



Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre

I Manuali di Ecotossicologia





ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre

I Manuali di Ecotossicologia

Autori:

Renato Baudo (CNR–ISE, Verbania)

Marco Faimali (CNR–ISMAR, Genova)

Fulvio Onorati (ISPRA)

David Pellegrini (ISPRA)

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e le persone che agiscono per conto dell'Istituto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questa pubblicazione.

Con la legge 133/2008 di conversione, con modificazioni, del decreto legge 25 giugno 2008, n. 112, pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale n. 195 del 21 agosto 2008, è stato istituito l'ISPRA – Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale. L'ISPRA svolge le funzioni che erano proprie dell'Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici (ex APAT), dell'Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica (ex INFS) e dell'Istituto Centrale per la Ricerca scientifica e tecnologica Applicata al Mare (ex I-CRAM).

ISPRA – Istituto Superiore per la protezione e la ricerca ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.it

ISPRA, Manuli e Linee Guida 67/2011

ISBN: 978-88-448-0498-5

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica: ISPRA

Grafica di copertina: Franco Iozzoli - ISPRA

Coordinamento tipografico Daria Mazzella - ISPRA - Settore Editoria

PREMESSA

Nell'ambito della Commissione UNICHIM "Qualità dell'acqua", Gruppo di Lavoro "Metodi Biologici", Sottogruppo "Acque salate/salmastre e sedimenti", nel 2005 sono stati costituiti una serie di gruppi tematici. Successivamente, all'interno di questi, è stata estesa la partecipazione a molti colleghi oltre il confine dell'associazione UNICHIM, costituendo una organizzazione autonoma di lavoro, su differenti argomenti legati all'ecotossicologia (nel testo verranno quindi citati semplicemente come "Gruppi").

In particolare, il Gruppo "Batterie, scale di tossicità e indici integrati", coordinato dal Dott. Renato Baudo, e del quale fanno parte i Coordinatori di tutti i Gruppi tematici: "Batteri", "Alghe", "Rotiferi", "Molluschi", "Policheti", "Crostacei", "Echinodermi", "Pesci", "Biomarkers", "Campionamento, matrici e ambienti", nonché il Coordinatore del Sottogruppo UNICHIM (referente ISPRA), ha avuto il compito di valutare, attraverso un esame critico della bibliografia internazionale e nazionale, nonché dell'attività degli stessi Gruppi, la possibilità di costituire una o più batterie di saggi biologici che consentano di effettuare una valutazione ecotossicologica dei sedimenti degli ambienti marino costieri e di transizione.

Inizia con questo primo volume una nova serie di manuali ISPRA "I Manuali di Ecotossicologia", per confermare finalmente una necessità operativa riguardo all'applicazione delle metodologie ecotossicologiche. La scelta di ISPRA si colloca in un momento storico nel quale, anche in Italia, vengono sempre più richieste indagini ambientali mirate per valutare gli effetti tossici sul complesso sistema biologico vivente.

Tali batterie di saggi biologici vengono quindi proposte alla comunità scientifica italiana, alle Agenzie Ambientali e a tutti i laboratori di eco tossicologia, per un loro possibile utilizzo nell'ambito di indagini ambientali di vario tipo, quali, tra gli altri, i programmi di monitoraggio della qualità delle acque marine costiere e di transizione, secondo quanto già previsto da differenti normative di settore. L'ambito normativo deve poter contare su riferimenti tecnici con solide basi scientifiche e su metodi di analisi ampiamente validati.

Va precisato che le indicazioni emerse dal presente volume non hanno e non possono avere validità di protocolli vincolanti, proprietà che potrà essere loro conferita solo con una eventuale adozione da parte delle Autorità competenti negli specifici ambiti applicativi.

Di seguito viene riportato l'elenco di tutti i collaboratori che fanno parte dei differenti "Gruppi di lavoro tematici", con le rispettive affiliazioni.

Il punto di partenza è quindi questo primo volume sulle "batterie di saggi biologici" a cui seguiranno manuali per singoli saggi come anche per metodologie legate ai biomarkers, nonchè ai metodi di analisi relativi a differenti prove biologiche in situ.

Una versione questa da aggiornare con i suggerimenti di tutta la comunità scientifica nazionale, delle Agenzie Ambientali e di tutti i laboratori di ecotossicologia interessati (vedi "Premessa operativa").

A nome di tutti gli autori, infine, considerati i ripetuti aggiornamenti operati negli ultimi mesi, mi scuso per eventuali errori o imperfezioni nella formattazione e organizzazione del testo, che invito comunque a segnalare.

Il referente ISPRA (Coordinatore del sottogruppo UNICHIM)

David Pellegrini

Elenco collaboratori e affiliazioni

Cognome	Nome	Ente	Gdl
Arizzi Novelli	Alessandra	ARTA Abruzzo - Pescara	4, 7, 9
Balzamo	Stefania	ISPRA - Roma	3
Bandini	Fabrizio	ARPA Emilia Romagna- Ravenna	1, 9
Baroncelli	Franco	ECOTOX srl - Pregnana Milanese	2,6, 9
Baudo	Renato	CNR Verbania	1,3,4,6, 7, 8,
Bellaria	Vanessa	ISPRA - Roma	6
Biandolino	Francesca	CNR - Taranto	6
Bigongiari	Nicola	CIBM - Livorno	5,6, 9
Bonaventura	Rosa	CNR IBIM Palermo	7
Buttino	Isabella	ISPRA - SZN - Livorno	6, 9
Cardente	Raffaella	ECOTOX srl - Pregnana Milanese	3,6, 9
Comin	Stefano	Arpa Veneto - Venezia	1,2,3
Conti	Daniela	ISPRA - Roma	2, 8
D'adamo	Raffaele	CNR - Istituto di Scienze Marine - Lesina (fg)	4
De Luca Piccione	Fabiano	Centro Ricerche Enea Portici (NA)	8
De Palmas	Federica	Fenice SPA - Rivoli (TO)	6
Del Prete	Francesco	UNI Napoli II	6
Delaney	Eugenia	Tethis Spa - Venezia	5,6
Della Torre	Camilla	ISPRA - Roma	1
Delneri	Ambra	SHORELINE Soc.Coop.ar.l. AREA Science Park, Trieste	9
Dentone	Letizia	ISPRA - Livorno	6
Di Capua	Elena	ARPAT -Dipartimento di Grosseto	8
Di matteo	Ombretta	CNR - Istituto di Scienze Marine - Lesina (fg)	4
Fabbri	Stefania	Enitecnologie - Monterotondo	1
Fabbrocini	Adele	CNR - Istituto di Scienze Marine - Lesina (fg)	4, 7
Faimali	Marco	CNR-ISMAR, Genova	6, 9
Falugi	Carla	Universita' di Genova	7
Faraponova	Olga	ISPRA - Roma	6, 9
Ferioli	Annalisa	ARPA Emilia Romagna - Ferrara	6
Floris	Bruno	ARPAS Sardegna, Cagliari	2,4,6
Francese	Marco	SHORELINE Soc.Coop.ar.l. AREA Science Park, Trieste	3,6, 8,9
Frisenda	Paola	SHORELINE Soc.Coop.ar.l. AREA Science Park, Trieste	3,6
Gartner	Ivano	ARPAT Toscana - Piombino	6
Gelli	Ferdinando	ARPA Emilia Romagna Sez. prov. Ferrara Laboratorio Integrato	8
Giacco	Elisabetta	Dip.Biologia UNI Ge	6, 8
Giuliani	Silvia	ISPRA - Roma	6, 7,9
Gorbi	Gessica	UNI Parma	6, 9
Grillo	Claudio	ARPA Liguria - La Spezia	6
Guerra	Roberta	Univ. BO - Bologna	1

