano tossici per gli organi bersaglio.

1.4. *Effetti tossici dei metalli pesanti nei pesci*

Negli ultimi decenni l'aumento spropositato dell'utilizzo dei metalli pesanti per diversi scopi ne ha determinato un notevole aumento nel suolo, nell'atmosfera e nell'ambiente acquatico dove vengono solitamente rilasciati (Yang e Rose, 2003). Quindi gli organismi acquatici sono esposti ad una grande varietà di metalli che, dissolti e trasportati dall'acqua, vengono assorbiti da essi (Alam et al., 2002).

Già alla fine dell'Ottocento, con l'avvento dell'era industriale, si poté osservare una maggiore incidenza di malattie associate all'esposizione a vari metalli tossici. La tossicità dei metalli pesanti si esplica attraverso l'interazione

con macromolecole quali gli acidi nucleici (DNA e RNA) e proteine (Briat et al., 1999).

Cadmio

Il Cd rappresenta un metallo pesante altamente tossico anche a bassi livelli di esposizione sia per i mammiferi che per i pesci ed il cui la cui tossicità varia da specie a specie. A causa dell'elevata facilità e rapidità con la quale si accumula in diversi organi il Cd viene rilevato ad alte concentrazioni in molti organismi acquatici, pesci inclusi (Kay, 1985). Gli effetti deleteri (acuti e cronici) di questo metallo sono di tipo nefrotossico, immunotossico, citotossico e cancerogeno (Risso-de-Faverney et al., 2001; Giari et al., 2007). I principali organi bersaglio sono il rene, che ne rappresenta la sede principale (Thomas et al., 1983; Kuroshima, 1992; Thophon et al., 2003), il fegato (Sumet e Blust, 2001; Thophon et al., 2003; Rangsayatorn et al., 2004) e le branchie (Tao et al., 2000; Ramesh e Nagaranjan, 2007). Nei pesci il cadmio causa una serie di danni patologici a livello strutturale e morfologico nei diversi organi, e quelli renali, di vario grado e soprattutto a carico dei tubuli renali, si evidenziano in tutte le specie animali (Romeo et al., 2000; Shukla e Gautam, 2004; Vesey, 2010).

Precedenti studi (Ikeda et al., 1986) hanno mostrato che nella carpa l'esposizione al cadmio determina una riduzione dell'attività enzimatica della fosfatasi alcalina. In pesci d'acqua dolce l'accumulo di Cd porta ad un'alterazione dei comportamenti riproduttivi e fisiologici (Perera et al., 2015).

Gli effetti dannosi sul fegato dei pesci comprendono, a livello dei tessuti epatici, l'occlusione dei vasi sanguigni, la degenerazione vacuolare degli epatociti, la necrosi delle cellule pancreatiche (Dangre et al., 2010).

Alcuni studi hanno inoltre evidenziato che anche intestino e gonadi sembrano essere suscettibili, seppur in misura minore, agli effetti tossici del Cd (Singh et al., 2007; Kumar, 2007).

Piombo

Sebbene il Pb sia presente normalmente in tracce nel suolo, nell'ambiente e nell'acqua (Cheng e Hu, 2010), l'esposizione ad alte concentrazione causa alterazioni delle funzioni fisiologiche, comportamentali e biochimiche negli animali (Paul et al., 2014) con un'ampia gamma di effetti tossici anche fatali negli organismi acquatici a causa del bioaccumulo (Kim e Kang, 2015). Il piombo tende ad accumularsi facilmente grazie alla sua capacità di legare gli atomi di ossigeno e di zolfo nelle proteine formando complessi stabili (Verstraeten et al., 2008). Esso esercita effetti neurotossici provocando danni al sistema nervoso centrale (SNC) che implicano disfunzioni comportamentali e cognitive (Hsu e Guo, 2002; Zhu et al., 2016), al sistema ematopoietico (Dunier, 1996), al sistema cardiovascolare e ad organi nei quali tende ad accumularsi in modo significativo quali fegato, reni, milza, branchie e intestino (Patra et al., 2001; Grosell et al., 2006; Al-Balawi et al., 2013); Kim e Kang, 2015; Hwang et al., 2016). L'esposizione a lungo termine induce alterazioni nelle risposte immunitarie dei pesci (Small, 2004), provocando una

diminuzione dei linfociti e dei globuli bianchi dovuta alla secrezione di cortisolo causata dalla reazione di stress (Witeska, 2005).

Negli ultimi anni, l'assunzione di tale contaminante per ingestione da parte delle specie ittiche è fortemente diminuito grazie alle diverse misure preventive adottate a diversi livelli.

Cromo

Il cromo esavalente è considerato tossico (cancerogeno) a causa del suo potente potenziale ossidativo e capacità di attraversare le membrane cellulari (WHO, 1990; Eisler, 2000; Lushchak et al., 2009). Il Cr viene assimilato dai pesci per ingestione o per captazione attraverso le branchie e tende ad accumularsi nei tessuti del pesce, in particolare nel fegato, dove si riscontrano concentrazioni molto più elevate rispetto a quelle presenti nell'ambiente (WHO, 1990; Eisler, 2000; Lushchak et al., 2009; Pacheco et al., 2013). Gli effetti tossici di questo metallo nei pesci si esplicano in particolare a livello del fegato, reni e branchie, compromettendo seriamente le attività metaboliche (Nath e Kumar, 1987) e comportamentali (Vinodhini e Narayanan); essi includono alterazioni morfologiche, istologiche, ematologiche, inibizione dell'accrescimento e compromissione della funzione immunitaria (Reid, 2011; Vera-Candioti et al., 2011). Alterazioni istologiche a carico del fegato, delle branchie e degli organi riproduttivi sono stati evidenziati in un lavoro di Ackermann (2008) su *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) esposto a Cr subletale.

L'avvelenamento da cromo determina un'eccessiva secrezione di muco che può danneggiare l'epitelio branchiale causando la morte dei pesci per soffocamento (Benoit, 1976). Il rene, altro organo bersaglio del Cr (Palaniappan e Karthikeyan, 2009) viene gravemente danneggiato a livello tubulare e glomerulare (Mishra, Mohanty, 2009); gli effetti tossici possono determinare insufficienza renale con conseguente perdita della capacità osmoregolatoria e respiratoria dei pesci (Arillo e Melodio, 1988). Alti livelli di Cr nell'ambiente acquatico rende molto pericoloso il consumo delle specie ittiche che vi sono stati esposti.

Mercurio

Nei pesci il mercurio si accumula principalmente nel tessuto muscolare e circa il 90-99% del mercurio presente nei pesci si trova sotto forma di metilmercurio. Una volta all'intero nel corpo il mercurio si lega fortemente ai gruppi sulfidrilici (SH) delle proteine, questo fa sì che la sua eliminazione avvenga lentamente e richieda tempi lunghi (Maulvault et al., 2016; Chouvelon, 2018). L'esposizione a concentrazioni anche basse di mercurio possono determinare nei pesci cambiamenti fisiologici, morfologici genetici, biochimici e comportamentali (Huang et al., 2011); alcuni degli effetti tossici che ne derivano includono la riduzione della funzionalità epatica l'alterazione della capacità riproduttiva, deformità e danni alle branchie (O'Bryhim et al., 2017).

1.5. *I parametri ematologici ed ematochimici nei pesci*

Nei pesci i parametri ematologici ed ematochimici rappresentano importanti indici di laboratorio utili nella diagnosi di molte patologie e quindi per la valutazione dello stato di salute. Essi consentono infatti di evidenziare i cambiamenti fisiologici e patologici che si verificano in vari pesci, agendo così come biomarcatori aspecifici di inquinamento ambientale.

I pesci vivono in intimo contatto con l'ambiente acquatico e questo influenza in modo importante l'omeostasi ematica. In una recente review (Ahmed et al., 2020) vengono riportate le influenze indotte dalle variabili endogene ed esogene sui parametri ematici dei pesci; in particolare vengono trattati i fattori intrinseci (sesso, età, dimensioni corporee, maturità sessuale, stato nutrizionale e specie) ed estrinseci (temperatura, stress, stagioni, ossigeno disciolto, qualità dell'acqua, habitat, densità di allevamento, fotoperiodo, condizioni di campionamento, tecniche di laboratorio), che influiscono sui parametri ematologici nei pesci determinandone un'ampia variabilità.

Sesso

L'effetto del sesso su alcuni parametri ematologici è stato ben documentato in varie specie ittiche da numerosi studi precedenti (Orun et al., 2003; Mothlag et al., 2012; Golemi et al., 2013; Tang et al., 2015; Sheikh e Ahmed, 2016; Zhu et al., 2017); si è osservato infatti, che i parametri ematologici non solo variano tra i sessi in determinate stagioni ma variano

anche durante il ciclo stagionale insieme ad alcuni evidenti variazioni nei singoli parametri.

La letteratura in merito mostra che i parametri ematologici dei pesci maschi e femmine di una specie, nella maggior parte dei casi non seguono un andamento simile, e che valori ematologici più elevati si riscontrano nei maschi rispetto alle femmine, le quali invece mostrano generalmente un valore più alto di leucociti totali. I valori ematologici più elevati che si evidenziano nei maschi sono spesso da attribuire alla loro maggiore attività fisiologica e più alto tasso metabolico rispetto alle femmine (Rao et al., 1989). Il sesso non è ovviamente il solo fattore che determina variazioni nei parametri ematologici dei pesci ma è tuttavia uno dei fattori dominanti, pertanto, negli studi inerenti le specie ittiche deve essere considerato un fattore chiave.

Età

La presenza di *trend*, correlati all'età, dei parametri ematologici in varie specie di pesci, rappresenta attualmente un aspetto importante dei processi di crescita dallo stadio giovanile a quello adulto. Molti studi effettuati su numerose specie ittiche hanno dimostrato che i valori dei parametri ematologici risultano essere più elevati con l'aumentare della taglia e dell'età dei pesci (Ranzani-Paiva e Ishikawa, 1996; Hrubec et al., 2001; Jawad et al., 2004; Nascimento et al., 2016; Milad et al., 2017); infatti l'aumento dell'eritropoiesi con l'aumentare dell'età conduce ad un conseguente aumento dei valori dei parametri ematologici. Soltanto pochi autori riportano un trend opposto. Le

variazioni età dipendenti possono essere dovute anche a fattori non ambientali come il cibo e adattamenti metabolici.

Stagioni

I cambiamenti stagionali hanno un enorme impatto sulla maggior parte degli organismi viventi. Numerosi studi sono stati condotti per investigare le fluttuazioni stagionali dei parametri ematologici nei pesci, tali variazioni sono probabilmente influenzati da fattori interni ed esterni, quali il ciclo riproduttivo, la temperatura dell'acqua, l'ossigeno disciolto, il fotoperiodo e la disponibilità di cibo (Dawson, 1990). Molti aspetti come la riproduzione, il normale metabolismo, la distribuzione e la sopravvivenza sono principalmente dipendenti dalla temperatura (Shahjahan et al., 2013; Shahjahan et al., 2017), che a sua volta risulta essere fortemente influenzata dalle stagioni.

La letteratura in merito evidenzia che la maggior parte delle specie studiate mostra un aumento nei valori dei parametri ematologici in primavera e in estate e una diminuzione in autunno e inverno (De Pedro et al. 2005; Jeronimo et al., 2011; Vigliano et al., 2014; Sheikh e Ahmed, 2016; Sharma et al. 2017).

Insieme alle stagioni ci sono anche altri fattori che sono responsabili delle variazioni ematologiche. Elevate temperature ambientali riducono la concentrazione di ossigeno disciolto nell'acqua determinando un aumento dell'attività metabolica ed i pesci si adattano a questa condizione aumentando la quantità di emoglobina (Brix et al., 2004). Quindi, i valori ematologici più alti

riscontrati durante l'estate rappresentano un meccanismo per compensare l'effetto dell'alta temperatura che riduce la disponibilità di ossigeno. La stagionalità dunque controlla il ciclo vitale dei pesci, coordinando la loro attività riproduttiva ed influenzando il peso corporeo, l'approvvigionamento di cibo e l'attività locomotoria.

Abitudini alimentari

La salute dei pesci è principalmente dipendente dall'approvvigionamento di cibo. La quantità e la qualità del cibo assunto dai pesci varia con l'età, la taglia e le abitudini alimentari. Un'adeguata nutrizione rappresenta un requisito essenziale per mantenere un buono stato di salute dei pesci sia in ambiente naturale che nei sistemi di acquacoltura; garantire un giusto apporto di nutrienti è necessario per il mantenimento delle normali funzioni fisiologiche per la crescita e la riproduzione.

Precedenti studi hanno mostrato che variazioni nella formazione delle cellule ematiche e delle loro funzioni potrebbero essere causate da modificazioni della dieta (Greene e Selivonchick, 1990; Duncan et al., 1993; Wise et al., 1993). Un apporto insufficiente di vitamine determina alterazioni nelle funzioni biochimiche con conseguenti disfunzioni a livello cellulare e degli organi. Inoltre in diverse specie di pesci privati di un adeguato apporto vitaminico sono stati riscontrati modificazioni morfologiche funzionali (NRC, 1993).

Alcuni autori (Weimberg et al., 1976; Rios et al., 2005) hanno mostrato come la privazione di cibo alteri l'ematologia dei pesci. L'influenza del cibo sui parametri ematologici è stato riportato in alcuni studi che hanno evidenziato un aumento dei valori ematologici in relazione ad alterazioni nella dieta (Babalola et al., 2009; Firouzbakhsh et al., 2011; Demska-Zakęs et al., 2012).

Stress

Con il termine di “stress” viene indicato uno stato in cui la stabilità interna un organismo o omeostasi viene alterato da stimoli intrinseci o estrinseci detti “fattori di stress” (Wendelaar Bonga, 1997). La risposta di un organismo a condizioni di stress varia da specie a specie e dipende dalla capacità di adattamento all'ambiente circostante. Le condizioni di stress possono essere valutate attraverso le medie dei parametri ematologici (Fernandez e Mazon, 2003).

Lo stress è un importante fattore che influenza vari parametri ematologici e fisiologici nei pesci (Beyea et al., 2005). L'ambiente acquatico spesso rende i pesci esposti a stress, che ha ripercussioni oltre che sulla fisiologia anche sulla riproduzione, lo sviluppo e la capacità immunitaria (Pickering, 1993). Durante lo stress la secrezione di cortisolo riduce la durata di vita dei linfociti promuovendone l'apoptosi (Verburg van Kemenade et al., 1999) che causa alterazioni nel numero delle cellule. Sotto condizioni di stress molto spesso i linfociti circolanti si riducono di numero probabilmente anche a causa della distribuzione tra gli organi e dell'attività linfopoietica (Prado et al., 2015).

