

Contaminazione da metalli pesanti nel gambero rosso della Louisiana *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) in una popolazione adulta del canale Gramicia (Ferrara)

MICHELE MISTRI, CRISTINA MUNARI, MICHELA ARGENTESI, FILIPPO SARTI,
ANTONELLA PAGNONI, TATIANA CHENET, LUISA PASTI & ALBERTO CAVAZZINI
Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche, Università di Ferrara - Via Fossato di Mortara 17 - Ferrara (Italy)
E-mail: michele.mistri@unife.it

RIASSUNTO

Il gambero rosso *Procambarus clarkii* è tra le “100 più dannose” specie invasive in Europa. In questo lavoro viene studiata una popolazione adulta di *P. clarkii* nel canale Gramicia (Ferrara) nell'estate 2017. Il rapporto tra i sessi è risultato 1:1. Sono state quindi determinate le concentrazioni di metalli pesanti (Cd, Pb, As, Cu e Zn) nei sedimenti superficiali e in vari tessuti del gambero: epatopancreas, esoscheletro e muscolo addominale. L'epatopancreas ha mostrato una maggiore concentrazione di metalli, in particolare Cu e Zn. L'applicazione dell'indice BASF mostra un bioaccumulo non proporzionale alle concentrazioni di metalli nell'ambiente per Cu e, in minor misura, per Zn. L'indice TCI ha fornito valori >1 solo per Cu. I risultati di questo studio indicano come *P. clarkii* agisca da accumulatore di alcuni metalli pesanti, con potenziali rischi derivanti dal loro trasferimento lungo la rete trofica dei sistemi di acqua dolce.

Parole chiave: *Procambarus clarkii*, Metalli pesanti, Bioaccumulo.

ABSTRACT

Trace element contamination in an adult population of Procambarus clarkii (Girard, 1852) from the Gramicia Canal (Ferrara, Italy)

The red swamp crayfish *Procambarus clarkii* is among the “100 of the worst” invasive aliens in Europe. The adult population of *P. clarkii* living in the Gramicia canal (Ferrara) was studied in summer 2017. Sex-ratio was 1:1. Concentrations of trace elements (Cd, Pb, As, Cu and Zn) were determined in superficial sediments and in hepatopancreas, exoskeleton, and abdominal muscle of crayfish. The hepatopancreas showed a higher concentration of metals, especially Cu and Zn. The application of the BASF index showed a bioaccumulation not proportional to the concentration of metals in the environment for Cu and, to a lesser extent, for Zn. The TCI index gave values >1 only for Cu. Results from this study suggest *P. clarkii* as a biomagnifier of certain trace elements, with potential risk for metal transfer along the trophic web in freshwater systems.

Key-words: *Procambarus clarkii*, Metalli pesanti, Bioaccumulo *Procambarus clarkii*, Heavy metals, Bioaccumulation.

INTRODUZIONE

L'introduzione e la diffusione di specie non indigene (NIS) è una questione di crescente preoccupazione, essendo una delle principali cause di perdita di biodiversità e deterioramento delle acque interne e marine (LEPPÄKOSKI *et al.*, 2002). Alimentato dalla globalizzazione, negli ecosistemi acquatici il numero di NIS introdotte continua ad aumentare (GALIL *et al.*, 2018) e, oltre alla perdita di popolazioni indigene, minaccia i processi ecosistemici, gli interessi economici, la salute pubblica e sostenibilità di molti servizi ecosistemici (SIMBERLOFF *et al.*, 2013). Il gambero rosso della Louisiana *Procambarus clarkii* Girard, 1852 (Decapoda, Astacidea, Cambaridae), è uno dei decapodi di acqua dolce che inducono gli impatti più negativi a livello mondiale. Originario del Messico nord-orientale e degli Stati Uniti centro-meridionali (HOBBS *et al.*, 1989), *P. clarkii* fu introdotto per scopi commerciali e nutrizionali in Spagna nel 1973 (GHERARDI & ACQUISTAPACE, 2007), dopo la drastica riduzione degli stock europei a causa della “peste del gambero”,

una malattia causata da *Aphanomyces astaci* SCHIKORA, 1906 (GHERARDI, 2006). *P. clarkii* è il gambero maggiormente diffuso e commercializzato al mondo (HOBBS *et al.*, 1989). La specie è particolarmente invasiva, esibendo caratteristiche r-selezionate con tassi di crescita rapidi (SCALICI & GHERARDI, 2007). È inoltre tollerante alle condizioni ambientali grazie al ciclo biologico altamente plastico (GUTIÉRREZ-YURRITA *et al.*, 1999). A causa della sua attività scavatrice, *P. clarkii* causa gravi danni alle aree agricole (ad es. risaie) e ai fiumi e laghi, dove può indebolire le sponde.