Cognome	Nome	Ente	Gdl
Guida	Marco	Universita' Napoli - Napoli	6
Inglese	Mafalda	Universita' Napoli - Napoli	6
Kozinkova	Ludmilla	CIBM - Livorno	6, 7
Le Foche	Marco	Arpa Lazio	6
Leoni	Tristano	ARPA Marche, Macerata	1,6, 7, 9
Lera	Samantha	ISPRA - Livorno	4,6, 7, 9
Libralato	Giovanni	Universita' Ca' Foscari Venezia	4,6, 7,
Lo Re	Rita	Thetis Spa - Venezia	1,2
Losso	Chiara	Universita' Ca' Foscari, Dip. Scienze Ambientali - Venezia	4,6, 7, 9
Macchia	Simona	ISPRA - Livorno	4,5,6,
Manfra	Loredana	ISPRA - Roma	3,4,6, 9
Manzo	Sonia	C.r. Enea di Portici	1,7, 8, 9
Mariani	Livia	ISPRA - Roma	8, 9
Marino	Gisella	ARPA Sicilia	6
Martini	Paola	Arpa ER - Cesenatico	1
Masullo	Piero	UNI Federico II Dip. Scienze Biologiche Sez Fisiologia - Napoli	8
Matranga	Valeria	CNR IBIM Palermo	7
Mauro	Anna Maria	ARPA Sicilia	6
Mazziotti	Cristina	Arpa emr - Cesenatico	7
Mazzola	Angelo	Dip. Tecnico - ARPA Sicilia - Siracusa	8
Melchiorre	Nunzia	ARPA Liguria - La Spezia	6
Miglia	Emanuela	Fenice SPA - Rivoli (to)	6
Migliore	Luciana	Universita' Roma II - Roma	6
Modugno	Simone	ISPRA c/o ARPA ER-Ferrara	3,4,6
Molledo	Ginevra	ISPRA - Roma	4
Mugnai	Cristian	ISPRA - Roma	5, 9
Onorati	Fulvio	ISPRA - Roma	9
Palazzi	Donatella	ARPA Emilia Romagna Sez. prov. Ferrara Laboratorio Integrato .	2,4,6, 8
Pane	Luigi	Dip.Biologia UNI Ge	6
Pasteris	Andrea	Univ. Bologna, Scienze Ambientali - Ravenna	6, 9
Pellegrini	Elena	ARPA CALABRIA	3
Pellegrini	David	ISPRA - Livorno	4,5,6, 7, 9
Picone	Marco	Thetis Spa - Venezia	6
Pignataro	Lucrezia	Arpa Veneto - Venezia	1,2,3
Prato	Ermelinda	Istituto Ambiente Marino Costiero C.N.R. Taranto	4,6, 7, 9
Privitera	Davide	Universita' di Genova	7
Righini	Paolo	ARPAT Toscana - Livorno	6
Rossi	Enrico	ARPA Liguria - La Spezia	6
Sansone	Giovanni	UNI Federico II Dip. Scienze Biologiche Sez Fisiologia - Napoli	4,6, 8, 9
Sarni	Angela	ISPRA - Roma	2

Cognome	Nome	Ente	Gdl
Sartori	Davide	ISPRA - Livorno	7, 9
Savorelli	Federica	ARPA Emilia Romagna Sez. prov. Ferrara Laboratorio Integrato .	4,6, 8
Sbalchiero	Alfonso	ISPRA - Roma	3,4,5,6, 7, 9
Sbrilli	Giancarlo	ARPAT – Toscana, Dipartimento di Grosseto	2, 8, 9
Sei	Sandra	UNI Parma, Parma	6, 9
Simonini	Roberto	Dipartimento di Biologia Animale, Università Di Modena e Reggio Emilia- Modena	5,6
Sorrenti	Gerarda	CNR - Istituto di Scienze Marine, Lesina (fg)	4
Tornambè	Andrea	ISPRA - Roma	2, 9
Traldi	Daniele	SHORELINE Soc.Coop.ar.l. AREA Science Park, Trieste	1
Ultre	Marta	ECOTOX srl - Pregnana Milanese	1, 9
Valenti	Alessandra	ARPA Marche	6
Volpi Ghirardini	Annamaria	Dipartimento di Scienze Ambientali, Università Ca' Foscari - Venezia	1,4,5, 6, 7, 9

1	COMPONENTI GDL <i>BATTERI</i>
2	COMPONENTI GDL <i>ALGHE</i>
3	COMPONENTI GDL <i>ROTIFERI</i>
4	COMPONENTI GDL <i>MOLLUSCHI</i>
5	COMPONENTI GDL <i>POLICHETI</i>
6	COMPONENTI GDL <i>CROSTACEI</i>
7	COMPONENTI GDL <i>ECHINODERMI</i>
8	COMPONENTI GDL <i>PESCI</i>
9	COMPONENTI GDL <i>BATTERIE</i>