1.6. Valutazione ematologica nei pesci

Negli ultimi anni le indagini ematologiche nei pesci hanno assunto notevole importanza e destato enorme interesse non soltanto nelle specie allevate in acquacoltura, ma anche in ambito di valutazione dei teleostei quali organismi sensibili al carico inquinante antropico e quindi del biomonitoraggio ambientale.

Nei pesci l'esame emocromocitometrico o emocromo o emogramma o CBC (Complete Blood Count), è un esame di laboratorio completo del sangue, che contiene tutte le informazioni necessarie per la valutazione dell'ematopoiesi.

La possibilità di eseguire una valutazione emocromocitometrica automatizzata nei pesci non è una procedura semplice da applicare a causa di una caratteristica ematologica peculiare che caratterizza questa specie animale. I pesci, infatti, a differenza dei mammiferi, sono provvisti di globuli rossi nucleati che interferiscono con la normale lettura automatizzata. Pertanto, attualmente è possibile effettuare un esame emocromocitometrico nei pesci, utilizzando il metodo manuale che attraverso l'utilizzo di camere contaglobuli ci permette di valutare il numero delle cellule del sangue (RBC, WBC e TC) e ottenere altri parametri eritrocitari diretti con differenti metodi, quali la spettrofotometria per Hb e il microematocrito per Hct. Tuttavia, il sistema automatizzato è stato recentemente utilizzato nei pesci (Fazio, 2019) grazie a particolari modifiche (riguardanti il software e la soluzione lisante) del

contaglobuli automatizzato utilizzato per i mammiferi. La valutazione ematologica automatizzata applicata alle specie ittiche, ci permette di analizzare la conta delle tre popolazioni cellulari (globuli rossi RBC, globuli bianchi WBC e trombociti TC), la concentrazione dell'emoglobina Hb, il valore ematocrito (Hct) e gli indici eritrocitari indiretti (volume corpuscolare medio MCV, emoglobina corpuscolare media MCH concentrazione dell'emoglobina corpuscolare media MCHC). Nel dettaglio sono elencati i parametri valutati:

-Serie rossa:

- RBC (Red Blood Cells), numero di globuli rossi o conta eritrocitaria, espressa comunemente in milioni di cellule per microlitro di sangue intero (M / μL , ovvero 10^6 cellule / μL), mentre le unità di misura internazionali sono 10^{12} cellule / L.

La formula di conversione all'unità di misura internazionale è 1:1 (ad esempio: $1 \times 10^6 / \mu\text{L} = 1 \times 10^{12} / \text{L}$).

Questo valore viene direttamente misurato dai moderni analizzatori ematologici automatici a impedenza elettrica o a citometria a flusso laser.

- Hb (emoglobina), concentrazione emoglobinica, riportata generalmente in g / dL, grammi di emoglobina per decilitro di sangue; nel SI l'unità di misura è g / L, grammi di emoglobina per litro.

La formula di conversione all'unità di misura internazionale è la seguente:

$$\text{g / dL} \times 10 = \text{g / L} \quad (1 \text{ g / dL} = 10 \text{ g / L})$$

Nella maggior parte delle specie, in condizioni di normalità la concentrazione emoglobinica è approssimativamente 1 / 3 dell'ematocrito.

- Hct (ematocrito), percentuale del volume di sangue che è occupata dagli eritrociti.

Viene espresso come % (volume degli eritrociti in %) o L / L nel SI (volume degli eritrociti in L / L). La formula di conversione è la seguente:

$$\% \div 100 = \text{L / L}$$

L'ematocrito è un valore che viene calcolato dai moderni analizzatori ematologici automatici come prodotto del volume cellulare medio dei globuli rossi (MCV) e il numero dei globuli rossi (RBC), entrambi misurati direttamente dall'analizzatore automatico. Pertanto, se ci dovessero essere delle imprecisioni nella misurazione dei valori di MCV o RBC, l'ematocrito rifletterà tali imprecisioni.

La formula utilizzata per calcolare l'Hct è la seguente:

$$\text{Hct} = (\text{MCV} \times \text{RBC}) \div 10$$

Anche se il termine PCV (Packed Cell Volume) è spesso utilizzato come sinonimo di Hct, in realtà questi due valori rappresentano due modi diversi per calcolare la porzione del volume di sangue occupata dagli eritrociti. Il PCV è un valore non calcolato, ma direttamente misurato centrifugando il sangue in un capillare da microematocrito. Bisogna dunque ricordare che, tutto ciò che

determina un falso aumento o una diminuzione di MCV (come ad esempio l'invecchiamento del campione da stoccaggio prolungato, che può provocare un rigonfiamento in vitro degli eritrociti, con un conseguente aumento di MCV) o del valore di RBC (ad esempio diminuzione RBC da emolisi) influenzerà il valore di Hct ma non necessariamente quello del PCV.

- MCV (Mean Corpuscular Volume), volume corpuscolare medio o dimensioni medie dei globuli rossi in Femtolitri (fL; 10-15 litri).

Indica il volume medio degli eritrociti e tradizionalmente può essere calcolato moltiplicando il PCV (misura della colonna di RBC ottenuta per centrifugazione del campione tramite microcentrifuga) per 10 e dividendo per il numero degli eritrociti (in milioni per microlitro), secondo la seguente formula:

$$\text{MCV} = (\text{PCV} \div \text{RBC}) \times 10$$

I moderni analizzatori ematologici basati sul principio della flussocitometria e dell'impedenza elettrica forniscono invece una misura diretta e più accurata di questo parametro. I contacellule automatici basati sulla citometria a flusso misurano il reale volume dei globuli rossi quando passano attraverso il flusso laser. Il contaglobuli a impedenza elettrica invece, registra l'ampiezza di ciascun impulso, che è proporzionale al volume cellulare e dividendo la somma dei volumi individuali delle emazie per il loro numero si ottiene un MCV medio.

- MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin), contenuto cellulare medio di emoglobina (quantità media di emoglobina in ogni globulo rosso),

espresso in pg (Picogrammi). È un valore calcolato che si ottiene moltiplicando il valore dell'Hb per 10, diviso il numero di eritrociti espressi in milioni / microlitro, secondo la formula:

$$\text{MCH} = (\text{Hb} \div \text{RBC count}) \times 10$$

- MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), concentrazione media di emoglobina intraeritrocitaria,

espressa convenzionalmente in g / dL o g / L secondo il SI. La formula di conversione è la seguente: g / dL x 10 = g / L

Questo parametro è generalmente calcolato moltiplicando il valore dell'Hb per 100 diviso il valore di Hct o del PCV in %, secondo la formula seguente: $\text{MCHC (g / dL)} = \text{Hb} \div \text{Hct / PCV} \times 100$

Questo parametro dà una stima della concentrazione emoglobinica della massa eritrocitaria circolante. Indica se i globuli rossi, a seconda della loro grandezza, contengono tanta o poca emoglobina

-Serie bianca:

- WBC (White Blood Cells) o conta leucocitaria totale, numero di leucociti o globuli bianchi per microlitro di sangue.

Questo parametro viene espresso comunemente come migliaia di cellule per microlitro (K / μL , ovvero 10^3 cellule / μL), mentre l'unità di misura internazionale è 10^9 cellule / L, con la seguente formula di conversione:

$$1 \times 10^3 / \mu\text{L} = 1 \times 10^9 / \text{L}$$

- TC (Trombociti), numero di trombociti per microlitro di sangue, espresso come migliaia di cellule per microlitro di sangue (K / μL , ovvero 10^3 cellule/ μL), mentre l'unità di misura internazionale è 10^9 cellule / L

Per la valutazione ematologica l'anticoagulante preferenziale è specie specifico. Sebbene l'eparina sembri essere il più comunemente utilizzato (Hrubec e Smith, 2010), il litio eparina risulta essere l'anticoagulante con minore rischio di formazione di artefatti nei campioni di sangue, il sodio eparina altera la composizione ionica plasmatica mentre l'EDTA modifica la morfologia dei globuli rossi ed interferisce con l'anestetico (MS-222) comunemente utilizzato per anestetizzare i pesci (Douglas et al., 2010). Tuttavia alcuni autori (Faggio et al., 2013) asseriscono che l'EDTA sia di grande affidabilità per le analisi ematologiche nei pesci.

I valori dei parametri ematologici forniscono utili informazioni in vari processi dell'organismo e rivestono notevole importanza a causa del crescente interesse sulla piscicoltura e della consapevolezza degli effetti dannosi dell'inquinamento antropico sugli ambienti acquatici.

Le analisi ematologiche rappresentano un metodo veloce, poco costoso e pratico, utile nell'identificazione di patologie nei pesci (Satake et al., 2009), infatti sono utilizzate per fornire informazioni sulla salute e lo stato fisiologico dei pesci, le condizioni alimentari e la qualità dell'acqua in cui essi vivono (Fazio et al., 2013; Fazio, 2019).

Oltre ai parametri ematologici, i parametri ematochimici nei pesci sono anch'essi indici sensibili nel monitoraggio ambientale ed assumono una notevole rilevanza scientifica come *blood biomarkers*. Tra i parametri ematochimici, quelli legati alla funzionalità epatica come le transaminasi (AST, ALT), l'ALP e l'LDH, rappresentano importanti indici di valutazione del danno tissutale che alcune sostanze presenti nell'ambiente acquatico possono determinare in specie sentinelle esposte a potenziali carichi inquinanti antropici (Oruc e Uner, 2002). Partendo dalla conoscenza dei reali "range di riferimento" delle specie ittiche campionate, è interessante valutare e correlare come il differente bioaccumulo di sostanze nocive e di alcuni metalli pesanti evochi una risposta biochimica da "danno epatico" quale principale organo bersaglio del carico antropico.

1.7. I "blood biomarkers" dei pesci nella risposta all'inquinamento da metalli pesanti

La necessità di sviluppare metodi monitoraggio ambientale sempre più efficienti, al fine di valutare la qualità delle acque e mettere a punto delle

strategie mirate alla conservazione ed al ripristino dell'ecosistema, ha condotto allo studio di nuovi indicatori biologici di inquinamento: i cosiddetti *biomarkers*.

I *biomarkers* sono parametri che consentono di rilevare variazioni fisiologiche e biologiche cellulari dovute all'esposizione a sostanze tossiche, tramite analisi effettuate su tessuti, fluidi biologici o a livello dell'intero organismo. A tal proposito il profilo ematologico ed ematochimico nei pesci è risultato un indice sensibile per la valutazione del metabolismo e quindi delle condizioni di salute dei pesci sottoposti a stress "metallico". Infatti, l'esposizione al carico antropico di alcuni metalli pesanti nei teleostei innesca una serie di meccanismi protettivi a livello ematologico ed ematochimico, che si riflettono in variazioni dei parametri del sangue che tendono a riportare l'organismo ad uno stato d'omeostasi.

Quindi, l'inquinamento dell'ambiente acquatico, può essere valutato mediante l'esame di modificazioni di alcuni parametri ematologici e biochimici che riflettono gli effetti dei contaminanti sugli organismi esposti a tali sostanze (McCarty e Shugart, 1990). A tal proposito, ad esempio, l'aumento o la diminuzione dell'attività di alcuni enzimi che sono importanti marcatori patologici (aspartato aminotransferasi, AST; alanina aminotransferasi, ALT; fosfatasi alcalina, ALP; lattico deidrogenasi, LDH) dà un'indicazione di lesioni tissutali, stress ambientali o malattie (Kori-Siakpere et al., 2012). Essi sono ampiamente usati per valutare le risposte dell'organismo e dell'alterazione

dell'omeostasi epatica alle esposizioni ambientali di sostanze tossiche e inquinanti (Zutshi et al., 2010; Javed e Usmani, 2012; Hanan et al., 2013).

Studi precedenti su diverse specie ittiche, infatti, hanno evidenziato una marcata variazione dei parametri ematologici ed ematochimici dovuta all'esposizione a Cd, Pb, Cr e Hg (Mahmoud et al., 2013; Bujjamma e Padmavathi, 2018; Islam et al., 2020).

L'utilizzo dei *biomarkers* apporta alcuni importanti vantaggi, tra i quali il fatto di ottenere una risposta integrata dell'organismo alle interazioni dei diversi effetti tossici derivanti dall'esposizione alla miscela di più inquinanti; inoltre consentono di avere una risposta immediata dell'organismo all'effetto della sostanza tossica utile prevederne gli effetti a lungo termine. Essi quindi, risultano estremamente utili nel risolvere la problematica legata al bioaccumulo degli inquinanti negli organismi acquatici esposti.

1.8 Scopo della tesi

La presente ricerca si prefigge un triplice scopo:

- 1) Valutare in una specie "sentinella" quale il cefalo striato *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) campionato in tre differenti siti del Lago di Faro, esposto ad un possibile carico antropico da metalli pesanti, la capacità di bioaccumulo in diversi organi e tessuti.
- 2) Determinare le variazioni stagionali nella concentrazione di alcuni metalli pesanti (cadmio, Cd; piombo, Pb; cromo, Cr; mercurio, Hg) in

differenti tessuti (muscolo, branchie, fegato, stomaco, intestino) di questa specie.

- 3) Valutare la risposta ematologica ed ematochimica nel *Mugil cephalus* in relazione al differente bioaccumulo dei metalli nelle diverse stagioni, al fine di identificare possibili “*blood biomarkers*” utili al biomonitoraggio dell’ambiente acquatico esposto al carico antropico da metalli pesanti.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Area di studio

La presente ricerca sul biomonitoraggio delle acque relativo all’inquinamento da metalli pesanti è stata condotta nel Lago di Faro. Questo bacino fa parte della Riserva Naturale Orientata di Capo Peloro (istituita dalla Regione Sicilia nel 2001), un complesso costiero situato nella punta estrema della Sicilia nord orientale, facente parte del Comune di Messina e che si affaccia sullo Stretto (Figura 2) (Capillo et al., 2018a, b; Spinelli et al., 2018).



Figura 2. Sistema lagunare di Capo Peloro. Torre Faro. Stretto di Messina.
Sulla sinistra il Lago di Faro (o Pantano Piccolo) e sulla destra il Lago di
Ganzirri (o Pantano Grande).