P. clarkii è incluso tra le “100 maggiormente dannose” specie aliene invasive in Europa (DAISIE, 2017), e figura nell'elenco delle specie esotiche invasive di rilevanza dell'Unione (UE 2017/1263) per le quali sono necessarie misure di gestione efficaci. La distribuzione di *P. clarkii* in Italia è concentrata principalmente nelle parti centrali della penisola (GHERARDI *et al.*, 2000; CHIESA *et al.*, 2006; AQUILONI *et al.*, 2010; SCALICI *et al.*, 2010; DÖRR & SCALICI, 2013), ma ci sono anche dati recenti nelle regioni settentrionali (PISCIA *et al.*, 2011; PERUZZA

et al., 2015; DONATO *et al.*, 2018) e meridionale (CILENTI *et al.*, 2017). Nel sistema idrico interno del Delta del Po l'occorrenza e la distribuzione del gambero *P. clarkii* è poco conosciuta (ROSSI *et al.*, 2006).

Gli invertebrati acquatici sono sensibili ai metalli nel loro ambiente e sono spesso utilizzati per valutare la qualità degli ecosistemi acquatici. Essi possono accumulare metalli direttamente dai sedimenti o dal cibo e, in base al loro ciclo vitale, alcune specie possono accumulare più elementi rispetto agli altri. Laddove presente, il gambero rosso della Louisiana è una componente importante della fauna acquatica, essendo spesso il predatore di maggiori dimensioni tra gli invertebrati nei loro habitat. *P. clarkii* è considerato un "ecosystem engineer" ed una "keystone species" (STATZNER *et al.*, 2003), ed è stato utilizzato come bioindicatore per determinare la biodisponibilità di metalli pesanti nell'ambiente (ALCORLO *et al.*, 2006; BELLANTE *et al.*, 2015; GORETTI *et al.*, 2016). Sono numerose le caratteristiche che rendono *P. clarkii* un ottimo modello: (i) sono abbastanza grandi da ottenere campioni da diversi organi, (ii) sono facilmente riconoscibili, (iii) hanno una vita relativamente lunga (2 anni), e, infine, (iv) si trovano in un livello trofico elevato nella catena alimentare, il che facilita la biomagnificazione dei metalli pesanti in quanto si nutrono di organismi contaminati a livelli trofici inferiori (ALCORLO *et al.*, 2006).

In questo studio presentiamo i primi dati relativi al bio-accumulo di metalli pesanti in diversi tessuti di *P. clarkii* nel canale Gramicia (Ferrara).

Arsenico, rame, cadmio, piombo e zinco sono stati misurati nel muscolo addominale, nell'esoscheletro e nell'epatopancreas di maschi adulti e nei sedimenti. *P. clarkii* è un organismo di grandi dimensioni e può presentare elevati carichi di metallo come conseguenza della vita relativamente lunga (alto potenziale di bioaccumulo), e posizione elevata nella catena alimentare (alto potenziale di biomagnificazione). Laddove gli esseri umani usano questi organismi come fonte di cibo, elevate concentrazioni di metalli pesanti possono costituire un sostanziale rischio per la salute pubblica (CAMPBELL, 1994).

MATERIALI E METODI

I campionamenti sono stati effettuati nel periodo Giugno-Luglio 2017 lungo il Gramicia (Fig. 1), un canale che scorre presso la città di Ferrara. Il canale, parzialmente tombinato, fa parte dell'ampio reticolo scolante del bacino del Burana ed è da esso alimentato. Il tratto considerato, a cielo aperto, ha una lunghezza di oltre 2 km e parzialmente costeggia il parco urbano della città. Quattro nasse cilindriche (60 cm di lunghez-



Fig. 1. Canale Gramicia (Ferrara).

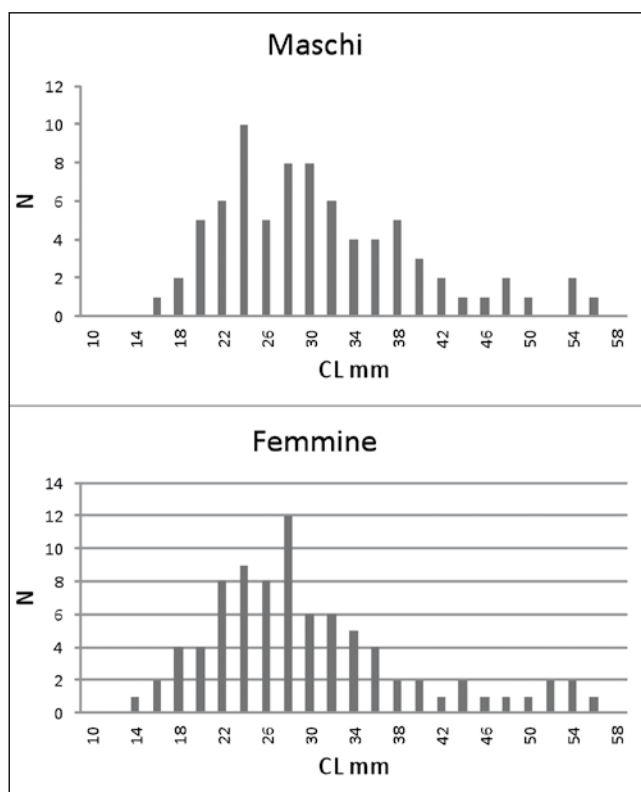


Fig. 2. Struttura per classi di taglia (2 mm) della popolazione di *Procambarus clarkii* del Gramicia suddivisa per sesso.