INDICE

PREMESSA	3
INTRODUZIONE	10
CAPITOLO 1:	14
CRITERI DI IDENTIFICAZIONE DELLE BATTERIE	14
1.1 - CARATTERISTICHE DEGLI AMBIENTI E DEI RELATIVI SUBSTRATI	14
1.2 - IDENTIFICAZIONE DEGLI OBIETTIVI DELL'INDAGINE ECOTOSSICOLOGICA (A, B, C, D, E, F, G, H, I)	17
1.3 - SELEZIONE DELLE MATRICI E DEI COMPARTI (I-V)	18
1.4 - SCELTA DEGLI ENDPOINT E DEGLI ORGANISMI	22
1.5 - SCELTA DEGLI ORGANISMI E MODALITÀ DI ESECUZIONE DEI SAGGI (A - H)	24
1.6 - APPLICAZIONI PER OBIETTIVI SPECIFICI	30
1.7 - CONCLUSIONI	38
CAPITOLO 2:	41
CRITERI DI GIUDIZIO PER LA VALUTAZIONE DELLA VALENZA ECOLOGICA E PRATICA DI BATTERIE DI SAGGI BIOLOGICI	41
2.1 - INTRODUZIONE	41
2.2 - VALENZA ECOLOGICA DELLA BATTERIA DI SAGGI BIOLOGICI	42
2.2.1 PREREQUISITI	42
2.2.2 PARAMETRI DA PONDERARE MEDIANTE GIUDIZIO ESPERTO	42
2.3 - VALENZA PRATICA DELLA BATTERIA DI SAGGI BIOLOGICI	49
2.4 - CONCLUSIONI	52
CAPITOLO 3:	54
IDENTIFICAZIONE DEGLI ORGANISMI E DEGLI ENDPOINT	54
3.1 - INTRODUZIONE	54
3.2 - BATTERI	54
3.3 - ALGHE	55
3.4 - ROTIFERI	57
3.5 - CROSTACEI	59
3.6 - MOLLUSCHI	66
3.7 - ECHINOIDI	70
3.8 - ANELLIDI POLICHETI	73
3.9 - PESCI	74
3.10 - CONCLUSIONI	76
CAPITOLO 4:	78
COMPOSIZIONE E VALUTAZIONE DELLE BATTERIE	78
4.1 - DRAGAGGI	78
4.1.1 BATTERIE PROPOSTE	78
4.2 - EFFLUENTI E AMBIENTI RECETTORI	87
4.2.1 - BATTERIE PROPOSTE	87
4.3 - MONITORAGGIO AMBIENTALE	95
4.4 - CONCLUSIONI	95
CAPITOLO 5:	96
SCALE DI TOSSICITÀ E INDICI INTEGRATI	96
5.1 - SCALE	96
5.2 - INDICE PROPOSTO	101
5.3 CONCLUSIONI	108

CAPITOLO 6:	109
SAGGI <i>IN SITU</i> IN AMBIENTE MARINO	109
6.1 – INTRODUZIONE	109
6.2 ALGHE	109
6.3 MACROFITE	111
6.4 POLICHETI	111
6.5 ANFIPODI	112
6.6 MOLLUSCHI	112
6.7 ECHINODERMI	113
6.8 PESCI	114
6.9 BIOSENSORI	114
6.10 UNITÀ DI COLONIZZAZIONE	115
6.11 CONCLUSIONI	116

INTRODUZIONE

Il Gruppo di lavoro del presente manuale ha innanzi tutto dovuto decidere se le batterie di saggi (composte di saggi prescritti e raccomandati) siano da considerarsi vincolanti, oppure se siano ammesse variazioni e combinazioni alternative di saggi ecotossicologici compatibili con i criteri di scelta identificati in questo documento e convalidate da opportuni Sistemi di Misura Basati sulle Prestazioni (Performance-Based Measurement Systems, PBMS).

Il primo tipo di approccio, una volta identificate e condivise le appropriate batterie, offre l'innegabile vantaggio di eliminare l'elemento di soggettività nella scelta delle combinazioni di saggi per i vari tipi di ambienti e quindi di permettere un confronto tra i risultati ottenuti da operatori diversi, consentendo una caratterizzazione ecotossicologica obiettiva dei vari ambienti investigati. Questa scelta è quella al momento favorita dagli operatori pubblici (es. ARPA), perché offre una chiara indicazione dell'impostazione da seguire per effettuare i controlli previsti per legge e consente una pianificazione, anche economica (conoscendo esattamente quali e quanti sono i saggi biologici richiesti), per assolvere ai compiti istituzionali. L'esperienza attuale, infatti, indica che il generico invito ad effettuare "saggi di tossicità" non meglio identificati in molti casi esita semplicemente nella mancata effettuazione dei saggi, "in attesa di disposizioni più dettagliate".

L'adozione dell'approccio più "integralista" delle batterie prefissate e vincolanti, che prevede cioè la massima standardizzazione dei protocolli metodologici, ha però un punto debole nella necessità di una verifica, dopo un congruo numero di applicazioni in casi concreti, della effettiva realistica delle risposte ottenibili con tali batterie. I saggi biologici previsti sono necessari e sufficienti, cioè le batterie sono effettivamente in grado di rilevare condizioni ambientali critiche?

Per questo i protocolli metodologici "ufficiali" (cioè quelli adottati dalle Autorità competenti) dovrebbero poter essere rivisti ogni volta che nuove evidenze sperimentali suggeriscano la necessità di cambiamenti nel tipo di organismi e/o saggi. Si lascerebbe così spazio alla sperimentazione di nuovi saggi biologici, ponendo però le batterie identificate come base del confronto sulla praticità di eventuali nuove soluzioni quali, ad esempio, accorgimenti sperimentali che semplificano i protocolli già identificati, oppure protocolli alternativi che danno maggiori garanzie di realistica e attendibilità in applicazioni di routine. In pratica, ciò significa che è opportuna l'attività di diversi "gruppi tematici" per raggruppamenti filogenetici di organismi, in ambito UNICHIM/ISPRA, che dovrebbe essere continua, valutando sistematicamente la possibilità di aggiungere e/o modificare i protocolli per i diversi organismi e, motivandone le ragioni, permettendo di proporre (alle Autorità competenti) variazioni alle batterie ogni volta che si rendano necessarie. Tuttavia, se si riuscirà a superare la naturale tendenza a sostenere i "propri" saggi biologici, a favore di una ottica olistica che privilegi le necessità degli operatori, piuttosto che esperienze di ricerca personali, questi cambiamenti non dovrebbero essere molto frequenti, una volta che, dopo una iniziale fase di sperimentazione, le batterie vincolanti risulteranno consolidate.