Si tratta di un sistema lagunare formatosi in seguito all'azione del moto ondoso e delle correnti di marea che hanno racchiuso un ampio tratto di mare; in seguito al continuo trasporto di detriti ha portato all'insabbiamento di parte della laguna e alla sua divisione in più parti fino al raggiungimento della conformazione attuale costituita da due piccoli specchi lacustri di acqua salmastra: il Lago di Faro (detto anche Pantano piccolo) e il Lago di Ganzirri (Pantano grande), che risultano essere collegati tra di loro e direttamente al

mare grazie alla presenza di alcuni canali. Il canale di Margi unisce i due laghi mentre il Canale degli Inglese, Faro, Due torri e Catuso mettono in collegamento i Pantani con i mari Ionio e Tirreno.

I due laghi rappresentano degli ecosistemi molto interessanti per la loro elevata biodiversità e per essere degli ambienti di transizione in equilibrio dinamico con l'ecosistema marino; inoltre, anche per le attività ricreative, lavorative e commerciali che in essi vengono svolte sono stati dichiarati beni di interesse etno-antropologico, e di conseguenza, sottoposti a tutela. Tuttavia, purtroppo, i due bacini sono soggetti all'accumulo di sostanze tossiche derivanti sia da fonti naturali che da diverse attività antropiche (scarichi fognari, abusi edilizi, utilizzo di fertilizzanti etc.) (Manganaro et al., 2011) che ne alterano le caratteristiche, pregiudicandone l'equilibrio biologico, infatti gli inquinanti tendono a concentrarsi facilmente a causa del basso scambio d'acqua presente nei due stagni (Maisano et al., 2016; Capillo et al., 2018b, c).

Il Lago di Faro ($38^{\circ}15'58,86''$ N e $15^{\circ}39'11,11''$ E) che è il lago più piccolo ma più profondo, ha forma quasi circolare, con una superficie di circa 263.600 m^2 , un volume di $2.502.856 \text{ m}^3$, diametro di circa 660 m e profondità massima di 28 (Figura 3).



Figura 3. Lago di Faro.

Si tratta di un ambiente stratificato (bacino meromittico) (Bottari et al., 2009) caratterizzato dalla presenza di idrogeno solforato (H_2S) nello strato più profondo dopo i 12 m di profondità (ipolimnio), dovuto a batteri sulfurei fototrofi *Desulfuvibrio desulfuricans* che si trovano in uno strato di acqua brunastra a 10 m di profondità (chemocline) (Manganaro et al., 2009). Il lago in comunicazione con il Mar Tirreno attraverso il Canale degli Inglese mentre con lo Stretto di Messina attraverso il Canale Faro o “Canalone”.

La fauna del lago di Faro è molto varia, vi si annoverano i Mugilidi quali il cefalo (*Mugil cephalus*), la spigola (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758),

l'orata (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758), e l'anguilla (*Anguilla anguilla*, Linnaeus 1758). La molluschicoltura, cioè la coltivazione di molluschi quali cozze (mitilicoltura) e telline o vongole (tellinicoltura) rappresenta l'unica attività consentita nel Lago di Faro, dove si riscontra, tra l'altro, anche la presenza di esemplari di *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758) che è il mollusco bivalve più grande di tutto il Mar Mediterraneo.

Per il biomonitoraggio delle acque del Lago di Faro è stato utilizzato come organismo bioindicatore il cefalo striato o muggine *Mugil Cephalus* (Linnaeus, 1758) in quanto specie ampiamente presente nel bacino oggetto di studio.

2.2. *Periodo di campionamento*

I campionamenti sono stati effettuati tra Ottobre 2018 e Giugno 2019, uno per ciascuna stagione, nei mesi di Ottobre (campionamento autunnale), Gennaio (campionamento invernale), Aprile (campionamento primaverile) e Giugno (campionamento estivo).

2.3. *Disegno sperimentale*

Il nostro studio è stato condotto su un totale di 80 esemplari di *M. cephalus* (20 per ciascuna stagione) che sono stati catturati utilizzando delle reti di fondo nel lago di Faro, da 3 siti scelti casualmente, indicati con F1, F2 e F3 e distanti circa 3 m l'uno dall'altro (Figura 4).

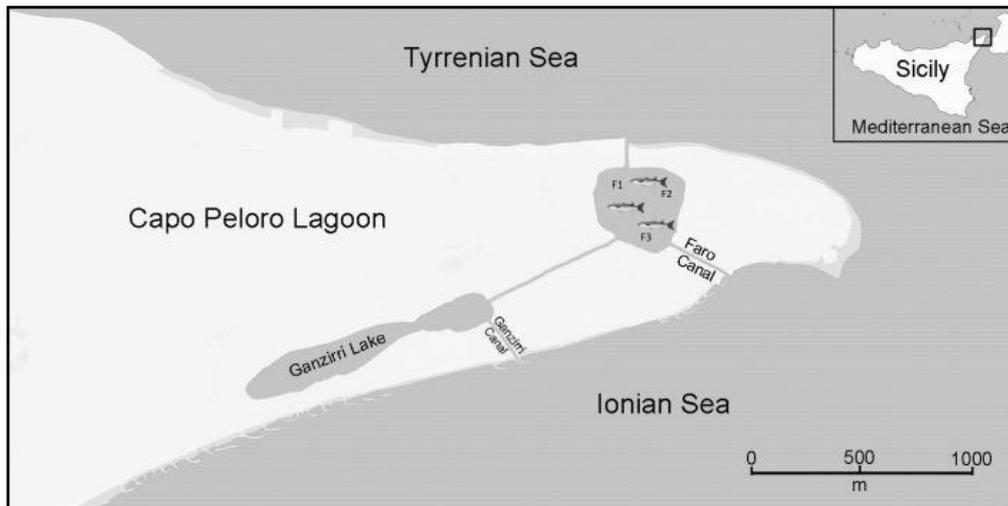


Figura 4. Lago di Faro, Sicilia. F1, F2, F3 indicano le tre stazioni di prelievo.

Tutti i pesci dopo la cattura sono stati sottoposti ad un esame esterno al fine di evidenziare l'eventuale presenza di anomalie o infestazioni, in seguito al quale sono stati indicati clinicamente sani. Immediatamente dopo, gli esemplari sono stati trasferiti, all'interno di vasche munite di un aeratore e riempite con 500 litri acqua filtrata proveniente dallo stesso sito di prelievo, al laboratorio del Centro Sperimentale di Patologia Ittica della Sicilia, presso l'Università degli Studi di Messina. Prima di effettuare il prelievo di sangue i pesci sono stati anestetizzati con MS-222 alla concentrazione di 0.3 g / L di acqua.

2.4. *Prelievo di sangue*

I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena caudale mediante puntura venosa utilizzando una siringa sterile di plastica da 2.5 mL (Figura 5) e

trasferiti in due differenti tipi di provette: un tipo (Miniplast 0.6 mL; LP Italiana Spa, Milano) contenente EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) (ratio 1.26 mg / 0.6 mL) come agente anticoagulante per la determinazione del profilo ematologico e l'altro (Vacutest Kima Srl, Italia) senza anticoagulante per la determinazione dei parametri biochimici.

Le analisi ematologiche sono state eseguite immediatamente dopo il prelievo di sangue ed entro 4 ore; i campioni senza EDTA sono stati centrifugati a 3000 rpm per 10 min ed il siero così ottenuto è stato congelato a -20 °C per le successive analisi ematochimiche. Tutte le analisi sono state eseguite in triplicato dallo stesso operatore e con lo stesso strumento e non sono state riscontrate differenze significative tra le tre misure.



Figura 5. Prelievo di sangue dalla vena caudale mediante puntura venosa in un esemplare di *Mugil Cephalus* anestetizzato

2.5. *Indici biometrici*

Immediatamente dopo il prelievo di sangue, sono stati misurati gli indici biometrici (peso, lunghezza alla forca, lunghezza totale) di ciascun pesce; a tal fine sono stati utilizzati rispettivamente una bilancia (Kern 440-49 N, Germania) e un ittiometro (Scubla SNC, 600 mm, Italia). Al termine delle misurazioni i pesci sono stati sacrificati e congelati a -20 °C.

2.6. *Analisi ematologiche*

Per la determinazione dei parametri ematologici (globuli bianchi, WBC; globuli rossi, RBC; ematocrito, Hct; concentrazione dell'emoglobina, Hb; volume corpuscolare medio, MCV; contenuto corpuscolare medio di emoglobina, MCH; concentrazione corpuscolare media di emoglobina, MCHC; conta dei trombociti, TC) è stato utilizzato un sistema automatizzato che consiste di un conta globuli elettronico (HecoVet, SEAC, Firenze, Italia) già utilizzato in ambito veterinario per i mammiferi, e opportunamente modificato nel software al fine di effettuare le analisi ematologiche nelle specie ittiche (Figura 6a, b).



Figura 6a. Contaglobuli elettronico (HecoVet, SEAC, Firenze, Italia).

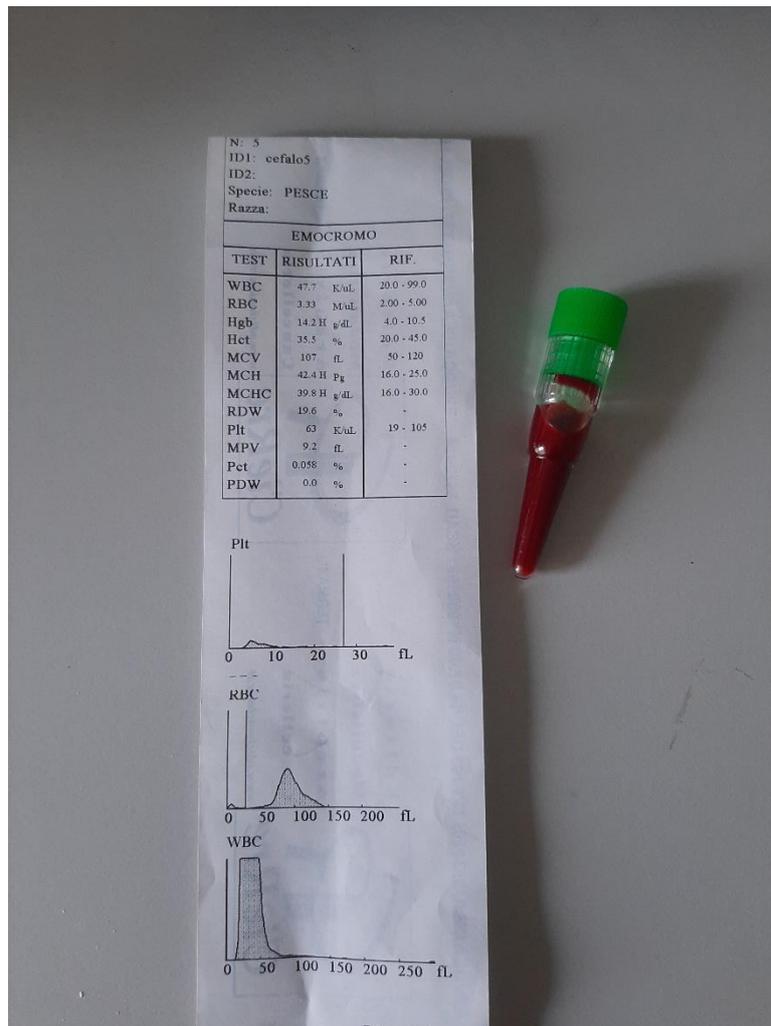


Figura 6b. Prelievo di sangue di *Mugil cephalus* in Miniplast con EDTA ed esame emocromocitometrico.

Attraverso una specifica soluzione lisante per pesci (SEAC code 71010460), lo strumento, grazie alla modifica del software di lettura, è in grado di effettuare la determinazione quantitativa degli elementi figurati del sangue nei pesci. Questa tecnica innovativa è stata utilizzata per la prima volta per la

valutazione ematologica dell'orata *Sparus aurata* (Fazio et al., 2012a) e successivamente è stata applicata in altre specie ittiche compreso il *Mugil cephalus* (Fazio et al., 2012b; Filiciotto et al., 2012; Fazio et al., 2013; Fazio et al., 2019a, b; Fazio et al., 2020a, b).

2.7. *Analisi ematochimiche*

Le determinazioni ematochimiche, eseguite su siero, sono state le seguenti: aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT), fosfatasi alcalina (ALP) e lattico deidrogenasi (LDH) e sono state determinate usando dei kit commerciali (Biosystems S.A., Barcelona) e uno spettrofotometro UV (Slim, SEAC, Florence, Italy).

Tutte le procedure sperimentali erano effettuate in conformità alla normativa europea in materia di protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (Direttiva Europea 2010/63). Codice del comitato etico CISS 017 / 2017.

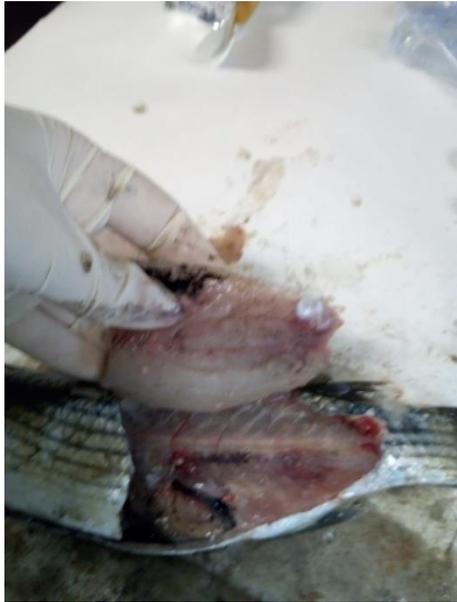
2.8 *Analisi dei metalli pesanti nei tessuti*

Per la valutazione della quantità di metalli pesanti (Cd, Pb, Cr, Hg) nei tessuti, i pesci sono stati scongelati e sezionati utilizzando strumenti sterili in plastica al fine di evitare qualsiasi contaminazioni durante la manipolazione del campione (Figura 7).