za), innescate con Caperlan Carp-fishing Boilies alla fragola, sono state immerse in quattro diversi punti di campionamento, alla distanza di qualche centinaio di metri l'una dall'altra. Le nasse sono state quindi recuperate 24 ore dopo. Una volta in laboratorio, i gamberi della Louisiana sono stati sacrificati mediante ipotermia e per ciascun esemplare è stato registrato il sesso e la lunghezza del carapace (CL), dalla punta del rostro al margine posteriore del cefalotorace, mediante un calibro di precisione (0,05 mm). Quindi sono stati presi casualmente 15 esemplari maschi e da ciascuno è stato rimosso l'epatopancares (EP), il tessuto muscolare dell'addome (MA), ed una porzione

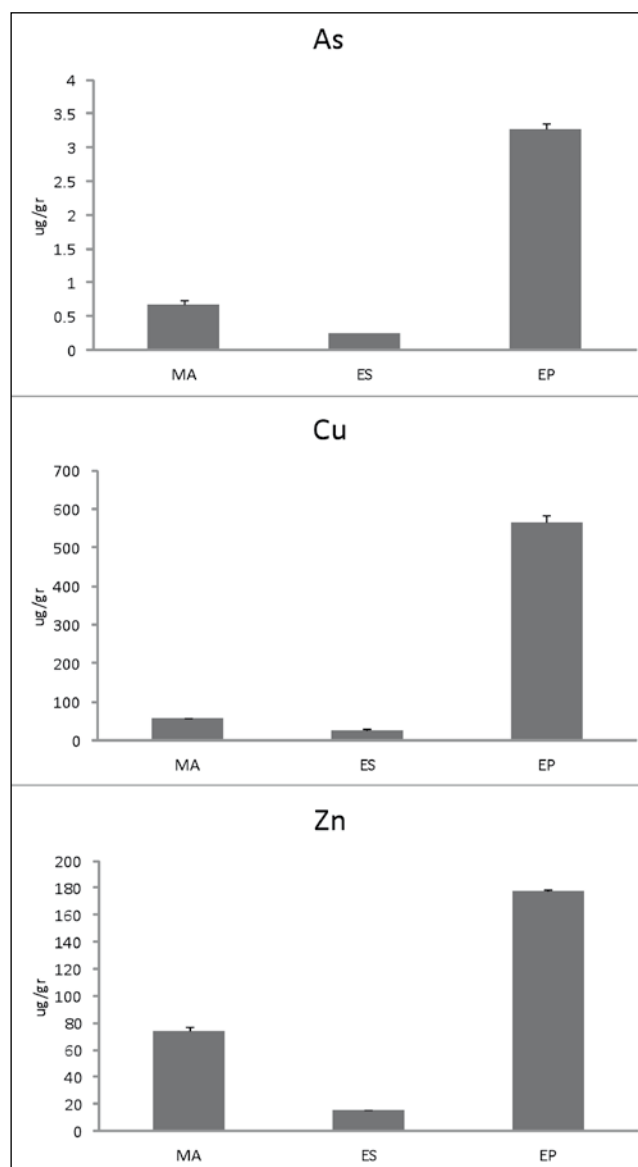


Fig. 4. Concentrazione media di As, Cu e Zn nel muscolo addominale (MA), esoscheletro (ES) ed epatopancares (EP) del gambero rosso della Louisiana presente nel Gramicia (le barre indicano la deviazione standard).

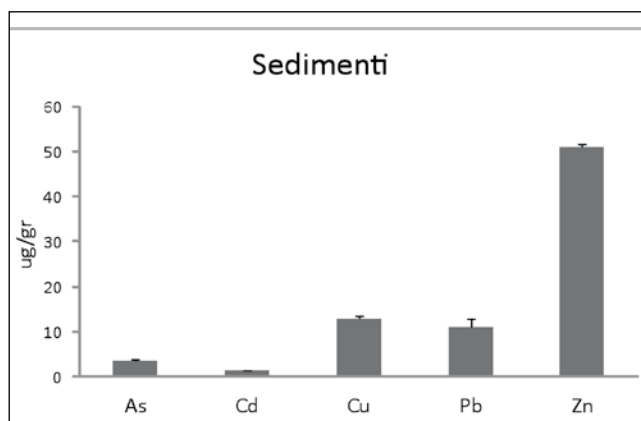


Fig. 3. Concentrazione media di As, Cd, Cu, Pb e Zn nei sedimenti del Gramicia (le barre indicano la deviazione standard).

di esoscheletro cefalotoracico (ES). I campioni di tessuto sono stati essiccati in stufa per 48 ore a 40 °C per la determinazione del peso. È stato anche raccolto un campione di sedimenti del Gramicia utilizzando una benna di Van Veen. In laboratorio, i sedimenti sono stati essiccati in stufa a 40 °C per 3 giorni.