Ovviamente, un approccio più flessibile potrebbe limitarsi ad esempio all'indicazione dei comparti da investigare, per ciascuna delle combinazioni ambienti – obiettivi, ed a una lista di saggi "candidati" per ciascuno dei comparti. La scelta del numero e tipo di saggi da applicare a questi comparti sarebbe lasciata agli operatori. In questo caso, però, anche se la scelta fosse limitata ai soli possibili "candidati" alternativi identificati per una determinata batteria, ci si potrebbe aspettare che i diversi operatori adottino scelte (e quindi batterie) diverse, per tipo e numero di saggi, in funzione delle personali esperienze e/o considerazioni di economicità e praticità. Il confronto tra i risultati ottenuti da operatori diversi diventerebbe quindi difficile e, inevitabilmente, oggetto di contestazioni: ad esempio, potrebbero essere richiesti saggi alternativi, ritenuti meno severi e/o penalizzanti, da parte dei controllati, oppure saggi più sensibili, da parte di portatori di interessi particolari.

Sarebbe invece di utilità estremamente limitata una terza alternativa, e cioè l'indicazione da parte delle Autorità che dovessero eventualmente adottare e dare attuazione a questo documento, che le batterie identificate costituiscono semplicemente una esemplificazione, lasciando in sostanza all'operatore la scelta di adottare batterie "personalizzate". L'elemento di soggettività, in questo caso,

in buona parte svuoterebbe di contenuto il lavoro delle presenti Linee Guida, a meno di adottare contestualmente l'approccio alternativo alla completa standardizzazione, e cioè un Sistema di Misura Basato sulle Prestazioni.

L'approccio PBMS, raccomandato ad esempio da USEPA (2000a), prevede che la verifica del rispetto di regolamenti ambientali sia basato sulla dimostrazione delle prestazioni dei metodi di indagine. In sostanza, non è indispensabile che venga applicato un metodo standardizzato, ma bisogna dimostrare che il metodo utilizzato è in grado di rispettare, con adeguate precisione ed accuratezza, i criteri delle prestazioni.

Il sistema PBMS è stato per ora utilizzato, oltre che in campo economico, solo per metodi "maturi", come le analisi chimiche di contaminanti in acque e sedimenti: il laboratorio analizza, con il metodo preferito, standardizzato o meno, opportuni campioni artificiali (con aggiunte di analiti), dei quali ignora la composizione, preparati da una autorità di controllo. Tale autorità di controllo deve valutare (sulla base della "certificazione" del contenuto degli analiti di interesse) se il metodo utilizzato è in grado di determinare gli analiti con la accuratezza e precisione richieste, cioè se dimostra "prestazioni" adeguate a verificare il rispetto dei limiti di legge per quegli analiti ed in quelle matrici. Si supera così la necessità di utilizzare metodi standardizzati (anche questi devono comunque dimostrare di rispettare i criteri di prestazione), consentendo l'adozione di metodi alternativi che offrono vantaggi di praticità, economicità, sicurezza, diminuzione dei rifiuti tossici, ecc.

L'applicazione dei sistemi PBMS al caso del rilevamento di effetti tossici è molto più problematico, per le difficoltà di fissare i criteri di prestazione: la tossicità di un campione ambientale non è una caratteristica univoca, ma è comunque legata al sistema sperimentale utilizzato per la sua misura (un campione può risultare "tossico" per alghe o batteri, ma non per invertebrati o pesci, oppure per crostacei ma non per molluschi, o ancora per effetti subletali ma non per effetti letali).

Tuttavia, teoricamente sarebbe possibile preparare dei campioni artificiali contenenti tossici a varie concentrazioni (inferiori, più o meno coincidenti e superiori ai valori considerati "tossici") e verificare se una determinata batteria di saggi è in grado di classificare correttamente la tossicità di tali campioni, secondo una scala di tossicità che definisce i criteri di prestazione (stabiliti, in questo caso, sulla base di limiti, arbitrariamente derivati da dati di letteratura, per le acque ed i sedimenti). Ad esempio, si ipotizzi che, per la sostanza X in un campione acquoso, sulla base delle informazioni disponibili una NOEC (concentrazione massima per la quale non viene osservato un effetto significativo) = 1 ed una LOEC (concentrazione minima alla quale viene osservato un effetto statisticamente significativo) = 10 definiscano dei limiti sufficientemente protettivi per il 95 % delle specie per il 90 % del tempo; il sistema PBMS prevede che debbano essere saggiati, con la batteria di saggi proposta per la validazione, campioni con concentrazioni di $X \leq 1$, circa uguale a 10 e > 10 . I risultati devono rispettare i criteri sulle prestazioni, e cioè identificare correttamente come non tossico il primo campione, come tossico il secondo e come molto tossico il terzo.

Dunque, numero e tipo di saggi rimangono facoltativi, importa solo che la batteria rispetti i criteri di prestazione.

Sempre teoricamente, sarebbe inoltre possibile preparare campioni per sostanze tossiche di tipo diverso (inorganici, organici, mutageni, genotossici, ecc.), eventualmente anche in combinazione e verificare se e quando una data batteria di saggi biologici è in grado di identificare correttamente la loro tossicità.

La "filosofia" di questo approccio è allettante, perché supera appunto la necessità di standardizzare le batterie di saggi e consente la massima flessibilità, ma attualmente una sua concreta applicazione non pare realisticamente possibile e viene riportata in questo documento semplicemente per completare la rassegna delle opzioni possibili.

Sulla base di queste considerazioni, nelle presenti Linee Guida viene proposta non una sola batteria, ma un insieme di batterie di saggi biologici, diversificati in funzione degli obiettivi.

Ciascuna batteria comprende sia "saggi prescritti", sia "saggi raccomandati". Nel caso limitazioni di tempo od economiche consentano l'effettuazione di un numero limitato di saggi, questi dovranno essere almeno quelli indicati come prescritti. I saggi raccomandati dovrebbero, invece, essere effettuati

ogni volta che l'organizzazione del laboratorio lo consente, poiché forniscono informazioni supplementari non desumibili sulla base dei soli saggi prescritti.

Per l'identificazione dei saggi che compongono le singole batterie, viene data priorità a quelli per i quali sono disponibili protocolli metodologici già normati (standardizzati) od in corso di normazione secondo le procedure UNICHIM; tuttavia, la composizione delle singole batterie rimane aperta a successivi aggiornamenti e modifiche.