Figura 7. Esemplare di *Mugil cehalus* (Linnaeus, 1758) sezionato per il prelievo degli organi

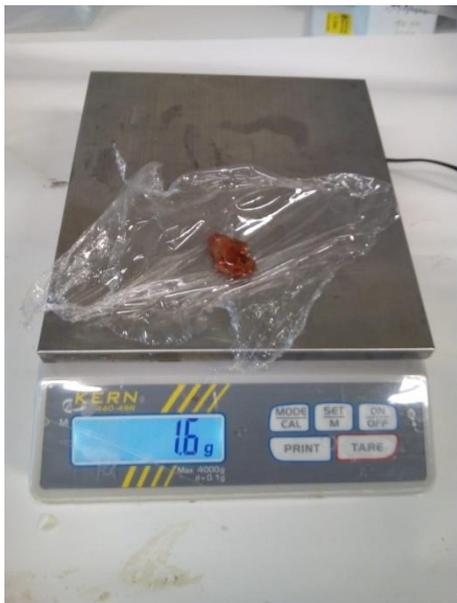
Si è poi proceduto all'asportazione degli organi (branchie, fegato, stomaco e intestino) che sono stati poi pesati mediante una bilancia analitica (Figura 8a, b, c, d). Sono stati quindi prelevati porzioni di tessuto muscolare e degli organi asportati.



a)



b)



c)



d)

Figura 8. Muscolo (a), branchie (b), fegato (c) e intestino (d) di *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758).

La determinazione dei metalli pesanti nei campioni di tessuto è stata eseguita mediante estrazione assistita con microonde (MAE) seguita da spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente o ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry).

Nello specifico, una porzione di circa 0.5 g di ciascun tessuto è stata pesata con una bilancia analitica e considerata per l'analisi (Fazio et al., 2014).

A ciascun campione sono stati aggiunti 5 ml di acido nitrico HNO₃ al 65% (Suprapur) e 1mL di acido cloridrico HCl al 37% (Suprapur). Successivamente, ciascun tessuto in soluzione è stato digerito mediante un sistema di digestione a microonde (Multiwave 3000, Anton Paar) in recipienti in PTFE (Politetrafluoroetilene). Dopo raffreddamento fino a temperatura ambiente, i campioni digeriti sono stati diluiti con acqua Milli-Q (ultrapura) fino a un volume finale di 50 ml e conservati in frigo a 4 ° C. La stessa procedura di digestione è stata applicata ai bianchi analitici. Ciascuno campione mineralizzato è stato poi analizzato in triplicato insieme ai bianchi mediante ICP-MS (EPA 200.8.1994).

Ai fini della determinazione quantitativa sono state costruite due curve di calibrazione con 5 punti per ogni elemento ($r^2 > 0.9800$). La concentrazione dell'analita C_c (cioè Cd, Pb, Cr o Hg in mg / kg) è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$C_c = (C_s \times V / 1000 \times p \times R) D;$$

C_s = concentrazione dell'analita nella soluzione (mg / L)

calcolato nell'adattamento lineare,

V = volume (mL) della soluzione campione,

P = peso del campione (g),

D = fattore di diluizione e

R = media di recupero,

Per controllare le prestazioni strumentali, una soluzione da 200 µg / L di Erblio è stata utilizzata come standard interno, in un intervallo di confidenza tra il 70% e il 120% per il recupero.

2.9. *Analisi dell'acqua e del sedimento*

Per ciascuno dei tre siti di prelievo del Lago di Faro sono state misurate le caratteristiche chimico-fisiche (temperatura, salinità, pH e ossigeno disciolto) dell'acqua utilizzando una sonda multiparametrica (YSI 85 System) (Tabella 1), e il contenuto in metalli pesanti (Cd, Pb, Cr, Hg) di acqua e sedimenti (Tabella 2).

Tabella 1. Variazioni stagionali dei parametri chimico-fisici dell'acqua nel Lago di Faro.

Parametri	Stagioni			
	<i>Autunno</i>	<i>Inverno</i>	<i>Primavera</i>	<i>Estate</i>
Temperatura (°C)	18	15.7	17.4	22.7
Salinità (‰)	33	30.2	32.1	34.3
pH	8.97	8.43	8.67	8.56
O₂ (Saturazione %)	108	116	120	104

Tabella 2. Variazioni stagionali delle concentrazioni dei metalli pesanti nell'acqua (media) e nel sedimento (media \pm standard) del Lago di Faro.

Acqua Lago di Faro				
Metalli pesanti	<i>Autunno</i>	<i>Inverno</i>	<i>Primavera</i>	<i>Estate</i>
Cadmio ($\mu\text{g} / \text{L}$)	< 1	< 1	< 1	< 1
Piombo ($\mu\text{g} / \text{L}$)	< 1	< 1	< 1	< 1
Cromo ($\mu\text{g} / \text{L}$)	< 1	< 1	< 1	< 1
Mercurio ($\mu\text{g} / \text{L}$)	< 1	< 1	< 1	< 1
Sedimento Lago di Faro				
Metalli pesanti	<i>Autunno</i>	<i>Inverno</i>	<i>Primavera</i>	<i>Estate</i>
Cadmio (mg / kg)	2.40 \pm 0.10	2.50 \pm 0.10	2.50 \pm 0.10	2.40 \pm 0.10
Piombo (mg / kg)	2.70 \pm 0.10	2.70 \pm 0.10	3.77 \pm 0.06	3.70 \pm 0.10
Cromo (mg / kg)	5.67 \pm 0.06	5.50 \pm 0.10	4.33 \pm 0.81	4.47 \pm 0.06
Mercurio (mg / kg)	5.37 \pm 0.06	5.27 \pm 0.06	5.23 \pm 0.06	5.27 \pm 0.06

I campioni di acqua nei tre punti di prelievo (Figura 3) sono stati prelevati nello stesso giorno ad una profondità di circa 3 m dalla superficie del lago utilizzando bottiglie Niskin (General Oceanics, Inc., Miami, Florida) e poi trasportati in laboratorio a temperatura ambiente.

I campioni di sedimento sono stati conservati in contenitori di vetro, congelati con pacchetti di ghiaccio e trasportati al laboratorio.

I campioni di acqua e sedimento sono state effettuate le analisi per la valutazione dei metalli pesanti mediante ICP-MS. A tal fine i campioni (500 mg in peso secco di sedimento e 1 L di acqua) sono stati sottoposti a digestione con acido nitrico e cloridrico in contenitori PTFE. La procedura di mineralizzazione è stata la stessa eseguita per l'analisi dei tessuti. Ciascun campione mineralizzato è stato successivamente sottoposto a ICP-MS (EPA 200.8.1994).

3. ANALISI STATISTICA

Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato dallo stesso operatore e non sono state riscontrate differenze significative tra le tre misurazioni. Prima dell'analisi statistica, tutti i dati ottenuti sono stati testati per la normalità utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov, in base al quale sono risultati normalmente distribuiti ($P < 0.05$).

Per determinare le variazioni, tra le diverse stagioni, dei parametri ematologici ed ematochimici e delle concentrazioni dei metalli pesanti nel tessuto e negli organi dei pesci studiati è stata applicata l'analisi della varianza (ANOVA) ad una via, seguita dal test comparativo post hoc di Duncan.

Il livello di significatività è stato fissato a < 0.05 . Tutti i risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard. I dati sono stati analizzati utilizzando il programma software statistico Prism v.7.00 (Graphpad Software Ltd., USA, 2003).

4. RISULTATI

4.1. *Acqua e sedimento*

In Tabella 1 sono riportate le variazioni stagionali dei parametri chimico-fisici dell'acqua nel Lago di Faro. La Tabella 2 mostra le variazioni stagionali delle concentrazioni dei metalli pesanti nell'acqua e nel sedimento del Lago di

Faro espresse come media \pm deviazione standard. Tali variazioni non sono risultate statisticamente significative tra una stagione e l'altra.

4.2. Indici biometrici

Anche le caratteristiche biometriche (peso, lunghezza alla forca e lunghezza totale) dei pesci non hanno esibito differenze significative tra gli esemplari di *M. cephalus* campionati nell'area di studio nelle diverse stagioni. (Tabella 3).

Tabella 3. Variazioni stagionali (media \pm deviazione) standard degli indici biometrici di *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) campionato nel Lago di Faro.

Parametri Biometrici	Stagioni			
	Autunno	Inverno	Primavera	Estate
Peso (Kg)	92.12 \pm 14.80	94.00 \pm 23.64	93.56 \pm 5.42	94.30 \pm 18.44
Lunghezza totale (cm)	23.61 \pm 3.16	24.20 \pm 4.97	23.95 \pm 2.54	24.56 \pm 2.56
Lunghezza alla forca (cm)	18.79 \pm 1.41	19.30 \pm 3.39	19.84 \pm 2.36	19.54 \pm 2.40

4.3. Parametri ematologici ed ematochimici

In questo studio i parametri ematologici (WBC, RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, TC) ed ematochimici (AST, ALT, ALP, LDH) valutati hanno mostrato variazioni statisticamente significative tra le varie stagioni (Tabelle 4 e 5) contestualmente alle concentrazioni dei metalli pesanti.

Per quanto riguarda i parametri ematologici i valori di WBC ($\times 10^3 / \mu\text{L}$) variavano da 36.75 a 45.68, di RBC ($\times 10^6 / \mu\text{L}$) da 2.71 a 3.42, di Hb (g / dL) da 11.30 a 13.28, di Hct (%) da 27.72 a 36.85, di MCV(fL) da 104.00 a 110.80, di MCH (Pg) da 33.58 a 44.39, di MCHC (%) da 32.31 a 43.12, di TC ($\times 10^3 / \mu\text{L}$) da 57.00 a 79.95.

In estate si sono registrati i valori più alti di WBC, MCH, MCHC e TC mentre in autunno di RBC; Hb; Hct, MCV. I valori più bassi sono stati riscontrati in inverno per Hb, MCV, MCH, MCHC, in estate per RBC e Hct, e in autunno per WBC e TC (Tabella 4).

Tabella 4. Variazioni stagionali (media \pm deviazione standard) dei parametri ematologici di *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) campionato nel Lago di Faro. All'interno di ciascun parametro le medie con lo stesso carattere alfabetico in apice non rappresentano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

Parametri	Stagioni			
	Autunno	Inverno	Primavera	Estate
WBC ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	36.75 \pm 3.02 ^a	40.80 \pm 5.24 ^b	42.00 \pm 1.46 ^b	45.68 \pm 6.54 ^b
RBC ($\times 10^6 / \mu\text{L}$)	3.36 \pm 0.42 ^a	3.42 \pm 0.42 ^a	3.33 \pm 0.84 ^a	2.71 \pm 0.42 ^b
Hb (g / dL)	13.28 \pm 1.07 ^a	11.30 \pm 0.95 ^b	12.54 \pm 0.57 ^a	12.12 \pm 2.11 ^a
Hct (%)	36.85 \pm 3.31 ^a	35.08 \pm 2.33 ^{a,b}	33.54 \pm 0.85 ^b	27.72 \pm 1.85 ^c
MCV (fL)	110.80 \pm 12.72 ^a	104.00 \pm 13.69 ^a	105.40 \pm 21.01 ^a	104.60 \pm 17.18 ^a
MCH (Pg)	39.99 \pm 5.05 ^a	33.58 \pm 5.22 ^b	39.35 \pm 8.02 ^{a,b}	44.39 \pm 10.04 ^a
MCHC (%)	36.15 \pm 2.87 ^a	32.31 \pm 2.83 ^b	37.43 \pm 2.24 ^{a,c}	43.12 \pm 8.83 ^c
TC ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	57.00 \pm 6.46 ^a	60.80 \pm 7.82 ^a	73.30 \pm 7.95 ^b	79.95 \pm 8.96 ^b

Invece, relativamente ai parametri ematochimici i valori di AST (U / L) variavano da 38.22 a 42.05, di ALT (U / L) da 6.81 a 8.39, di ALP (U / L) da 20.00 a 23.20 e di LDH (U / L) da 38.00 a 40.50.

Tutti parametri ematochimici studiati hanno mostrato lo stesso trend stagionale esibendo i valori più elevati durante la stagione estiva e quelli più bassi durante l'autunno (Tabella 5).

Tabella 5. Variazioni stagionali (media \pm deviazione standard) dei parametri ematochimici di *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) campionato nel Lago di Faro. All'interno di ciascun parametro le medie con lo stesso carattere alfabetico in apice non rappresentano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

Parametri Ematochimici	Stagioni			
	Autunno	Inverno	Primavera	Estate
AST(U / L)	38.22 \pm 1.27 ^a	38.60 \pm 1.23 ^a	39.02 \pm 1.43 ^a	42.05 \pm 2.13 ^b
ALT (U / L)	6.81 \pm 0.77 ^a	7.47 \pm 0.80 ^{a,b}	7.60 \pm 0.49 ^b	8.39 \pm 0.35 ^c
ALP (U / L)	20.00 \pm 2.10 ^a	21.10 \pm 2.57 ^{a,b}	22.00 \pm 2.81 ^{a,b}	23.20 \pm 2.73 ^b
LDH (U / L)	38.00 \pm 2.10 ^a	38.70 \pm 2.23 ^{a,b}	39.50 \pm 2.01 ^{a,b}	40.50 \pm 2.31 ^b

4.4. Bioaccumulo stagionale e concentrazione dei metalli pesanti in *Mugil cephalus*

Le concentrazioni medie e le deviazioni standard associate di Cd, Pb, Cr e Hg nei diversi tessuti (muscolo, branchie, fegato, stomaco e intestino) di *M.*

cephalus campionato in 3 stazioni nel Lago di Faro sono mostrate nelle Tabelle (6-9).