I tessuti essiccati sono stati macinati usando mortaio e pestello prima di essere digeriti al microonde. A 0,25 gr di ciascun campione sono stati aggiunti 8 ml di HNO_3 (65% Sigma Aldrich) e 2 ml di H_2O_2 (30% Honeywell-Fluka), quindi posti in forno a microonde (Ethos Easy Advanced Microwave Digestion System, Milestone). La concentrazione di As, Cd, Cu, Pb, e Zn nei tessuti dei gamberi, e As nei sedimenti sono state misurate con uno spettrometro di assorbimento atomico Analyst 800 (Perkin-Elmer).

Le soluzioni standard per le curve di calibrazione sono state

preparate mediante diluizione di 1000 mg L⁻¹ di soluzione standard monoelementata per As, Cd, Pb, Cu e Zn (Trace Cert Fluka). I limiti di rilevabilità del metodo, valutati dalle curve di calibrazione di ciascun elemento, sono stati: Cd: 0,19 µg gr⁻¹; Pb: 0,51 µg gr⁻¹; Cu: 0,48 µg gr⁻¹; As: 0,25 µg gr⁻¹; Zn: 3,76 µg gr⁻¹. La determinazione di Cd, Pb, Cu e Zn nei sedimenti è stata effettuata mediante uno spettrometro di emissione ottica al plasma con accoppiamento induttivo Optima 3100 XL (Perkin-Elmer), con limiti di rilevabilità pari a Cd: 0,35 µg gr⁻¹; Pb: 0,43 µg gr⁻¹; Cu: 0,20 µg gr⁻¹; Zn: 0,32 µg gr⁻¹.

L'eventuale bioaccumulo di metalli pesanti nei tessuti del gambero rosso è stato valutato mediante l'applicazione dell'indice BSAF (Biota to Sediment Accumulation Factor; BURKHARD, 2009), basato sul rapporto tra la concentrazione di ciascun metallo nei vari tessuti dell'organismo e quella presente nel sedimento. Infine è stato applicato il "Toxic Contamination Index" (TCI; GORETTI *et al.*, 2016) per la valutazione del livello di tossicità di ciascun metallo. Il TCI viene calcolato mediante:

$$TCI_{met} = \log [(HEP) 2 / PEC \times (ABD)]$$

dove PEC è la "Probable Effect Concentration" di ciascun metallo (MAC DONALD *et al.*, 2000); (HEP) e (ABD) sono le concentrazioni del metallo nell'epatopancreas e nel muscolo addominale, rispettivamente.

RISULTATI

Nel periodo di studio sono stati catturati 161 gamberi rossi: 77 maschi e 84 femmine, con un rapporto sessi 1:1 (test χ^2). Le dimensioni sono risultate comprese tra 16 e 56 mm CL per i maschi, e tra 14 e 56 mm CL per le femmine. La Fig. 2 riporta la struttura della popolazione di *Procambarus clarkii* del Gramicia per classi di taglia di 2 mm, suddivisa per maschi e femmine.

Il contenuto medio in metalli pesanti dei sedimenti del Gramicia è riportato in Fig. 3. I valori massimi sono stati riscontrati per Zn (51,1±0,6 µg gr⁻¹), Cu (12,8±0,7 µg gr⁻¹) e Pb (11,0±2,0 µg gr⁻¹). Per quanto riguarda i gamberi, la concentrazione di Cd e Pb è risultata inferiore al limite di rilevabilità (0,19 e 0,51 µg gr⁻¹ rispettivamente) nel muscolo addominale (MA) e nell'esoscheletro (ES). Nell'epatopancreas tali metalli hanno mostrato valori pari a 0,31±0,01 µg gr⁻¹ e 0,83±0,15 µg gr⁻¹ rispettivamente. La Fig. 4 mostra i valori medi riscontrati relativi alla concentrazione di Cu, As e Zn nei 3 tessuti considerati. Si nota come la concentrazione di tutti e 3 i metalli sia significativamente (ANOVA ad una via, P<0,01) più elevata nell'epatopancreas rispetto agli altri tessuti. L'indice BSAF ha mostrato valori superiori all'unità per Cu e Zn nel muscolo