È auspicabile che la validità delle batterie proposte venga verificata con il sistematico utilizzo dei protocolli standardizzati da parte di un certo numero di soggetti (idealmente tutti gli operatori, incluse le ARPA) per un periodo di prova (ad esempio, un anno). Nel frattempo, continueranno ad essere condotti esercizi di interconfronto su ulteriori saggi, integrativi e/o sostitutivi di quelli già identificati, con campioni ambientali reali o, in alternativa, con campioni artificiali (una sorta di primitivo sistema PBMS di validazione delle batterie proposte), e più in generale i vari gruppi UNICHIM continueranno ad esaminare le nuove proposte che si renderanno disponibili in funzione di eventuali innovazioni metodologiche.

Al termine del periodo di prova sarà quindi possibile procedere ad una valutazione critica su praticità (impressioni degli operatori e interconfronti) e realismo (risultati delle sostanze tossiche di riferimento e confronto con classificazione chimica e monitoraggio biologico), che porterà a confermare/modificare i protocolli metodologici standardizzati, ed eventualmente a rivedere la composizione delle diverse batterie, se i risultati di alcuni saggi dovessero risultare ridondanti o carenti. L'attività consentirà, inoltre, di effettuare una analisi economica, determinando i costi dell'utilizzo dei diversi saggi e delle relative batterie, e soprattutto di stabilire se altri saggi, ritenuti più appropriati, avranno raggiunto la necessaria standardizzazione per una loro inclusione nelle batterie identificate.

In questa fase di verifica sarà importante concordare anche un sistema di indici e scale della tossicità. A questo proposito, nel Capitolo 2 è già descritta in dettaglio una proposta operativa per effettuare una valutazione obiettiva della scientificità e praticità delle batterie proposte e/o effettivamente utilizzate.

In sostanza, si ritiene che debba essere prevista una attività continuativa, nel quale il processo di formulazione delle batterie e loro successiva sperimentazione potrà/dovrà essere sistematicamente ripetuto, in un'ottica di aggiornamento continuo. Tale attività probabilmente richiederà dunque una istituzionalizzazione, cioè un ente od un consorzio che si assuma il compito ed i relativi oneri (raccolta dati, organizzazione degli interconfronti, elaborazione ed interpretazione hanno ovviamente dei costi) per la gestione di tali attività.

In ogni caso le batterie identificate, qualunque esse siano, costituiscono una soluzione di compromesso e sono certamente perfettibili: non pretendono cioè di essere le "migliori" in assoluto (di qui la necessità di lasciare aperto il loro aggiornamento); ma, considerando l'indifferibile esigenza di fornire uno strumento operativo, si ritiene comunque opportuno proporre la presente versione delle Linee Guida, prevedendo successivi aggiornamenti.

Si considera, pertanto, essenziale definire batterie per tutte le combinazioni di ambienti/ obiettivi ritenute significative: in qualche caso saranno batterie più o meno consolidate; in altri, le batterie saranno più sperimentali; ma devono costituire un chiaro punto di riferimento, precisando il campo di applicazione e gli eventuali limiti di ciascuna delle batterie identificate.

Riassumendo, nel Capitolo 1 (Criteri di identificazione delle batterie) verranno esaminate separatamente le caratteristiche principali che un saggio ecotossicologico deve avere, in funzione di ambienti e substrati da studiare, obiettivi da raggiungere, matrici e comparti da esaminare e modelli sperimentali ed endpoint da utilizzare.

Nel Capitolo 2 (Criteri di giudizio per la valutazione della valenza ecologica e pratica di batterie di saggi biologici) verrà proposta una metodologia di valutazione scientifico/pratica delle batterie di saggi ecotossicologici teoricamente componibili, indipendentemente dalla loro costituzione specifica.

Nel Capitolo 3 (Identificazione degli organismi ed endpoint) verranno esaminati criticamente i vari tipi di saggi ecotossicologici che prevedono l'utilizzo di diversi modelli sperimentali (organismi di diversi livelli trofici).

Il Capitolo 4 (Composizione e valutazione delle batterie), combinando le indicazioni emerse nelle parti precedenti, proporrà alcune delle batterie ritenute più significative, tenendo conto che, pur non sottovalutando la potenzialità di alcuni saggi a fini di ricerca e approfondimento di particolari situazioni, le batterie da individuare devono rispondere soprattutto ad esigenze di efficienza e praticità, per poter essere largamente utilizzate in indagini di routine, se necessario prevedendo opportune attività di formazione.

Il Capitolo 5 delle Linee Guida (Scale di tossicità e indici integrati) proporrà una metodologia di ponderazione matematica dei risultati ottenibili da ciascuno dei saggi che compongono una batteria.

Infine, il Capitolo 6 (Saggi biologici *in situ* in ambiente marino) presenterà una review relativa ai saggi che prevedono una esposizione *in situ* di differenti organismi in ambienti marini, che risultano così sottoposti alle reali condizioni ambientali, arricchito di alcune esperienze ISPRA nel settore.

CAPITOLO 1: CRITERI DI IDENTIFICAZIONE DELLE BATTERIE

In questo capitolo vengono esaminate le caratteristiche principali che un saggio ecotossicologico deve avere in funzione di:

- 8 ambienti (2 ambienti A, B x 4 substrati 1, 2, 3, 4);
- 9 obiettivi generici (a, b, c, d, e, f, g, h, i);
- 1 matrice sedimento e 5 comparti (I, II, III, IV, V);
- modelli sperimentali (organismi e saggi) ed end-point (A-H).

1.1 - Caratteristiche degli ambienti e dei relativi substrati

Le batterie di saggi ecotossicologici devono essere applicate per la valutazione della qualità dei sedimenti delle acque marine costiere e di transizione. Tali sedimenti ovviamente possono avere caratteristiche notevolmente differenti, pertanto si rende necessario innanzi tutto verificare la possibilità di raggrupparli in categorie ben definite.

Per identificare una tipologia di “ambienti” si può partire dalla Water Framework Directive.

Nell’ambito della Common Implementation Strategy For The Water Framework Directive (2000/60/EC), il Working Group 2.4 – COAST ha preparato il Guidance Document No 5 (2003) *Transitional and Coastal Waters – Typology, Reference Conditions and Classification Systems*. Questo documento precisa e definisce il significato dei termini “acque di transizione” e “acque costiere” (WFD artt. 2.6 e 2.7). Quindi, la prima distinzione potrebbe essere tra questi due tipi di ambienti.

A – Ambienti acquatici di transizione. Per definizione, sono corpi d’acqua:

- nelle vicinanze della foce di un fiume;
- con caratteristiche di salinità influenzate sia dalla prossimità alle acque costiere, sia dal flusso di acqua dolce (quindi con un gradiente di salinità, che generalmente resta però inferiore a quella della zona costiera adiacente).