Tabella 6. Variazioni stagionali (media \pm deviazione standard) della concentrazione di Cd (mg / kg) in differenti tessuti di *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) campionato nel Lago di Faro. All'interno di ciascun parametro le medie con lo stesso carattere alfabetico in apice non rappresentano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

Organo	Stagioni			
	Autunno	Inverno	Primavera	Estate
<i>Muscolo</i>	0.0011 \pm 0.0005 ^a	0.0013 \pm 0.0003 ^a	0.0011 \pm 0.0006 ^a	0.0015 \pm 0.0007 ^a
<i>Branchie</i>	0.0041 \pm 0.0010 ^a	0.0055 \pm 0.0019 ^{ab}	0.0058 \pm 0.0013 ^{b,c}	0.0077 \pm 0.0012 ^c
<i>Fegato</i>	0.0172 \pm 0.0089 ^a	0.0815 \pm 0.0125 ^b	0.0421 \pm 0.0019 ^c	0.0443 \pm 0.0053 ^c
<i>Stomaco</i>	0.0050 \pm 0.0008 ^a	0.0066 \pm 0.0016 ^b	0.0074 \pm 0.0026 ^b	0.0077 \pm 0.0010 ^b
<i>Intestino</i>	0.0194 \pm 0.0068 ^a	0.0260 \pm 0.0067 ^{a,b}	0.0368 \pm 0.0070 ^b	0.0589 \pm 0.0061 ^c

Tabella 7. Variazioni stagionali (media \pm deviazione standard) della concentrazione di Pb (mg / kg) in differenti tessuti di *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) campionato nel Lago di Faro. All'interno di ciascun parametro le medie con lo stesso carattere alfabetico in apice non rappresentano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

Organo	Stagioni			
	Autunno	Inverno	Primavera	Estate
<i>Muscolo</i>	0.0615 \pm 0.0258 ^{a,b}	0.0706 \pm 0.0261 ^b	0.0521 \pm 0.0170 ^a	0.0705 \pm 0.0193 ^b
<i>Branchie</i>	1.0740 \pm 0.5628 ^{a,b}	1.0360 \pm 0.2742 ^a	1.1220 \pm 0.2399 ^{a,b}	1.3650 \pm 0.2736 ^{b,c}
<i>Fegato</i>	0.2300 \pm 0.0531 ^a	0.2141 \pm 0.0220 ^a	0.4680 \pm 0.0907 ^b	0.8840 \pm 0.2076 ^c
<i>Stomaco</i>	0.0830 \pm 0.0086 ^a	0.1180 \pm 0.0117 ^b	0.1550 \pm 0.0162 ^c	0.1650 \pm 0.0150 ^c
<i>Intestino</i>	0.2250 \pm 0.0814 ^a	0.2604 \pm 0.0094 ^{a,b}	0.2720 \pm 0.0073 ^b	0.2930 \pm 0.0119 ^c

Tabella 8. Variazioni stagionali (media \pm deviazione standard) della concentrazione di Cr (mg / kg) in differenti tessuti di *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) campionato nel Lago di Faro. All'interno di ciascun parametro le medie con lo stesso carattere alfabetico in apice non rappresentano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

Organo	Stagioni			
	Autunno	Inverno	Primavera	Estate
<i>Muscolo</i>	0.0996 \pm 0.0353 ^a	0.0430 \pm 0.0158 ^b	0.0412 \pm 0.0127 ^b	0.0675 \pm 0.0275 ^a
<i>Branchie</i>	0.0717 \pm 0.0058 ^a	0.1046 \pm 0.0350 ^b	0.1152 \pm 0.0270 ^b	0.2190 \pm 0.0417 ^c
<i>Fegato</i>	0.2297 \pm 0.0136 ^a	0.2750 \pm 0.0099 ^b	0.2923 \pm 0.0467 ^{b,c}	0.3245 \pm 0.0351 ^{c,d}
<i>Stomaco</i>	0.0652 \pm 0.0149 ^a	0.0747 \pm 0.1205 ^a	0.0798 \pm 0.0123 ^a	0.0982 \pm 0.0072 ^b
<i>Intestino</i>	0.1246 \pm 0.0063 ^a	0.1344 \pm 0.0228 ^b	0.1346 \pm 0.0329 ^b	0.1516 \pm 0.0069 ^c

Tabella 9. Variazioni stagionali (media \pm deviazione standard) della concentrazione di Hg ($\mu\text{g} / \text{kg}$) in differenti tessuti di *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) campionato nel Lago di Faro. All'interno di ciascun parametro le medie con lo stesso carattere alfabetico in apice non rappresentano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

Organo	Stagioni			
	Autunno	Inverno	Primavera	Estate
<i>Muscolo</i>	0.0037 \pm 0.0013 ^a	0.0046 \pm 0.0010 ^b	0.0042 \pm 0.0010 ^{a,b}	0.0038 \pm 0.0009 ^{a,b}
<i>Branchie</i>	0.0003 \pm 0.0002 ^{a,b}	0.0002 \pm 0.0001 ^a	0.0003 \pm 0.0001 ^a	0.0004 \pm 0.0001 ^b
<i>Fegato</i>	0.0013 \pm 0.0002 ^a	0.0016 \pm 0.0003 ^{a,b}	0.0019 \pm 0.0004 ^{b,c}	0.0024 \pm 0.0005 ^c
<i>Stomaco</i>	0.0011 \pm 0.0003 ^a	0.0013 \pm 0.0005 ^a	0.0014 \pm 0.0004 ^{a,b}	0.0017 \pm 0.0002 ^b
<i>Intestino</i>	0.0007 \pm 0.0001 ^a	0.0008 \pm 0.0001 ^{a,b}	0.0009 \pm 0.0001 ^b	0.0009 \pm 0.0001 ^b

I metalli misurati nei cefali studiati hanno mostrato differenze significative tra le diverse stagioni ($P < 0.05$). Inoltre i vari tessuti hanno esibito una differente capacità di accumulo dei metalli pesanti. La più alta concentrazione di metallo è stata riscontrata nelle branchie mentre i livelli più bassi nel muscolo. Le concentrazioni dei metalli nei tessuti dei pesci esaminati hanno mostrato il seguente andamento:

Muscolo Cd < Hg < Cr < Pb

Branchie. Hg < Cd < Cr < Pb

Fegato Hg < Cd < Cr < Pb

Stomaco Hg < Cd < Cr < Pb

Intestino Hg < Cd < Cr < Pb

La concentrazione di Cd nel muscolo, branchie, fegato, stomaco e intestino variava da 0.0011

mg / kg a 0.0015 mg / kg, da 0.0041 mg / kg a 0.0077 mg / kg, da 0.0421 mg / kg a 0.0815 mg / kg, da 0.0050 mg / kg a 0.0077 mg / kg e da 0.0194 mg / kg a 0.0368 mg / kg rispettivamente. In Inverno *M. cephalus* ha mostrato la più alta concentrazione di Cd, mentre i valori più bassi si sono avuti in primavera e in autunno. Soltanto nel muscolo le variazioni delle concentrazioni di Cd durante le diverse stagioni non risultano essere statisticamente significative (Tabella 6).

La concentrazione di Pb variava da 0.0521 mg / kg a 0.0706 mg / kg nel muscolo, da 1.0360

mg / kg a 1.3650mg / kg nelle branchie, da 0.2141 mg / kg a 0.8840 mg / kg nel fegato, da 0.0830 mg / kg a 0.1650mg / kg nello stomaco e da 0.2250 mg / kg a 0.2930 mg / kg nell'intestino. La più alta concentrazione di Pb in *M. cephalus* è stata trovata durante l'estate mentre la più bassa è stata riscontrata in primavera (Tabella 7).

La concentrazione di Cr nelle branchie variava da 0.0412 mg / kg a 0.0996mg / kg nel muscolo, mentre la sua concentrazione nelle branchie da 0.0717 mg / kg a 0.2190 mg / kg, nel fegato variava da 0.2297 mg / kg a 0.3245 mg / kg mentre nello stomaco da 0.0652 mg / kg a 0.0982

mg / kg, infine la concentrazione nell'intestino variava da 0.1246 mg / kg a 0.1516 mg / kg. La più alta concentrazione di Cr si è registrata in estate mentre la più bassa in primavera (Tabella 8).

La concentrazione di Hg nel muscolo variava da 0.0037 $\mu\text{g} / \text{kg}$ a 0.0046 $\mu\text{g} / \text{kg}$, nelle branchie da 0.0002 $\mu\text{g} / \text{kg}$ a 0.0004 $\mu\text{g} / \text{kg}$, nel fegato variava da 0.0013 $\mu\text{g} / \text{kg}$ a 0.0024 $\mu\text{g} / \text{kg}$, nello stomaco da 0.0011 $\mu\text{g} / \text{kg}$ a 0.0017 $\mu\text{g} / \text{kg}$ mentre nell'intestino variava da 0.0007 $\mu\text{g} / \text{kg}$ a 0.0009 $\mu\text{g} / \text{kg}$. La più alta concentrazione di Hg è stata trovata in primavera mentre la più bassa in inverno. (Tabella 9).

5. DISCUSSIONI

Come mostrato in Tabella 2, i metalli pesanti analizzati risultano scarsamente presenti nell'acqua del sito da noi studiato con concentrazioni che rientrano all'interno dei valori ammessi dal DM n. 260 dell'8 novembre 2010. Inoltre, è possibile evidenziare che nell'acqua da noi campionata nel sito sperimentale, la distribuzione stagionale dei metalli pesanti studiati (Cd, Pb, Cr, Hg) si mantiene costante (Tabella 2). Nell'ambiente acquatico i metalli pesanti, in piccolissime concentrazioni, tendono ad accumularsi nei sedimenti e questo caratterizza le possibili differenze esistenti tra le concentrazioni presenti in acqua e quelle del sedimento (Gao et al., 2019; Okbah et al., 2020) (Tabella 2).

Il sedimento funziona come un sito di raccolta per i metalli pesanti che sono disciolti in acqua, e questo per le specie acquatiche che mostrano caratteristiche bentoniche rappresenta un'alta percentuale di possibilità di bioaccumulo. Anche per il sedimento le concentrazioni dei metalli pesanti da

noi studiati, pur presentando valori differenti durante le diverse stagioni, non hanno presentato variazioni statisticamente significative (Tabella 2).

Per quanto riguarda l'analisi del bioaccumulo dei metalli pesanti (Cd, Pb, Cr, HG) nei diversi tessuti e organi prelevati in *M. cephalus*, essa ha evidenziato una differente ripartizione tra i vari substrati biologici con differenze significative come mostrato dalle Tabelle 6-9. Questa differenza nei livelli di accumulo in *M. cephalus* può essere principalmente attribuita alle differenze nel ruolo fisiologico di ciascun organo. La capacità regolatoria, il comportamento e le abitudini alimentari sono altri fattori che influenzano l'accumulo nei diversi organi (Marzouk, 1994).

Inoltre, per ciascuna stagione, il differente bioaccumulo dei diversi metalli pesanti ha mostrato una maggiore concentrazione a livello delle branchie, mentre il muscolo sembra essere l'ultimo sito preferenziale. Poiché la stagione non sembra influenzare il diverso bioaccumulo del carico antropico dei metalli pesanti, le più alte concentrazioni a livello delle branchie possono essere dovute alla presenza di muco che difficilmente può essere rimosso completamente dalle lamelle branchiali durante la preparazione del campione per l'analisi (Khalil e Faragallah, 2008). Il muco esercita un'azione di assorbimento dei metalli che potrebbe, come mezzo di difesa fisiologico, trattenere i metalli pesanti. L'assorbimento dei metalli sulla superficie delle branchie, che rappresentano il primo organo bersaglio per gli inquinanti

presenti nell'acqua, ha un'importante influenza sulla concentrazione degli stessi in questo tessuto (Hemens e Connell, 1975).

Alcuni organi bersaglio come il fegato e le branchie, sono tessuti metabolicamente attivi e accumulano i metalli pesanti in alte concentrazioni, come documentato da precedenti lavori in differenti specie ittiche (Ansari et al., 2004; Karadede et al., 2004; Ali e Abdel-Satar, 2005; Khalil e Faragallah, 2008).

Nella presente ricerca, il muscolo è il tessuto che ha mostrato le concentrazioni più basse di metalli pesanti; questo risultato è in accordo con quanto evidenziato in altri studi dai quali emerge che il muscolo non è un tessuto attivo in termini di bioaccumulo dei metalli pesanti (Karadede et al., 2004; Khalil e Faragallah, 2008). Tra i metalli pesanti da noi studiati, il Pb è quello maggiormente accumulato (Tabella 7) nei tessuti di *M. cephalus*, mentre il Hg è quello meno presente (Tabella 9)

Per quanto riguarda l'andamento stagionale dei metalli pesanti presi in esame, l'analisi comparativa delle diverse stagioni ha evidenziato che le loro concentrazioni in tutti i tessuti di *M. cephalus* mostrano differenze statisticamente significative (Tabelle 6-9). Le concentrazioni più alte, statisticamente significative, dei metalli pesanti, si sono avute nel periodo estivo, mentre quelle più basse in autunno. Una possibile spiegazione potrebbe essere data dall'influenza che alcuni importanti variabili fisiche dell'acqua

(temperatura e ossigeno disciolto) hanno sulla fisiologia respiratoria dei pesci. Probabilmente nel periodo estivo l'aumento della temperatura dell'acqua e la riduzione della concentrazione di ossigeno, implementano l'*uptake* branchiale di acqua che può agire causando un maggiore bioaccumulo di metalli pesanti in questo tessuto nel periodo estivo.

In merito ai parametri del sangue, studi precedenti su diverse specie ittiche, hanno evidenziato una marcata variazione dei parametri ematologici ed ematochimici dovuta all'esposizione a Cd, Pb, Cr e Hg. Ramalingam et al. (2000) in uno studio effettuato su *Cirrhina mrigala* (Hamilton, 1822) esposta al Pb, hanno evidenziato una diminuzione dei valori dei parametri ematologici ed ematochimici. In altri studi condotti sulle diverse specie (Mastan et al., 2008; Mahmoud et al., 2013; Bujjamma e Padmavathi, 2018; Islam et al., 2020) è stato riportato un diverso *trend* delle variazioni, in quanto i valori di alcuni parametri aumentavano mentre altri diminuivano in seguito all'esposizione al metallo.

Precedenti indagini da noi effettuate su *M. cephalus* campionato nel Lago di Faro hanno mostrato che gli effetti del carico antropico di alcuni metalli pesanti determinano modificazioni dei parametri ematologici. In particolare, Fazio et al. (2019a) hanno evidenziato una correlazione negativa tra alcuni parametri ematologici quali RBC, Hb e Hct e la concentrazione di vanadio nel

fegato, con conseguente diminuzione di questi parametri ematici stabili in risposta al bioaccumulo di vanadio.

Analoghi risultati sono stati ottenuti da Authman et al. (2015) e da Nanda e Bikkini, (2016) in lavori precedenti su *Heteropneustes fossilis* (Bloch, 1794) esposto a stress da vanadio, dove si verificava una riduzione dei valori degli eritrociti e dell'emoglobina. Anche in un'altra specie ittica quale *Clarias Lazera* (Valenciennes, 1840), l'effetto tossico di questo metallo pesante si traduceva in una riduzione di Hb e Hct (Zaki et al., 2010). Il *linkage* tra effetto tossico dei metalli pesanti e parametri ematologici è stato altresì dimostrato in un'altra ricerca di Fazio et al. (2019b), che hanno studiato il bioaccumulo di arsenico (As) nel cefalo striato del Lago di Faro.

Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da altri autori in ricerche effettuate su altre specie ittiche (Pedlar et al., 2002; Chokkalingam et al., 2010) nelle quali il trattamento con arsenico induceva nei pesci una condizione di anemia con depressione dei parametri eritrocitari.