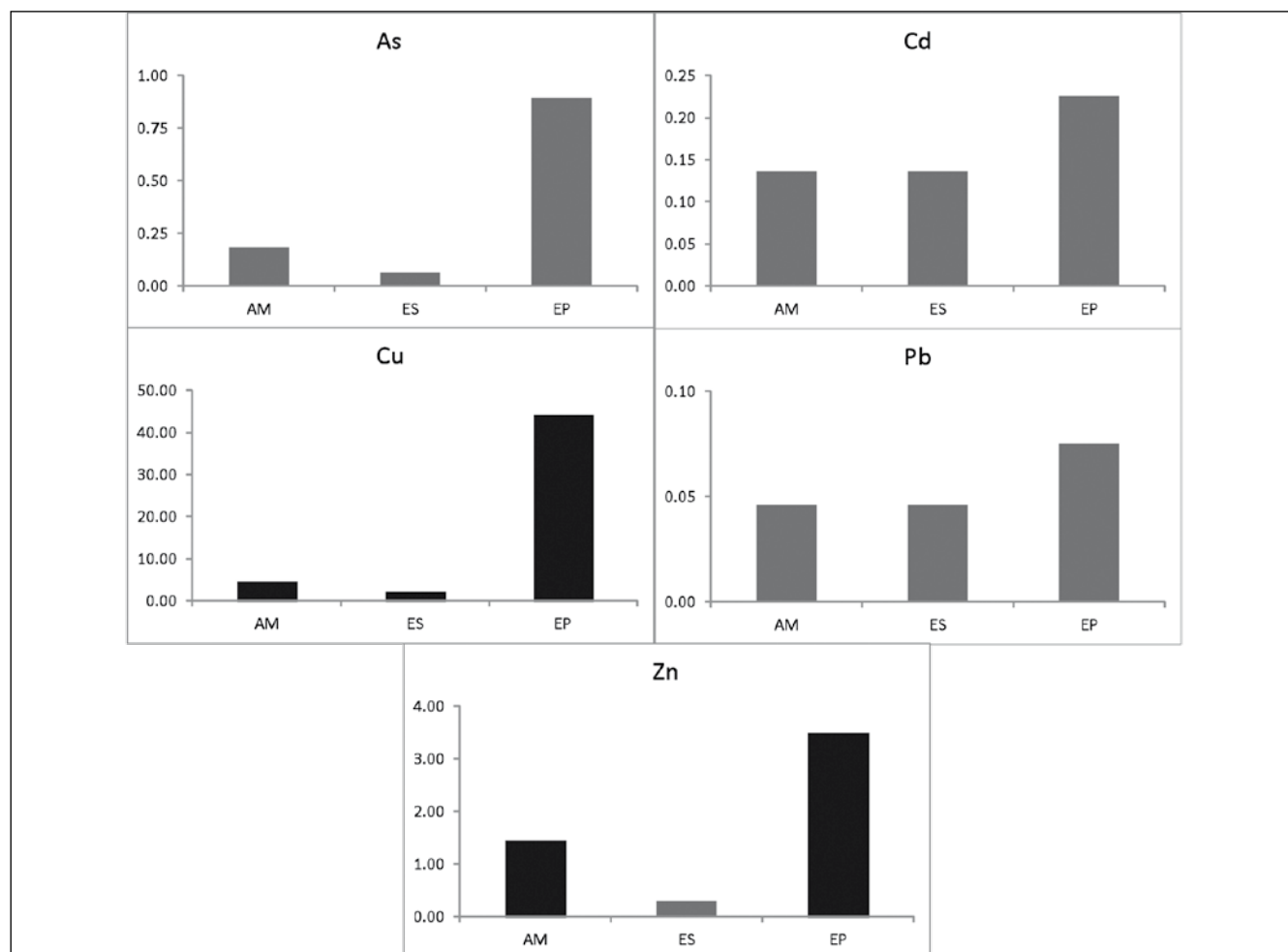


Fig. 5. Valori dell'indice BSAF (Biota to Sediment Accumulation Factor) per i metalli pesanti considerati (AM: muscolo addominale, ES: esoscheletro, EP: epatopancreas). In rosso sono evidenziati i valori BSAF>1.

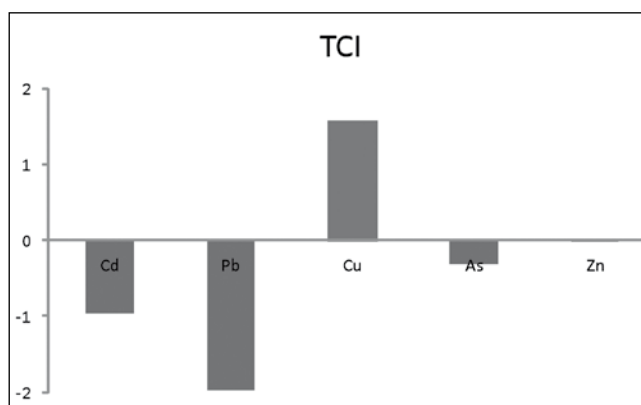


Fig. 6. Valori dell'indice TCI (Toxic Contamination Index) per i metalli pesanti considerati. In rosso sono evidenziati i valori TCI>1.