B – Acque marine costiere. Per definizione, sono acque marine superficiali comprese entro il limite di un miglio nautico dalla costa e che si estendono, se è il caso, fino al limite esterno delle acque di transizione.

Per le acque di transizione, infatti, il limite di 1 miglio nautico verso il mare aperto può essere superato se il pennacchio del fiume immissario si estende oltre e determina una zona ancora influenzata dall’acqua dolce.

In entrambi i casi **A** e **B** la zona verso terra si estende fino alla zona intertidale compresa tra la minima e massima marea astronomica. Lateralmente, le zone sono definite dalla appartenenza ad un bacino idrografico.

Casi particolari:

- lagune e paludi costiere (wetlands). Vanno classificate come zone costiere, oppure come zone di transizione se rispondono alla relativa definizione (prossimità della foce di fiumi e sensibile influenza dell’acqua dolce). Non si ritiene necessario differenziare lagune e zone umide come “ambienti” separati che richiedono o possono utilizzare batterie di organismi diversi da quelli di estuario.
- porti e opere costiere. Il Guidance Document No 4 (2003), prodotto dal Working Group 2.2 – HMWB, *Identification and Designation of Heavily Modified and Artificial Water Bodies*, specifica che “i corpi idrici destinati alla navigazione, comprese le strutture portuali”, come pure le opere di difesa delle coste, si considerano HMWB. Per la WFD è necessario identi-

ficare gli HMWB perché per questi viene fissato “solo” un obiettivo di Buon Potenziale Ecologico e di Buono Stato Chimico. Ai fini di questo documento, anche questi ambienti speciali possono essere compresi negli ambienti già individuati: infatti, per una indagine sui porti nella zona di transizione o costiera si possono utilizzare le stesse batterie che si utilizzerebbero per i corrispondenti ambienti e substrati.

Va ricordato che l'allegato 1 del D.Lgs 152/1999 stabilisce invece:

“Sono acque di transizione le acque delle zone di delta ed estuario e le acque di lagune, di laghi salmastri e di stagni costieri. Sono significative le acque delle lagune, dei laghi salmastri e degli stagni costieri. Le zone di delta ed estuario vanno invece considerate come corsi d'acqua superficiali”.

Il documento ANPA (2000) *Elementi di identificazione delle acque di transizione*, RTI CTN_AIM 6./2000, parla di dominio paralico, definito come quella “striscia di estensione variabile tra il mare ed il continente, talora qualificata di intermediazione, costituita da ambienti più o meno scavati nel dominio continentale, apparentemente molto differenti l'uno dall'altro, dove si esercita una certa influenza del dominio marino”, e cita le sue suddivisioni in paralico vicino, lontano e tipico. Questi ambienti paralici vengono descritti come aree di transizione, zone di mescolamento, ambienti intermediari, aree a salinità variabile, zone di frangia costiera, ambienti salmastri.

Il documento ANPA (2000), pertanto, stabilisce che “il dominio paralico comprende tutti gli ambienti costieri, siano essi naturali (foci fluviali, lagune, baie, stagni di origine litorale, “bahiras”, stagni tettonici e stagni di “surverse”) o artificiali (porti e saline).

Infine, il Decreto Legislativo 152 del 3 aprile 2006, predisposto dal Ministro dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare recante *Norme in materia ambientale, nell'Allegato IV (Monitoraggio e classificazione delle acque in funzione degli obiettivi di qualità ambientale)* alla parte Terza, *Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e di gestione delle risorse idriche*, stabilisce che:

“1.1.3 ACQUE MARINE COSTIERE. Sono significative le acque marine comprese entro la distanza di 3.000 metri dalla costa e comunque entro la batimetrica dei 50 metri.

1.1.4 ACQUE DI TRANSIZIONE. Sono acque di transizione le acque delle zone di delta ed estuario e le acque di lagune, di laghi salmastri e di stagni costieri.

Sono significative le acque delle lagune, dei laghi salmastri e degli stagni costieri.

Le zone di delta ed estuario vanno invece considerate come corsi d'acqua superficiali”.

Ai fini delle presenti Linee Guida documento si è deciso di adottare le definizioni della WFD per la distinzione tra ambienti marini costieri ed ambienti di transizione.

Per la WFD, una differenza tra zone di transizione e costiere è costituita dalla richiesta di valutare abbondanza e composizione della fauna ittica tra gli elementi biologici per la zona di transizione, ma questi elementi biologici non sono richiesti per le acque costiere.

Tuttavia, né la WFD né il Guidance Document No 5 considerano esplicitamente l'uso di saggi ecotossicologici (anche se possono genericamente esser fatti rientrare negli “elementi di qualità biologica”).

Nel nostro caso, quindi, l'elemento che può determinare l'inclusione od esclusione di un organismo (modello biologico) in una batteria per le zone di transizione è chiaramente la sua eurialità; nei limiti del possibile, infatti, l'organismo dovrebbe essere utilizzato nei saggi senza manipolazione della salinità del campione e quindi in un campo di salinità variabile. Nelle acque marine costiere la variazione di salinità solitamente è molto meno pronunciata e gli organismi da usare nei saggi generalmente non hanno problemi di acclimatazione.

Substrati (1,2,3,4)

Sempre seguendo il Guidance Document No 5, per l'Italia, tutta inclusa nella Ecozona Mediterranea (salinità > 30 ‰), è possibile suddividere ulteriormente **A** e **B** in base alla composizione media del substrato.

A questo proposito, il Guidance Document No 5 suggerisce una suddivisione tra:

1. substrato duro (roccia, massi, ciottoli);
2. sabbia – ghiaia;
3. fango;
4. sedimenti misti.

Per stabilire la tipologia di appartenenza è sufficiente indicare il substrato dominante.

Tuttavia, poiché nell'area allo studio possono essere presenti contemporaneamente due o più tipi di substrato, per una valutazione ecotossicologica potrebbe non essere sufficiente effettuare i saggi solo sul substrato dominante. È noto infatti che il tipo di sedimento (percentuale di argilla e sostanza organica, ossidi, solfuri, ecc.) condiziona biodisponibilità e tossicità (Van Beelen, 2003). E in qualche caso proprio il substrato che rappresenta solo una minima percentuale dell'area ospita le specie di interesse (economico, estetico, naturalistico, ecc.) da proteggere.

D'altra parte, non sarebbe ragionevole imporre di effettuare sistematicamente i saggi su tutti i substrati, indipendentemente dalla loro rappresentatività.