Nel nostro studio l'andamento stagionale dei parametri ematologici ha evidenziato l'esistenza di variazioni statisticamente significative tra le diverse stagioni; tali variazioni sembrano correlate al differente bioaccumulo di metalli pesanti da parte dell'organismo. Alcuni parametri (RBC e Hct) (Tabella 4) hanno mostrato una diminuzione dei valori in estate, quando invece, ci saremmo aspettati un loro aumento come risposta alla leggera ipossia indotta

dall'aumento della temperatura dell'acqua, ma probabilmente l'azione incidente del bioaccumulo dei metalli pesanti in questa stagione sembra svolgere un'attività depressiva sulla produzione eritrocitaria che non fa aumentare in modo significativo il numero di RBC e dei parametri eritrocitari nel periodo estivo (Tabella 4).

WBC e TC (insieme ai restanti parametri ematologici valutati) hanno invece presentato valori ridotti durante l'estate, tendendo quindi a diminuire in relazione al bioaccumulo. Questo risultato può trovare spiegazione con il fatto che i metalli pesanti, probabilmente, agiscono inducendo una sensibilizzazione dell'organismo per quanto concerne le difese immunitarie, per cui accade che l'organismo sensibilizzato al carico antropico dei metalli pesanti riduce i globuli bianchi e le piastrine nel periodo di maggiore bioaccumulo tissutale. Quindi anche questi parametri rappresentano *biomarkers* importanti in quanto la loro riduzione compromette le difese immunitarie determinando una maggiore predisposizione dell'organismo alle patologie.

L'analisi dei parametri ematochimici studiati ha evidenziato un aumento statisticamente significativo nella stagione estiva rispetto alle altre stagioni, corrispondente al maggiore bioaccumulo dei metalli pesanti studiati.

Il maggiore bioaccumulo epatico dei metalli pesanti durante la stagione estiva è in grado di evocare un possibile danno tissutale che si evidenzia con un aumento statisticamente significativo degli enzimi epatici (Tabella 5).

L'analisi e lo studio dei parametri ematici in *M. cephalus* fornisce utili indicazioni sul ruolo di questi *biomarkers* in risposta al bioaccumulo del carico antropico da metalli pesanti.

6. CONCLUSIONI

Il presente studio ha evidenziato l'importante ruolo del cefalo striato *M. cephalus*, come bioindicatore in grado di fornire un valido modello biologico per le ricerche ambientali. Inoltre, nonostante l'elevata capacità di bioaccumulo dei metalli pesanti, nel *M. cephalus*, le concentrazioni tissutali risultano estremamente ridotte ed addirittura la parte edibile per il consumatore (tessuto muscolare) è quella che ha mostrato i valori più bassi. Le stagioni sembrano influenzare il bioaccumulo dei metalli pesanti nel cefalo striato e questo risulta interessante in ambito di valutazione ambientale in quanto dovrebbe indurre ad approfondimenti scientifici in ambito di biomonitoraggio, da effettuare a lungo termine.

In ultima analisi, le analisi ematologiche ed ematochimiche dei “pesci sentinella” assumono una particolare importanza scientifica nelle indagini ambientali in quanto sembrano avere un ruolo come “*blood biomarkers*” per il carico antropico da metalli pesanti. È necessario, tuttavia, ottenere un “data base” di questi parametri ematici nelle differenti specie ittiche, che possa

rappresentare il punto di partenza necessario all'individuazione di un "range di riferimento" per questi bioindicatori.

PROSPETTIVE FUTURE

La presente indagine sperimentale rappresenta uno studio preliminare che in futuro dovrà essere approfondito valutando i seguenti aspetti scientifici:

- Studiare le possibili correlazioni, per ogni singola stagione, tra ciascun "*blood biomarker*" e la concentrazione di ciascun metallo nei singoli tessuti.
- Analizzare attraverso un'indagine statistico-comparativa le possibili variazioni statisticamente significative delle concentrazioni dei metalli nei diversi tessuti per ciascuna stagione.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Direttore del Dipartimento Alimenti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia Dr. Vincenzo Ferrantelli ed il ricercatore sanitario Dott. Gaetano Cammilleri che hanno prestato attenzione e dato supporto nella parte di chimica analitica della tesi.

Un ringraziamento particolare va

Al Direttore del Dipartimento di Scienze Veterinarie Prof. Giuseppe Piccione

Al mio Tutor Prof. Francesco Fazio

Ringrazio inoltre:

La Dott.ssa Daniela Alberghina

La Dott.ssa Francesca Arfuso

La Dott.ssa Cristina Cravana

La Prof.ssa Ester Fazio

La Dott.ssa Claudia Giannetto

La Prof.ssa Elisabetta Giudice

Il Prof. Pietro Medica

Il prof. Michele Panzera

La Dott.ssa Laura Perillo

La Dott.ssa Maria Rizzo

per il supporto e l'affetto datimi in questi anni travagliati del mio Dottorato.

Grazie a MIO PADRE, al quale ho dedicato questo mio Dottorato e la mia

Tesi finale

**Grazie all'insigne chirurgo PROF. GIOVANNI SGROI, senza il quale io
non sarei qui oggi.**

Grazie a mia madre, a mio fratello, ai miei parenti

Grazie ai miei amici

GRAZIE

BIBLIOGRAFIA

Adam S., Shepard K.L., Greeley M.S. Jr, Jimenez B.D., Ryon M.G., Shugart L.R., McCarthy J.F. 1989. The use of bioindicators for assess the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research*, **28**: 459-464.

Ahmed I., Reshi Q.M., Fazio F. 2020. The influence of the endogenous and exogenous factors of hematological parameters in different fish species: a review. *Aquaculture International*. DOI: 10.1007/s10499-01-00501-3.

Ackermann C. 2008. A quantitative and qualitative histological assessment of selected organs of *Oreochromis mossambicus* after acute exposure to cadmium, chromium and nickel. M. Sc. dissertation, University of Johannesburg, South Africa.
<https://ujcontent.uj.ac.za/vital/access/services/Download/uj:6789/CONTENT?view=true>

Alam M.G.M., Tanaka A., Allinson G., Laurenson L.J.B., Stagnitti F., Snow E.T. 2002. A comparison of trace element concentrations in cultured and wild carp (*Cyprinus carpio*) of lake Kasumigaura, Japan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **53**: 348-354.

Al-Balawi H.F.A., Al-Akel A.S., Al-Misned F., Suliman E.A.M., Al-Ghanim K.A., Mahboob S., Ahmad Z. 2013. Effects of sub-lethal exposure of lead acetate on histopathology of gills, liver, kidney and muscle and its

accumulation in these organs of *Clarias gariepinus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **56**: 293-302.

Ali M., Abdel-Satar A. 2005. Studies of some heavy metals in water, sediment, fish and fish diets in some fish farms in EL-Fayoum province. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, **31**: 261-273.

Al-Masri M., Aba S., Khalil A.H., Al-Hares Z. 2002. Sedimentation rates and pollution history of a dried lake. *Science of the Total Environment*, **293**: 177-189.

Al-Yousuf M.H., El-Shahawi M.S., Al-Ghais S.M. 2000. Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus lentjan* fish species in relation to body length and sex. *Science of the Total environment*, **256**: 87-94.

Ansari T., Marr I., Tariq N. 2004. Heavy metals in marine pollution perspective- A mini review. *Journal of Applied Science*, **4**: 1-20.

Arillo A., Melodio F. 1988. Effects of hexavalent chromium on trout mitochondria. *Toxicology Letters*, **44**: 71-76.

Authman M.M.N. 2008. *Oreochromis niloticus* as a biomonitor of heavy metal pollution with emphasis on potential risk and relation to some biological aspects. *Global Veterinaria*, **2**: 104-109.

Authman M.M.N., Zaki M.S., Khallaf E.A., Abbas H.H. 2015. Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*, **6**: 1-13.

- Babalola T.O.O., Adebayo M.A., Apata D.F., Omotosho J.S. 2009.** Effect of dietary alternative lipid sources on hematological parameters and serum constituents of *Heterobranchus longifilis* fingerlings. *Tropical Animal Health and Production*, **41**: 371-377.
- Bargagli B., Cruscanti M., Leonzio C., Bacci E. 1998.** I bioindicatori. In: Vighi M., Bacci E., *Ecotossicologia*. UTET, Torino, Italia, pp. 237.
- Benoit D.A. 1976.** Toxic effects of hexavalent chromium on brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Research*, **10**: 497- 500.
- Bernhoft, R.A. 2012.** Mercury toxicity and treatment: a review of the literature. *Journal of Environmental and Public Health*, 460508. 10 pp.
- Bervoets L., Blust R., Verheyen R. 2001.** Accumulation of metals in the tissues of three spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) from natural fresh waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **48**: 117-127.
- Beyea M.M., Benfey T.J., Kieffer J.D. 2005.** Hematology and stress physiology of juvenile diploid and triploid short nose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **31**: 303-313.
- Bottari C., Carveni P. 2009.** Archaeological and historiographical implications of recent uplift of the Peloro Peninsula, NE Sicily. *Quaternary Research*, **72**: 38-46.
- Briat J.F., Lebrun M. 1999.** Plant responses to metal toxicity. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris, Sciences de la vie*, **322**: 43-54.

- Brix O., Thorkildsen S., Colosimo A. 2004.** Temperature acclimation modulates the oxygen binding properties of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) genotypes HbI*1/1, HbI*1/2 and HbI*2/2- by changing the concentrations of their major hemoglobin components (results from growth studies at different temperatures). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology*, **138**: 241-251.
- Bujjamma P., Padmavathi P. 2018.** Effect of cadmium on haematological changes in a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. *International Journal of Zoology Studies*, **3**: 132-141.
- Burger J., Gaines K.F., Boring C.S., Stephens W.L., Snodgrass J., Dixon C., McMahon M., Shukla S., Shukla T., Gochfeld M. 2002.** Metal levels in fish from the Savannah River: potential hazards to fish and other receptors. *Environmental Research Section A*, **89**: 85-97.
- Capillo G., Panarello G., Savoca S., Sanfilippo M., Albano M., Li Volsi R., Consolo G., Spanò N. 2018a.** Intertidal ponds of Messina's beachrock faunal assemblage, evaluation of ecosystem dynamics and communities' interactions. *Atti Della Accademia Peloritana Dei Pericolanti-Classe Di Scienze Fisiche, Matematiche E Naturali*, **96**: 1-16.
- Capillo G., Savoca S., Costa R., Sanfilippo M., Rizzo C., Giudice A. Lo, Albergamo A., Rando R., Bartolomeo G., Spanò N., Faggio C. 2018b.** New insights into the culture method and antibacterial potential of *Gracilaria gracilis*. *Marine Drugs*, **16**: 492.

- Capillo G., Silvestro S., Sanfilippo M., Fiorino E., Giangrosso G., Ferrantelli V., Vazzana I., Faggio C. 2018c.** Assessment of electrolytes and metals profile of the Faro Lake (Capo Peloro Lagoon, Sicily, Italy) and its impact on *Mytilus galloprovincialis*. *Chemistry & Biodiversity*, **15**: e1800044.
- Cheng H., Hu Y. 2010.** Lead (Pb) isotopic fingerprinting and its applications in lead pollution studies in China: a review. *Environmental Pollution*, **158**: 1134-1146.
- Chi Q.Q., Zhu G.W., Alan L. 2007.** Bioaccumulation of heavy metals in fishes from Taihu Lake, China. *Journal of Environmental Sciences*, **19**: 1500-1504.
- Coetzee L., du Preez H.H., van Vuren J.H.J. 2002.** Metal concentrations in *Clarias gariepinus* and *Labeo umbratus* from the Olifant and Klein Olifants River, Mpumalanga, South Africa: Zinc, copper, manganese, lead, chromium, nickel, aluminium and iron. *Water SA.*, **28**: 433-448.
- Chokkalingam K., Annamalai M., Satyanarayanan S.K., Mathan R. 2010.** Toxicological effects of arsenate exposure on hematological, biochemical and liver transaminases activity in an Indian major carp, *Catla catla*. *Food and Chemical Toxicology*, **28**: 2848-2854.
- Chouba L., Kraiem M., Njimi W., Tissaoui C., Thompson J., Flower R. 2007.** Seasonal Variation of heavy metals (Cd, Pb, and Hg) in sediments

and mullet, *Mugil cephalus* (Mugilidae) From the Ghar EL-Melh Lagoon (Tunisia). *Transitional Water Bulletin*, **4**: 45-52.

Chouvelon T., Cresson P., Bouchoucha M., Brach-Papa C., Bustamante P.,

Crochet S., Marco-Mirallea F., Thomas B., Knoery J. 2018.

Oligotrophy as a major driver of mercury bioaccumulation in medium to high-trophic level consumers: a marine ecosystem-comparative study.

Environmental Pollution, **233**: 844-854

Clarkson T.W. 1997. The toxicology of mercury: critical reviews. *Clinical*

Laboratory Science Journal, **34**: 369-403.

Cuesta A., Meseguer J., Esteban M.A. 2011. Immunotoxicological effects of

environmental contaminants in teleost fish reared for aquaculture, In: Stoytcheva M, Pesticides in the Modern World-Risks and Benefits, Rijeka, Croatia: Intech, 241-266.

Dangre, A.J., S. Manning and M. Brouwer 2010. Effects of cadmium on

hypoxia-induced expression of hemoglobin and erythropoietin in larval sheepshead minnow, *Cyprinodon variegates*. *Aquatic Toxicology*, **99**:

168-175.

Dawson M.A. 1990. Blood chemistry of the windowpane flounder

Scophthalmus aquosus in long island sound: geographical, seasonal and experimental variations. *Fishery Bulletin*, **88**: 429-437.

- Demirak A, Yilmaz F, Levent Tuna A, Ozdemir N. 2006.** Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey. *Chemosphere*, **63**: 1451-1458.
- Demska-Zakęs K., Zakęs K., Ziomek E., Jarmolowicz S. 2012.** Impact of feeding juvenile tench (*Tinca tinca*) feeds supplemented with vegetable oils on hematological indexes and liver histology. *Archives of Polish Fisheries*, **20**: 67-75.
- De Pedro N., Guijarro A.I., Lopez-Patino M.A., Martinez-Alvarez R., Delgado M.J. 2005.** Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. *Aquaculture Research*, **36**: 1185-1196.
- Douglas J.W. Weiss, K. Wardrop, J. 2010.** Schalm's Veterinary Hematology, sixth ed. Wiley-Blackwell, USA.
- Duncan P.L., Lovell R.T., Butterworth C.E. Jr, Freeberg L.E., Tamura T. 1993.** Dietary folate requirement determined for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *The Journal of Nutrition*, **123**: 1888-1897.
- Dunier M. 1996.** Water pollution and immunosuppression of freshwater fish. *Italian Journal of Zoology*, **63**: 303-309.
- Eisler R. 2000.** Handbook of chemical risk assessment: Health hazards to humans, plants, and animals. Boca Raton: CRC Press, Lewis publishers.