addominale e nell'epatopancreas (Fig. 5) (EP: $BSAF_{Cu}=44,1$) di tali metalli in questi tessuti. Infine il calcolo dell'indice TCI (Fig. 6) ha fornito valori superiori all'unità (indice di contaminazione) solo per Cu (TCI=1,57).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La popolazione di gambero rosso *Procambarus clarkii* del canale Gramicia è risultata essere composta principalmente da adulti. L'assenza di esemplari delle classi dimensionali minori (<14 mm CL) può essere una conseguenza del nostro metodo di cattura: i gamberi più piccoli potrebbero non essere stati attratti dall'esca, dal momento che hanno una dieta diversa, oppure potrebbero essere meno mobili e abbandonare le loro tane meno frequentemente, o entrambe le cose. La popolazione del Gramicia ha mostrato un rapporto sessi pari a 1:1, come osservato in altre località dell'Italia centrale (SCALICI & GHERARDI, 2007; DÖRR & SCALICI, 2013). Tuttavia, il rapporto sessi in *P. clarkii* pare mostrare una notevole variabilità geografica: ANASTACIO E MARQUES (1995) hanno trovato un incremento significativo nel numero di femmine all'interno delle popolazioni di gambero rosso all'aumentare della latitudine.

Il D.Lgs 152/2006 definisce i limiti per la concentrazione dei metalli pesanti nei sedimenti: 20 mg kg⁻¹ per As, 120 per Cu, 2 per Cd, 100 per Pb, 150 per Zn. I sedimenti del Gramicia hanno mostrato concentrazioni inferiori ai limiti prefissati dal D.Lgs. per tutti i metalli considerati. Tuttavia, nonostante le concentrazioni inferiori alla soglia legislativa, i gamberi rossi del Gramicia hanno accumulato (anche in modo massiccio) alcuni metalli pesanti (As, Cu e Zn principalmente) in tutti i loro tessuti, ed in particolar modo nell'epatopancreas. L'epatopancreas è un organo coinvolto in una varietà di processi fisiologici che includono la secrezione di succhi digestivi e la detossificazione e stoccaggio dei metalli pesanti (ICELY E NOTT, 1992). L'epatopancreas possiede la capacità di concentrare i metalli dall'emolinfa e dal tubo digerente e sequestrarli nei vacuoli intracellulari (ROLDAN E SHIVERS, 1987), ed è l'organo principale della detossificazione nei decapodi oltre alla ghiandola antennale. Il muscolo addominale viene riportato in letteratura come il tes-

suto generalmente contenente la più bassa concentrazione di metalli (ANDERSON *et al.*, 1997). I nostri risultati in linea di massima concordano con questi autori, e questo costituisce un fatto di particolare rilevanza per la salute umana in quanto il muscolo addominale costituisce la parte edibile.

Nei decapodi, l'uptake di Cu e Zn viene regolato in più modi: trasporto specifico mediato da un carrier, trasporto attraverso canali proteici, diffusione passiva dei metalli liposolubili, ed endocitosi (RAINBOW, 1997). Zn è un centro attivo per i metalloenzimi e attivatori di altri sistemi enzimatici quali anidrasi carbonica, mentre Cu è parte integrante del sistema respiratorio. In qualità di metalli essenziali, essi sono soggetti a forte regolazione, essendo detossificati dalle metallothioneine (CANLI *et al.*, 1997), eliminati mediante escrezione via feci o urina, e via emolinfa attraverso l'escrezione da organi o branchie (ARUMUGTAN & RAVINDRANATH, 1987). Per questo motivo, Cu e Zn si ritrovano in elevate concentrazioni nei tessuti dei gamberi, indipendentemente dalla concentrazione presente nell'ambiente. Tuttavia, quando la concentrazione ambientale è elevata, il bioaccumulo di Cu e Zn aumenta notevolmente nei tessuti dei crostacei (MAC DONALD *et al.*, 2000). Nei gamberi del Gramicia, la concentrazione di Zn nell'epatopancreas è risultata oltre 3 volte superiore rispetto a quella nel sedimento, nel muscolo circa 1,5 volte superiore, mentre nell'esoscheletro circa 2/3 inferiore rispetto ai sedimenti. Il contenuto di Cu nell'epatopancreas è risultato essere oltre 40 volte più alto che nei sedimenti, nel muscolo 5 volte superiore, e persino nell'esoscheletro la concentrazione di Cu è risultata doppia rispetto ai sedimenti. Sebbene la UE non stabilisca un valore di concentrazione soglia per Cu e Zn relativamente al consumo umano di gamberi, altre normative nazionali stabiliscono limiti massimi: Cu a 20 mg kg⁻¹ in peso umido (Spagna: Boletín Oficial de Estado 195, 15/8/1991), e Zn a 70 mg kg⁻¹ in peso umido (USA: US Food and Drugs Administration). La conversione di questi valori soglia in peso secco (RIGLER AND DOWNING, 1984) evidenzia che il limite massimo per Cu diventa 6,1 mg kg⁻¹, e per Zn 21,2 mg kg⁻¹. Le concentrazioni di Cu e Zn nella muscolatura addominale di *P. clarkii* nel Gramicia sono risultate ben al di sopra di tali valori.

Il livello di tossicità di un sito può essere dato dall'entità del rapporto tra i valori di concentrazione di metalli in tessuti con attività detossificante elevata e scarsa, nel nostro caso rispettivamente epatopancreas e muscolo addominale di *P. clarkii*.