Come compromesso, si propone quindi di utilizzare la batteria di saggi appropriata per un determinato substrato ogni volta che nella zona considerata (costiera o di transizione) quel tipo di substrato copre almeno una determinata percentuale dell'area. Questa frazione verrà precisata in seguito, anche in funzione degli obiettivi e dopo che saranno state valutate le differenze tra batterie per i vari substrati: ovviamente, se le differenze sono modeste, si potrebbe optare per una frazione del 50 %; se, invece, sono notevoli, potrebbe essere necessario scendere al 25 % o meno.

Comunque, deve essere salvaguardata la discrezionalità dell'operatore, che può autonomamente decidere di saggiare anche substrati relativamente rari, ovviamente con la batteria appropriata, se ne ravvisa la necessità. Ad esempio, nel caso citato di habitat preferenziale di specie di interesse, oppure se quel particolare substrato è particolarmente utile per spiegare la dinamica degli inquinanti: potrebbe essere il caso della scogliera, dove solo in sacche limitate si raccolgono del sedimento sul quale studiare adsorbimento e rilascio, ecc.

Ai fini di queste Linee Guida vengono definite un insieme di 8 “ambienti-substrati”: **A1, A2, A3, A4 e B1, B2, B3, B4**. Ciò non implica automaticamente che siano necessarie 8 batterie diverse, poiché alcune potrebbero essere comuni a più di un ambiente.

Gli ambienti con questi substrati potrebbero essere ulteriormente suddivisi, ad esempio con il criterio delle biocenosi (flora e/o fauna). Ma le biocenosi bentoniche mediterranee prevedono più di un centinaio di facies, associazioni, ecc. Del resto è plausibile che questa suddivisione non sia necessaria per gli nostri scopi.

Potrebbero però esserci delle eccezioni: i D.Lgs. 152/99 e D.Lgs. 258/00 (ma non il D.Lgs. 152/2006) prescrivono esplicitamente che “dovranno essere eseguite obbligatoriamente indagini sulle biocenosi di maggior pregio ambientale (praterie di fanerogame, coralligeno, etc.)”. Tuttavia, si ritiene che il “coralligeno” possa essere assimilato alle biocenosi di fondi duri e rocciosi. Nel caso successivi disposti legislativi dovessero identificare più precisamente altre “biocenosi di maggior pregio ambientale”, il gruppo *ad hoc* valuterà caso per caso se tali biocenosi richiedono una batteria diversa da quelle già identificate.

Le praterie di fanerogame costituiscono invece habitat particolari: nel caso della *Posidonia oceanica*, ad esempio, la biocenosi viene classificata indipendentemente dal tipo di substrato (es. III. INFRALITORALE; III. 5. PRATERIA A *POSIDONIA OCEANICA*; III. 5. 1. Prateria a *Posidonia oceanica* (= Associazione a *Posidonia oceanica*)). Esistono quindi due possibilità: se per questo tipo di habitat è pensabile di “costruire” una batteria di saggi specifica, questo “ambiente” (prateria a fanerogame) andrebbe ad aggiungersi agli altri 8. Al contrario, se risulterà che una delle batterie che verranno identificate per questi 8 ambienti è adatta anche per le praterie, si eviterà di aumentare inutilmente il numero degli ambienti.

Ovviamente, la stessa opzione vale per altri habitat che dovessero essere identificati dai membri del gruppo di lavoro come importanti e distinti dagli ambienti finora indicati.

1.2 - Identificazione degli obiettivi dell'indagine ecotossicologica (a, b, c, d, e, f, g, h, i)

Uno studio dei sedimenti viene solitamente commissionato per verificare:

1. se i sedimenti sono contaminati da sostanze tossiche e/o sostanze bioaccumulabili;
2. se la contaminazione è tale da compromettere qualche possibile uso legittimo dell'ambiente e/o determinate opzioni gestionali, nel caso il sedimento debba essere dragato.

Ovviamente, se la risposta è affermativa ad entrambe le domande, sarà poi necessario stabilire quali sono le cause della compromissione, chi sono i responsabili, quanto è estesa l'area compromessa, dove sono gli hot spot e quali azioni si possono intraprendere per un eventuale recupero.

Per rispondere alle domande 1 e 2 una batteria di saggi biologici dovrebbe quindi comprendere, oltre a saggi di tossicità, anche saggi di bioaccumulo e saggi specifici per gli usi potenziali od effettivi, nonché biomarker.

Nel seguito verranno esaminati più in dettaglio gli "obiettivi" che richiedono l'uso di una batteria di saggi ecotossicologici per la verifica dell'entità di un possibile impatto su ambienti costieri e di transizione.

Nell'approccio DPSIR (Driver, Pressure, State, Impact, Response), le analisi chimiche e gli inventari biologici sono ritenuti strumenti atti a definire lo stato di un ambiente e, solo con un monitoraggio su basi comparative (temporali e/o spaziali), o il confronto con situazioni di riferimento, consentono di ipotizzare gli effetti di un impatto. Non a caso, infatti, il Guidance Document No 3 (2003) *Analysis of Pressures and Impacts* (preparato dal Working Group 2.1 – IMPRESS nell'ambito della Common Implementation Strategy For The Water Framework Directive 2000/60/EC), che segue l'approccio DPSIR, cita come esempio di misura dell'impatto proprio il monitoraggio della crescita di alghe e piante. Lo stesso documento ammette comunque che, per gli ambienti di transizione e costieri, gli strumenti da utilizzare per la verifica di pressioni ed impatti sono ancora in fase di studio e/o implementazione.

Ovviamente, l'uso di una batteria di saggi ecotossicologici permetterebbe di valutare meglio e più direttamente l'entità dell'impatto (su un recettore) o del *potenziale* impatto (scarichi a mare). Quindi, una batteria di saggi ecotossicologici sarebbe funzionale a quanto disposto dall'Annex II, art. 1.5. *Assessment of Impact*, della WFD, anche se non esplicitamente richiesti. Inoltre, con opportuni protocolli (Toxicity Identification Evaluation (TIE), biomarker) una batteria di saggi ecotossicologici potrebbe anche servire per identificare i determinanti (driver) e/o quantificare le pressioni.