- Erickson RJ, Nichols JW, Cook PM, Ankley G.T. 2008.** Bioavailability of chemical contaminants in aquatic systems, In: Di Giulio RT, Hinton DE, The Toxicology of Fishes, Florida, USA: CRC Press, pp. 9-45.
- Eroglu A., Dogan Z., Kanak E.G., Atli G., Canli M. 2015.** Effects of heavy metals (Cd,Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**: 3229-3237.
- Faggio C., Casella S., Arfuso F., Marafioti S., Piccione G., Fazio F. 2013.** Effect of storage time on haematological parameters in mullet, *Mugil cephalus*. *Cell Biochemistry and Function*, **31**: 412-416.
- Farag A.M., May T., Marty G.D., Easton M., Harpwer D.D., Little E.E., Cleveland L. 2006.** The effect of chronic chromium exposure on the health of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquatic Toxicology*, **76**: 246-57.
- Fazio F., Filiciotto F., Marafioti S., DiStefano V., Assenza A., Placenti F., Buscaino G., Piccione G. Mazzola S. 2012a.** Automatic analysis to assess haematological parameters in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, **45**: 63-65.
- Fazio F., Faggio C., Marafioti S., Torre A., Sanfilippo M., Piccione G. 2012b.** Comparative study of haematological profile on *Gobius niger* in two different habitat sites, Faro Lake and Tyrrhenian Sea. *Cahiers de Biologie Marine*, **53**: 213-219.

- Fazio F., Marafioti S., Torre A., Sanfilippo M., Panzera M., Faggio C. 2013.** Haematological and serum protein profiles of *Mugil cephalus*, effect of two different habitat. *Ichthyological Research*, **60**: 36-42.
- Fazio F., Piccione G., Tribulato K., Ferrantelli V., Giangrosso G., Arfuso F., Faggio C. 2014.** Bioaccumulation of heavy metals in blood and tissue of striped mullet in two Italian lakes. *Journal of Aquatic Animal Health*, **26**: 278-284.
- Fazio F. 2019.** Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. *Aquaculture*, **500**: 237-242.
- Fazio F., Saoca C., Sanfilippo M., Capillo G., Spanò N., Piccione G. 2019a.** Response of vanadium bioaccumulation in tissues of *Mugil cephalus* (Linnaeus 1758). *Science of the Total Environment*, **689**: 774-780.
- Fazio F., Saoca C., Ferrantelli V., Cammilleri G., Capillo, G., Piccione G. 2019b.** Relationship between arsenic accumulation in tissues and haematological parameters in mullet caught in faro lake: a preliminary study. *Environmental Science and Pollution Research*, **26**: 8821-8827.
- Fazio F., Saoca C., Acar Ü., Tezel R., Çelik M., Yilmaz S., Kesbiç O.S., Yalgin F., Yigit M. 2020a.** A comparative evaluation of hematological and biochemical parameters between italian *Mugil cephalus* (Linnaeus 1758) and turkish *Chelon auratus* (Risso 1810) mullet. *Turkish Journal of Zoology*; **44**: 22-30.

- Fazio F., D'Iglio C., Capillo G., Saoca C., Peycheva K., Piccione G., Makedonski L. 2020b.** Environmental investigations and tissue bioaccumulation of heavy metals in grey mullet from the Black sea (Bulgaria) and the Ionian sea (Italy). *Animals*, **10**: 1739.
- Fernandez M.N., Mazon A.F. 2003.** Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val AL, Kappor BG (eds) Fish adaptations, scientific publishers. Enfield, pp 203-231.
- Filiciotto F., Fazio F., Marafioti S., Buscaino G., Maccarrone V., Faggio C. 2012.** Assessment of hematological parameter range values using an automatic method in European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Natura Rerum*, **1**: 29-36.
- Firouzbakhsh F., Noori F., Khalesi M.K., Jang-Khalili K. 2011.** Effects of probiotic, protexin on growth performance and hematological parameters in the oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. *Fish Physiology and Biochemistry*, **37**: 833-842.
- Gao L., Gao B., Xu D., Peng W., Lu J. 2019.** Multiple assessments of trace metals in sediments and their response to the water level fluctuation in the Three Gorges Reservoir, China. *Science of the Total Environment*, **648**: 197-205.
- Giari L., Manera M., Simoni E., Dezfuli B.S. 2007.** Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. *Chemosphere*, **67**: 1171-1181.

- Gochfeld M. 2003.** Cases of mercury exposure, bioavailability, and adsorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **56**: 174-179.
- Golemi S., Medja N., Lacej D. 2013.** Influence of sex on the hematological and morphometric parameters of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) from Shkodra Lake. *Academic Journal of Interdisciplinary Studies*, **S 2**: 45.
- Greene D.H., Selivonchick D.P. 1990.** Effects of dietary vegetable, animal and marine lipids on muscle lipid and hematology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **89**: 165-182.
- Grosell M., Gerdes R., Brix K.V. 2006.** Influence of Ca, humic acid and pH on lead accumulation and toxicity in the fathead minnow during prolonged water-borne lead exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **143**: 473-483.
- Guertin J. 2005.** Toxicity and health effects of chromium (All Oxidation States). In: Guertin J, Avakiam CP, Jacobs JA (eds), Chromium (VI) Handbook, pp 216-34. CRC, Boca Raton, FL, USA.
- Jarup L. 2003.** Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, **68**: 167-182.
- Javed M, Usmani N. 2012.** Toxic effects of heavy metals (Cu, Ni, Fe Co, Mn, Cr, Zn) to the haematology of *Mastacembelus armatus* thriving in Harduaganj Reservoir, Aligarh, India. *Global Journal of Medical Research*, **12**: 59-64.

- Jeronimo G.T., Laffitte L.V., Speck G.M., Martins M.L. 2011.** Seasonal influence on the hematological parameters in cultured Nile tilapia from southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, **71**: 719-725.
- Hanan S.G., El-Kasheif M.A., Ibrahim S.A., Authman M.M.N. 2013.** Effect of water pollution in El-Rahawy drainage canal on hematology and organs of freshwater fish *Clarias gariepinus*. *World Applied Sciences Journal*, **21**: 329-341.
- Hemens, J., Connell A.D., 1975.** Richards Bay: Southern bay conservation area. CSIR / NIWR Progress Report No. 29 CSIR, Durban, South Africa.
- Hrubec T.C., Smith S.A. 2010.** Hematology of fish. In: Weiss, D.J., Wardrop, K.J. (Eds.), *Shalm's Veterinary Hematology*. Ames (IA). John Wiley & Sons, pp. 994-1003.
- Hrubec T.C., Smith S.A., Robertson J.L. 2001.** Age-related changes in hematology and plasma chemistry values of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Veterinari Clinical Pathology*, **30**: 8-15.
- Hsu P.C., Guo Y.L. 2002.** Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology*, **180**: 33-44.
- Huang W., Gao L.A., Shan X.J., Lin L.S., Dou S.Z. 2011.** Toxicity testing of waterborne mercury with red sea bream (*Pagrus major*) embryos and larvae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **86**: 398-405.

- Hwang I.K., Kim K.W., Kim J.H., Kang J.C. 2016.** Toxic effects and depuration after the dietary lead(II) exposure on the bioaccumulation and hematological parameters in starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **45**: 328-333.
- Ikeda Y., Koyama J., Ozaki H. 1986.** Heavy metal levels in tissues of fishes exposed to cadmium. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**: 2055-2059.
- Islam S.M.M., Rohani Md.F., Zabed S.A., Islam Md.T., Jannat R., Akter Y., Shahjahan Md. 2020.** Acute effects of chromium on hemato-biochemical parameters and morphology of erythrocytes in striped carfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Toxicology Reports*. **7**: 664-670.
- Jarup L. 2003.** Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, **68**: 167-182.
- Jawad L.A., Al-Mukhtar M.A., Ahmed H.K. 2004.** The relationship between haematocrit and some biological parameters of the Indian shad, *Tenulosa ilisha* (family Clupeidae). *Animal Biodiversity and Conservation*, **27**:47-52.
- Karadede, H., Oymak S.A., Ünlü E., 2004.** Heavy metals in mullet, *Liza abu*, and Catfish, *Silurus triostegus*, from the Ataturk Dam Lake (Euphrates), Turkey. *Environment International*, **30**: 183-188.
- Karbassi R., Bayati I., Moattar F. 2006.** Origin and chemical partitioning of heavy metals in riverbed sediments. *International Journal of Environmental Science and Technology*, **3**: 35-42.

- Kay Stratford H. 1985.** Cadmium in aquatic food webs. *Residue Reviews*, **96**: 13-43.
- Khalil M., Faragallah. 2008.** The distribution of some leachable and Total heavy metals in core sediments of Manzala lagoon, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, **34**: 1-11.
- Kim J.H., Kang J.C. 2015.** The lead accumulation and hematological findings in juvenile rock fish *Sebastes schlegelii* exposed to the dietary lead (II) concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **115**: 33-39
- Kilgour B. 1991.** Cadmium uptake from cadmium – spiked sediments by four freshwater invertebrates. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **47**: 70-75.
- Kori-Siakpere O., Ikomi R.B., Ogbe M.G. 2012.** Variations in acid phosphatase and alkaline phosphatase activities in the plasma of the African Catfish: *Clarias gariepinus* exposed to sublethal concentrations of potassium permanganate. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, **1**: 170-174
- Kumar P., Prasad Y., Patra A.K., Swarup D. 2007.** Levels of Cadmium and Lead in Tissues of Freshwater Fish (*Clarias batrachus* L.) and Chicken in Western UP (India). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **79**: 396-400.

- Kuroshima R. 1992.** Cadmium accumulation in the mummichog, *Fundulus heteroclitus*, adapted to various salinities. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **49**: 680-685.
- Lamas S., Fernández J.A., Aboal J.R., Carballeira A., 2007.** Testing the use of juvenile *Salmo trutta* L. as biomonitors of heavy metal pollution in freshwater. *Chemosphere*, **67**: 221-228.
- Lushchak O.V., Kubrak O.I., Lozinsky O.V., Storey J.M., Storey K.B., Lushchak V.I. 2009.** Chromium(III) induces oxidative stress in goldfish liver and kidney. *Aquatic Toxicology*, **93**: 45-52.
- Maheshwaran R., Devapaul A., Muralidharan S. Velmurugan B., Ignacimuthu S. 2008.** Haematological studies of fresh water fish, *Clarias batrachus* (L.) exposed to mercuric chloride. *International Journal of Integrative Biology*, **2**: 1-52.
- Mahmoud U.M., Ebied A-B. M., Mohamed S.M. 2013.** Effect of lead on some haematological and biochemical characteristics of *Clarias gariepinus* dietary supplemented with lycopene and vitamin E. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, **5**: 67-89.
- Maisano M., Natalotto A., Cappello T., Giannetto A., Oliva S., Parrino V., Sanfilippo M., Mauceri A., 2016.** Influences of environmental variables on neurotransmission, oxidative system, and hypoxia signaling on two clam species from a Mediterranean coastal lagoon. *Journal of Shellfish Research*, **35**: 41-49.

- Manganaro A., Pulicanò G., Reale A., Sanfilippo M., Sarà G., 2009.** Filtration pressure bybivalves affects the trophic conditions in Mediterranean shallow ecosystems. *Chemistry and Ecology*, **25**: 467-478.
- Manganaro A., Pulicanò G., Sanfilippo M. 2011.** Temporal evolution of the area of Capo Peloro (Sicily, Italy) from pristine site into urbanized area. *Transitional Waters Bulletin*, **5**: 23-31.
- Mansour S.A., Sidky M.M. 2002.** Ecotoxicological studies 3. Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum, Governorate, Egypt. *Food Chemistry*, **78**: 15-22.
- Marchese M., Gagnetten A.M., Parma M.J., Pavé P.J. 2008.** Accumulation and elimination of chromium by freshwater species exposed to spiked sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **55**: 603.
- Marzouk, M., 1994.** Fish and environmental pollution. *Journal of Veterinary Medicine*, **42**: 51-52.
- Mastan S., Priya G.I., Babu E. 2008.** Haematological profile of *Clarias batrachus* (Linn.) exposed to sub-lethal doses of lead nitrate. *The Internet Journal of Hematology*, **6**.
- Maulvault A.L., Custodio A., Anacleto P., Reploho T., Pousao P., Nunes M.L., Diniz M., Rosa R., Marques A. 2016.** Bioaccumulation and elimination of mercury in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in a warmer environment. *Environmental Research*, **149**: 77-85.

- McCarthy F., Shugart L.R. 1990.** Biomarkers of environmental contamination. Lewis Pub., Chelsea USA.
- Milad A., Safari S., Yeganeh S., Satheesh Kumar P., Safaie P. 2017.** Hematological and biochemical profile of pike breeders (*Esox lucius* Linnaeus, 1758) from the Anzali Wetland, Caspian Sea. *Proceeding of the National Academy of Sciences India Section B Biological Sciences*, **87**: 1271-1276.
- Mishra A.K., Mohanty B. 2009.** Chronic exposure to sublethal hexavalent chromium affects organ histopathology and serum cortisol profile of a teleost, *Channa punctatus* (Bloch). *Science of the Total Environment*, **407**: 5031-5038.
- Motlagh S.P., Zarejabad A.M., Nasrabadi R.G., Ahmadifar E., Molaee M. 2012.** Haematology, morphology and blood cells characteristics of male and female Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Comparative Clinical Pathology*, **21**: 15-21.
- Nanda P., Bikkini A. 2016.** Haematological changes in fish *Heteropneustes fossilis* (Bloch) under vanadium stress. *Biolife*, **4**: 695-696.
- Nascimento N.F., Nakaghi L.S., Hilbig C.C., Ventura A.S., de Azevedo A.C., Dean A.F., Bombardelli R.A. 2016.** Influences of sex and age on the hematological profile of the *Jundiá* (silver catfish) *Rhamdia quelen*. *Journal of Aquatic Animal Health*, **28**:161-165.