Per quanto riguarda la distribuzione tissutale di Cu in vari organismi, è noto che almeno il 50-60% del Cu nei decapodi è immagazzinato nell'emolinfa (DEPLEDGE E BJERREGAARD, 1989). L'emocianina, che è il principale costituente dell'emolinfa, presenta un atomo di Cu nella sua struttura. Un esempio di come uno stress ambientale possa influenzare la composizione delle proteine emolinfatiche è stato osservato da DEPLEDGE E BJERREGAARD (1989): in decapodi esposti ad uno shock osmotico la concentrazione dell'emocianina è quasi raddoppiata entro 48 ore, aumentando da 15-20 mg mL⁻¹ a 35 mg mL⁻¹, con un aumento di Cu emolinfatico da 27 µg mL⁻¹ a 62 µg mL⁻¹. Le condizioni ambientali del Gramicia sono sicuramente molto stressanti, con escursioni termiche annuali di oltre 30°C ed acqua ipossiche molto frequenti. Si ipotizza che la elevata concentrazione di Cu in tutti i tessuti di *P. clarkii* possa essere

una risposta alle condizioni ambientali. Tali ipotesi potrebbero essere avvalorate dai risultati ottenuti mediante l'applicazione dall'indice TCI (GORETTI *et al.*, 2016), risultato superiore all'unità per Cu.

In questo studio, il contenuto di alcuni metalli pesanti nei vari tessuti di *P. clarkii* del canale Gramicia pare non essere strettamente dipendente dalle concentrazioni rilevate nei sedimenti. Cu e Zn sono stati trovati in elevate concentrazioni per la capacità di *P. clarkii* di regolarne i livelli probabilmente in risposta a stress fisiologici. È dunque necessario riconsiderare il ruolo del gambero rosso nelle comunità acquatiche, non solo come potenziale pericolo per le specie autoctone, ma anche come vettore di inquinanti, in quanto può trasferire un elevato contenuto di metalli pesanti ai livelli trofici superiori.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori desiderano ringraziare un revisore anonimo, i cui suggerimenti hanno contribuito a migliorare la qualità del manoscritto.

BIGLIOGRAFIA

- ALCORLO P., OTERO M., CREHUET M., BALTANÁS A. & MONTES C. 2006 - The use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadimar (SW, Spain). *Science of the Total Environment*, 366: 380-390.
- ANASTACIO P.M. & MARQUES J.C., 1995 - Population biology and production of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) in the lower Mondego river valley, Portugal. *Journal of Crustacean Biology*, 15: 156-168.
- ANDERSON M.B., PRESLAN J.E., JOLIBOIS L., BOLLINGER J.E. & GEORGE W.J., 1997 - Bioaccumulation of lead nitrate in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Journal of Hazardous Materials*, 54: 15-26.
- AQUILONI L., TRICARICO E., GHERARDI F., 2010 - Crayfish in Italy: distribution, threats and management. *International Aquatic Research*, 2: 1-14.
- ARUMUGTAN M. & RAVINDRANATH M.H., 1987 - Copper toxicity in the crab, *Scylla serrata*, Cu levels in tissues and regulation after exposure to a Cu rich medium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 39: 708-715.
- BELLANTE A., MACCARONE V., BUSCAINO G., BUFFA G., FILICIOTTO F., TRAINA A., DEL CORE M., MAZZOLA S. & SPROVIERI M., 2015 - Trace element concentrations in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and surface sediments in Lake Preola and Gorgi Tondi natural reserve, SW Sicily. *Environmental Monitoring Assessment*, 187: 1-18.
- BURKHARD L., 2009 - *Estimation of Biota Sediment Accumulation Factor (BSAF) from Paired Observations of Chemical Concentrations in Biota and Sediment (Final Report)*. U.S. Environmental Protection Agency, Ecological Risk Assessment Support Center, Cincinnati, OH, EPA/600/R-06/047.
- CAMPBELL K.R., 1994 - Concentrations of heavy-metals associated with urban runoff in fish living in stormwater treatment ponds. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27: 352-356.
- CANLI M., STAGG R.M. & RODGER G., 1997 - The induction of metallothionein in tissues of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* following exposure to Cd, Cu, and Zn: the relationships between metallothionein and the metals. *Environmental Pollution*, 96, 343-350.
- CILENTI L., ALFONSO G., GARGIULO M., CHETTA F.S., LIPAROTO A., D'ADAMO R. & MANCINELLI G., 2017 - First records of the crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Decapoda, Cambaridae) in Lake Varano and in the Salento Peninsula (Puglia region, SE Italy), with review of the current status in southern Italy. *BioInvasions Records*, 6: 153-158.
- CHIESA S., SCALICI M. & GIBERTINI G., 2006 - Occurrence of allochthonous freshwater crayfishes in Latium (Central Italy). *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 380-381: 883-902.
- DEPLEDGE M.-H. & BJERREGAARD P., 1989 - Haemolymph protein composition and copper levels in decapod crustaceans. *Helgoländer Meeresuntersuchen*, 43: 207-223.
- DONATO R., ROLLANDIN M., FAVARO L., FERRARESE A., PESSANI D. & GHIA D., 2018 - Habitat use and population structure of the invasive red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) in a protected area in northern Italy. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 419, 12.
- DÖRR A.J.M. & SCALICI M., 2013 - Revisiting reproduction and population structure and dynamics of *Procambarus clarkii* eight years after its introduction into Lake Trasimeno (Central Italy). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 408: 10.
- GALIL B.S., MARCHINI A. & OCCHIPINTI-AMBROGI A., 2018 - East is east and West is west? Management of marine bioinvasions in the Mediterranean Sea. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 201: 7-16.
- GHERARDI F., 2006 - Crayfish invading Europe: the case study of *Procambarus clarkii*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 39: 175-191.
- GHERARDI F. & ACQUISTAPACE P., 2007 - Invasive crayfish in Europe: the impact of *Procambarus clarkii* on the littoral community of a Mediterranean lake. *Freshwater Biology*, 52: 1249-1259.
- GHERARDI F. & BARBARESI S., SALVI G., (2000) - Spatial and temporal patterns in the movement of *Procambarus clarkii*, an invasive crayfish. *Aquatic Sciences* 62, 179-193.
- GORETTI E., PALLOTTINI M., RICCIARINI M.I., SELVAGGI R. & CAPPELLETTI D., 2016 - Heavy metals bioaccumulation in selected tissues of red swamp crayfish: an easy tool for monitoring environmental contamination levels. *Science of the Total Environment*, 559: 339-346.
- GUTIÉRREZ-YURRITA P.J. & MONTES C. 1999 - Bioenergetics and phenology of reproduction of the introduced red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in Doñana National Park, Spain, and implications for species management. *Freshwater Biology*, 42: 561-574.
- HOBBS H.H., JESS J.P. & HUNER J.V., 1989. A review of global crayfish introductions with particular emphasis on two north American species (Decapoda, Cambaridae). *Crustaceana*, 56: 299-316.
- ICELY J.D. & NOTT J.A., 1992 - Digestion and absorption: digestive systems and associated organisms. In: Harrison F.W., Humes A.G. (eds.). *Microscopic anatomy of invertebrates*, vol. 10. *Decapod crustacea*. New York: Wiley-Liss Inc., pp. 147-201.
- LEPPÄKOSKI E., GOLLASCH S. & OLENIN S., 2002 - Alien species in European waters. In: *Invasive aquatic species of Europe: distribution, impact and management*. E. Leppäkoski, S. Gollasch and S. Olenin (Eds), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- MAC DONALD D.D., INGERSOLL C.G. & BERGER T.A., 2000 - Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39: 20-31.
- PERUZZA L., PIAZZA F., MANFRIN C., BONZI L.C., BATTISTELLA S. & GIULIANINI P.G., 2015 - Reproductive plasticity of a *Procambarus clarkii* population living 10 °C below its thermal optimum. *Aquatic Invasions*, 10: 199-208.
- PISCIA R., VOLTA P., BOGGERO A., MANCA M., 2011 - The invasion of

- Lake Orta (Italy) by the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852): a new threat to an unstable environment. *Aquatic Invasions*, 6: S45-S48.
- RAINBOW P.S., 1997 - Ecophysiology and trace metal uptake in crustaceans. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 44: 169-175.
- RIGLER F.H. & DOWNING J.A., 1984 - The calculation of secondary production. In: DOWNING J.A., RIGLER F.H. (eds.), *A manual on methods for the assessment of secondary productivity in freshwaters*. IBP Handbook Vol. 17, Blackwell, Oxford, pp. 19-58.
- ROLDAN B.M. & SHIVERS R.R., 1987 - The uptake and storage of iron and lead in cells of the crayfish (*Orconectes propinquus*) hepatopancreas and antennal gland. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86C: 201-214.
- ROSSI R., LANZONI M., RIZZATI E., MANTOVANI S. & CASTALDELLI G., 2006 - Distribuzione del gambero rosso della Louisiana nel Delta del Po. *Il Pesce*, 1: 93.
- SCALICI M. & GHERARDI F., 2007 - Structure and dynamics of an invasive population of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in a Mediterranean wetland. *Hydrobiologia*, 583: 309-319.
- SCALICI M., CHIESA S., SCUDERI S., CELAURO D. & GIBERTINI G., 2010 - Population structure and dynamics of *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) in a Mediterranean brackish wetland (Central Italy). *Biological Invasions*, 12: 1415-1425.
- SIMBERLOFF D., MARTIN J.L., GENOVESI P., and other 11, 2013 - Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology and Evolution*, 28: 58-66.
- STATZNER B., PELTRET O. & TOMANOVA S., 2003 - Crayfish as geomorphic agents and ecosystem engineers: effect of a biomass gradient on baseflow and flood-induced transport of gravel and sand in experimental streams. *Freshwater Biology*, 48: 147-163.