- Nath K., Kumar N. 1987.** Effect of hexavalent chromium on the carbohydrate metabolism of a freshwater tropical teleost *Colisa fasciatus*. *Bulletin of Institute of Zoology Academia Sinica (Taipei)*, **26**: 245-248.
- NRC (National Research Council). 1993.** Nutrient requirements of fish. National Academy Press, Washington, District of Columbia, USA, Committee on Animal Nutrition. Board on Agriculture. NRC.
- O'Bryhim J.R., Adams D.H., Spaet J.L.Y., Mills G., Lance S.L. 2017.** Relationships of mercury concentrations across tissue types, muscle regions and fins for two shark species. *Environmental Pollution*, **223**: 323-333.
- Odum W.E. 1970.** Utilization of the direct grazing and plant detritus food chains by the Striped Mullet *Mugil cephalus*. Page 222-240 in A. Berkeley and J. J. Steele, editors. Marine food chains. University of California.
- Okbah M.A., El-Gammal M.I., Ibrahim M.S., Waheshi Y.A. 2020.** Geochemical speciation of trace metals in sediments of the northern Nile Delta Lake by sequential extraction technique. *Chemistry Ecology*, **36**: 236-255.
- Oruc E.O., Uner N. 2002.** Marker enzyme assessment in the liver of *Cyprinus carpio*. exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **16**: 182-188.

- Orun I., Dorucu M., Yazlak H. 2003.** Haematological parameters of three cyprinid fish species from Karakaya Dam Lake, Turkey. *Online Journal of Biological Sciences*, **3**: 320-328.
- Pacheco M., Santos M.A., Pereira P., Martínez J.I., Alonso P.J., Soares M.J., Lopes J.C. 2013.** EPR detection of paramagnetic chromium in liver of fish (*Anguilla anguilla*) treated with dichromate(VI) and associated oxidative stress responses-Contribution to elucidation of toxicity mechanisms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **157**: 132-140.
- Palaniappan P.L.R.M., Karthikeyan S. 2009.** Bioaccumulation and depuration of chromium in the selected organs and whole body tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* individually and in binary solutions with nickel. *Journal of Environmental Sciences*, **21**: 229-236.
- Parrino V., Cappello T., Costa G., Cannavà C., Sanfilippo M., Fazio F., Fasulo S., 2018.** Comparative study of haematology of two teleost fish (*Mugil cephalus* and *Carassius auratus*) from different environments and feeding habits. *European Zoological Journal*, **85**: 194-200.
- Patra R.C., Swarup D., Dwivedi S.K. 2001.** Antioxidant effects of atocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology*, **162**: 81-88.

- Paul N., Chakraborty S., Sengupta M. 2014.** Lead toxicity on non-specific immune mechanisms of freshwater fish *Channa punctatus*. *Aquatic Toxicology*, **152**: 105-112.
- Pedlar R.M., Ptashynski M.D., Wautier K.G., Evans R., Baron C.L., Klaverkamp J.F. 2002.** The accumulation, distribution and toxicological effects of dietary arsenic exposure in lake white (*Coregonus clupeaformis*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **131**: 73-91.
- Perera P.A.C.T., Kodithuwakku Suranga P., Sundarabarathy T.V., Edirisinghe U. 2015.** Bioaccumulation of Cadmium in Freshwater Fish: An Environmental Perspective. *Insight Ecology*, **4**: 1-12.
- Pickering A.D. 1993.** Growth and stress in fish production. In: Genetics in aquaculture, pp 51-63.
- Prado L.R.G.B., Felix C., Abessa D.M.S., Buruaem L.M., Abujamara L.D., Kirschbaum A.A., Turatti G.C.R., Ranzani-Paiva M.J.T., Correia A.T., Seriani R. 2015.** Hematological parameters and nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of *Achirus lineatus* (Pleuronectiformes: Achiridae). *Comparative Clinical Pathology*, **24**, 169-175.
- Ramalingam V., Vimaladevi V., Narmadaraji R., Prabakaran P. 2000.** Effect of lead on haematological and biochemical changes in fresh water fish *Cirrhina mrigala*. *Pollution Research*, **19**: 81-84.

- Ramesh F., Nagaranjan K. 2007.** Histopathological changes in gills of *Clarias batrachus* treated with sago effluent. *Journal of Experimental Zoology*, **10**: 169-171
- Rangsayatorn N., Kruatrachue M., Pokethitiyook P., Upatham E.S., Lanza G.R., Singhakaew S. 2004.** Ultrastructural changes in various organs of the fish *Puntius gonionotus* fed cadmium-enriched cyanobacteria. *Environmental Toxicology*, **19**:585-93.
- Ranzani-Paiva M.J., Ishikawa C.M. 1996.** Haematological characteristics of freshwater-reared and wild mullet, *Mugil platanus Günther* (Osteichthyes, Mugilidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, **13**: 561-568.
- Rao K.R.S., Bhaskar B.R., Rao D.P., Durga-prasad Y.V.K. 1989.** Hemograms of six marine teleosts from visakhapatnam coast [India]. *Proceeding of the Indian National Science Academy Part B Biological Sciences*, **55**: 103-106.
- Rashed M.N. 2001.** Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. *Environment International*, **27**: 27-33.
- Reid S.D. 2011.** Molybdenum and chromium. Academic Press, New York, USA. 144.
- Rios F.S., Oba E.T., Fernandes M.N., Kalinin A.L., Rantin F.T. 2005.** Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Chara,

ciformes, Erythrinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **140**: 281-287.

Risso-de-faverney C., Devaus A., Lafaurie M., Girard J.P., Bailly B., Rahmani R. 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquatic Toxicology*, **53**: 65-76.

Romeo M., Bennani N., Gnassia-Barelli M., Lafaurie M., Girard J.P. 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology*, **48**: 185-194.

Satake F.; Pádua S.B. de, Ishikawa M.M. 2009. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica, in: Tavares-DiaS, M. (Org.). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá, pp. 330-345.

Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). 2008. Scientific opinion on the Safety of Dental Amalgam and Alternative Dental Restoration Materials for Patients and Users

Shahjahan M., Kitashahi T., Ogawa S., Parhar I.S. 2013. Temperature differentially regulates the two kisspeptin system in the brain of zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, **193**: 79-85.

Shahjahan M., Kitashahi T., Ando H. 2017. Temperature effects maturation through the control of kisspeptin, kisspeptin receptor, GnRH and GTH

subunit gene expression in the grass puffer during the spawning season.

General and Comparative Endocrinology, **243**: 138-145.

Sharma N.K., Akhtar M.S., Pandey N.N., Singh R., Singh A.K. 2017. Sex specific seasonal variation in hematological and serum biochemical indices of *Barilius bendelisis* from Central Himalaya, India. *Proceeding of the National Academy of Sciences India Section B Biological Sciences*, **87**: 1185-1197.

Sheikh Z.A., Ahmed I. 2016. Seasonal changes in hematological parameters of snow trout *Schizothorax plagiostomus* (Heckel 1838). *International Journal of Fauna and Biological Studies*, **3**: 33-38

Shukla S., Gautam R.K. 2004. Histopathological changes in the kidney of *Clarias batrachus* exposed to nuvan. *Flora and Fauna*, **10**: 39-40.

Singh A.P., Singh A.K., Singh J.P.N. 2007. Cadmium induced changes on the secretion of branchial mucous cells of peppered loach, *Lepdocephalichthys guntea*. *Journal of Experimental Zoology*, **10**: 65-68.

Small B.C. 2004. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose, and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. *Aquaculture*, **238**: 469-481.

Southworth G.R., Peterson M.J. Adams S.M., Baylock B.G., 1994. Estimation of appropriate background concentrations for assessing mercury contamination in fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **53**: 211-218.

- Spinelli A., Capillo G., Faggio C., Vitale D., Spanò N. 2018.** Returning of *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758) (Syngnathidae) in the Faro Lake-oriented Natural Reserve of Capo Peloro, Italy. *Natural Product Research*, **34**: 1-4.
- Sumet, H.D. Blust. R. 2001.** Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **48**: 255-262.
- Tang Y., Peng X., Fang J., Cui H.M., Zuo Z.C., Deng J.L. 2015.** Characterization of hematological parameters and blood cells of cultured *Gymnocypris eckloni* Herzenstein, 1891. *Journal of Applied Ichthyology*, **31**: 931-936.
- Tao S., Liu C, Dawson R., Long A., Xu F. 2000.** Uptake of cadmium adsorbed on particulates by gills of goldfish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **47**: 306-313.
- Thomas D.G., Solbe J.F., de J. Kay L.G., Cryer A. 1983.** Environmental cadmium is not sequestered metallothione in in rainbow trout. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **110**: 584-592.
- Thophon S., Kruatrachue M., Upatham E.S., Pokethitiyook P., Sahaphong S., Jaritkhuan S. 2003.** Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcalifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*, **121**: 307-320.

- Vander Oost R., Beyer J., Verneykebm N.P.E. 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **13**: 57-149.
- Velma V., Vutukuru S.S., Paul B.T. 2009.** Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: A critical review. *Reviews of Environmental Health*, **24**:129-45.
- Vera-Candioti J., Soloneski S., Larramendy M.L. 2011.** Acute toxicity of chromium on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). *Theoria*, **20**: 81-88.
- Verburg van Kemenade B.M.L., Nowak B., Engelsma M.Y., Wyets F.A.A. 1999.** Differential effects of cortisol on apoptosis and proliferation of carp B-lymphocytes from head kidney, spleen and blood. *Fish Shellfish Immunology*, **9**: 405-415.
- Verstraeten S.V., Aimo, L., Oteiza P.I. 2008.** Alumium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Archives of Toxicology*, **82**: 789-802.
- Vesey D.A. 2010.** Transport pathways for cadmium in the intestine and kidney proximal tubule: Focuson the interaction with essential metals. *Toxicology Letters*, **198**: 13-19.
- Vigliano F.A., Araujo A.M., Marcaccini A.J., Marengo M.V., Cattaneo E., Peirone C., Dasso L.G.M. 2014.** Effect of season and sex in haematological parameters and cellular composition of spleen and head

- kidney of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **40**: 417-426.
- Vinodhini R., Narayanan M. 2008.** Bioaccumulations of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). *International Journal of Environmental Science and Technology*, **5**: 179-182.
- Yang H., Rose N.L. 2003.** Distribution of Hg in the lake sediments across the UK. *Science of the Total Environment*, **304**: 391-404.
- Wagner A., Boman, J. 2003.** Biomonitoring of trace elements in muscle and liver tissue of freshwater fish. *Spectrochimica Acta Part B*, **58**: 2215-2226.
- Weinberg S.R., LoBue J. S.C.D., Gordon A.S. 1976.** Hematopoiesis of the kissing gourami (*Helostoma temminckii*). Effects of starvation, bleeding and plasma-stimulating factors on its erythropoiesis. *Canadian Journal of Zoology*, **54**: 1115-1127.
- Wendelaar Bonga S.E. 1997.** The stress response in fish. *Physiological Reviews*, **77**: 591-625.
- Wise D.J., Tomass J.R., Gatlin D.M. III, Bai S.C., Blazer V.S. 1993.** Effects of dietary selenium and vitamin E on red blood cell peroxidation, glutathione peroxidase activity, and macrophage superoxide anion production in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, **5**: 177-182.

- Witeska M. 2005.** Stress in fish hematological and immunological effects of heavy metals. *Electronic Journal of Ichthyology*, **1**: 35-41.
- World Health Organization (WHO). 1990.** Chromium, Nickel and Welding. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, France.
- World Health Organization (WHO). 1992.** Cadmium. Environmental Health Criteria 134. World Health Organisation, International Programme on Chemical Safety (IPCS), Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (WHO). 2003.** Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. Concise International Chemical Assessment Document 50. Geneva
- Zelikoff J.T., Raymond A., Carlson E., Li Y., Beaman J.R., Anderson M. 2000.** Biomarkers of immunotoxicity in fish: from the lab to the ocean. *Toxicology Letters*, **112-113**: 325-331.
- Zaki M.S., Sharaf N.E., Osfor M.H. 2010.** Effect of vanadium toxicity in *Clarias lazera*. *Journal of American Science*, **6**: 291-296.
- Zhai Q., Wang H., Tian F., Zhao J., Zhang H., Chen W. 2017.** Dietary *Lactobacillus plantarum* supplementation decreases tissue lead accumulation and alleviates leadtoxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, **48**: 5094-5103.

- Zhu B., Wang Q., Shi X., Guo Y., Xu T., Zhou B. 2016.** Effect of combined exposure to lead and decabromodiphenyl ether on neurodevelopment of zebrafish larvae. *Chemosphere*, **144**: 1646-1654.
- Zhu P., Tang Y., Fan J., Fang J., Peng X., Cui H. 2017.** Hematological parameters and blood cell morphology of male and female *Schizothorax (Racoma) davidi* (Sauvage). *Journal of the World Aquaculture Society*, **48**: 821-830.
- Zutshi B., Prasad S.G.R., Nagaraja R. 2010.** Alteration in hematology of *Labeo rohita* under stress of pollution from Lakes of Bangalore, Karnataka, India. *Environmental Monitoring and Assessment*, **168**: 11-19.

2.	MATERIALI E METODI.....	31
2.1.	<i>Area di studio.....</i>	31
2.2.	<i>Periodo di campionamento.....</i>	35
2.3.	<i>Disegno sperimentale.....</i>	35
2.4.	<i>Prelievo di sangue.....</i>	36
2.5.	<i>Indici biometrici.....</i>	38
2.6.	<i>Analisi ematologiche.....</i>	38
2.7.	<i>Analisi ematochimiche.....</i>	41
2.8.	<i>Analisi dei metalli pesanti nei tessuti.....</i>	41
2.9.	<i>Analisi dell'acqua e del sedimento.....</i>	45
3.	ANALISI STATISTICA.....	47
4.	RISULTATI.....	47
4.1.	<i>Acqua e sedimento.....</i>	47
4.2.	<i>Indici biometrici.....</i>	48
4.3.	<i>Parametri ematologici ed ematochimici.....</i>	48
4.4.	<i>Bioaccumulo stagionale e concentrazione dei metalli pesanti in Mugil cephalus.....</i>	50
5.	DISCUSSIONI.....	55

6. CONCLUSIONI.....	61
PROSPETTIVE FUTURE.....	62
RINGRAZIAMENTI.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	65