Tornando agli impatti, le linee guida ARPAL (2004) CTN – AIM *Monitoraggio dei sedimenti e delle biocenosi marine. Raccolta, adeguamento ed integrazione delle informazioni* hanno esaminato i disposti legislativi in materia e, sempre utilizzando l'approccio DPSIR, hanno stabilito che vanno considerati i seguenti impatti sullo stato ambientale costiero:

- ⇒ impatti diretti
 - tossicità acque e sedimenti;
 - presenza di indicatori della contaminazione fecale e accumulo di sostanze inquinanti in bivalvi;
 - percentuale stock sovrasfruttati;
 - balneabilità;
- ⇒ Impatti indiretti:
 - distruzione di habitat (*Posidonia oceanica* e *Cymodocea nodosa*);
 - valutazione del disturbo sulle comunità bentoniche.

Uno studio potrà dunque avere "obiettivi" diversi, in funzione del numero e tipo di impatti che deve prendere in considerazione; e, poiché per definire ciascun impatto sono necessari strumenti specifici, è possibile che obiettivi diversi richiedano batterie di saggi ecotossicologici differenti. Anzi, ogni studio probabilmente sarà sito specifico e richiederà un programma *ad hoc*. Secondo Whitehouse *et al.* (2004), ad esempio, solo l'opportuna combinazione di saggi di tossicità acuta – letale e cronica -

subletale, da effettuare tanto sugli effluenti che sui recettori, può consentire di distinguere una situazione di compromissione già avvenuta, di semplice pericolo o di vero e proprio rischio.

È però possibile indicare alcune ricette “base”, utilizzando casi tipo “generici” ed altri più “specifici”. Tra gli obiettivi “generici”, cioè quelli che possono valere per tutti e 8 gli ambienti-substrati individuati precedentemente, si riconoscono:

- a.** il monitoraggio ambientale in generale (definizione dello stato di qualità ai sensi della WFD), con una possibile differenziazione (**a₁**) se il monitoraggio è inteso ad identificare strategie di recupero. In questo obiettivo, potrebbe essere considerata anche la “messa in sicurezza d’emergenza”, specifica procedura prevista per le aree di bonifica, in cui deve essere garantito il confinamento dell’inquinamento;
- b.** il monitoraggio di scarichi idrici e relativi ambienti recettori. Il monitoraggio di eventuali scarichi solidi, connessi ad attività antropiche, viene invece equiparato all’obiettivo **e**;
- c.** le autorizzazioni alla balneazione (possibili effetti dell’ambiente sull’uomo);
- d.** la salvaguardia, protezione e recupero di ambienti particolari (es. **d₁**: riserve, parchi e zone di particolare pregio naturalistico; **d₂**: itticultore e molluschicoltura, ecc.). Come per **a₁**, si può distinguere un obiettivo **d₃**, per studi intesi al recupero di zone particolari ma già degradate.

Vi sono poi obiettivi specifici, che possono applicarsi solo ad alcuni ambienti, ma non ad altri:

- e.** caratterizzazione dei sedimenti da dragare; **e₁**: per la valutazione degli effetti nel sito da dragare e nelle aree adiacenti; **e₂**: per la valutazione degli effetti nel sito di smaltimento a terra, discarica; **e₃**: per la valutazione degli effetti nel sito di deposizione dei sedimenti in mare aperto, bacino conterminato costiero, ripascimento costiero, ecc. Questi obiettivi **e** non si applicano sicuramente agli ambienti **A1** e **B1** (substrato duro).

Infine, anche se non possono essere studiati attraverso saggi ecotossicologici, per completezza vengono indicati anche i seguenti obiettivi (che successivamente non verranno però ripresi):

- f.** valutazione degli effetti dell’introduzione di specie esotiche (flora e fauna);
- g.** valutazione degli effetti della pressione di pesca;
- h.** valutazione degli effetti della pressione turistica diretta (possibili effetti diretti dell’uomo in quanto bagnante sulle spiagge).

Allo stesso modo, possiamo concordare che un importante obiettivo sia:

- i.** ricerca scientifica, metodologica, TIE, ecc. (i biomarker rientrano in questo obiettivo, anche se in parte potrebbero essere utilizzati per **a₁** e **d₃**; si veda *JAMP Guidelines for contaminant-specific biological effects monitoring*, OSPAR Commission, Ref. No. 2003-10). Ma per questo obiettivo non è possibile, né utile, definire una “ricetta” unica.

Seguendo questo approccio, risultano significative tutte le combinazioni tra ambienti-substrati (**A** e **B**) ed obiettivi **a**, **b**, **c**, **d**, mentre l’obiettivo **e** è plausibile solo per gli ambienti **A** e **B** da **2** a **4**.

1.3 - Selezione delle matrici e dei comparti (I-V)

Nel 2001 l’ISPRA (già APAT ex art. 28 D.L. 112/2008, allora ANPA) ha pubblicato il Rapporto RTI CTN_AIM 4./2001 *Elementi per la caratterizzazione fisicochimica biologica ed ecotossicologica dei parametri addizionali (D.Lgs. 152/99) nella matrice acquosa, nel sedimento e nel biota*.

Secondo questo Rapporto, e tenendo conto delle modifiche apportate dal D.Lgs 258/00 in materia di monitoraggio di acque marine costiere, è necessario considerare le seguenti tre matrici:

“Matrice acquosa - Qualora si ritenga necessaria un’analisi approfondita volta ad evidenziare gli effetti tossici a breve e lungo termine, o si ritenga opportuno integrare il dato chimico nella valutazione della qualità delle acque, si potranno condurre saggi biologici a breve o lungo termine, su spe-

cie selezionate appartenenti a diversi gruppi tassonomici, in particolare su specie autoctone o quelle per le quali esistano dei protocolli standardizzati.

Matrice biota - Per la caratterizzazione dello stato degli ecosistemi marini, anche ai fini della formulazione del giudizio di qualità ecologica ed ambientale delle acque marine costiere, dovranno essere eseguite obbligatoriamente indagini sulle biocenosi di maggior pregio ambientale (praterie di fanerogame, coralligeno, etc.) e su altri bioindicatori. Allo scopo di individuare particolari situazioni di criticità dovute alla presenza di sostanze chimiche pericolose presenti in tracce nelle acque e di concorrere alla definizione del giudizio di qualità chimica, sul biota dovranno essere eseguite analisi di accumulo di metalli pesanti e composti organici (...) nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*). Le Regioni possono integrare i parametri in funzione delle esigenze di approfondimento delle conoscenze rispetto a specifiche situazioni locali.

Matrice sedimento - È prevista, obbligatoriamente, l'analisi granulometrica obbligatoria per la determinazione delle principali classi granulometriche (ghiaie, sabbie, limi, argille) e la determinazione di alcuni metalli pesanti e composti organici (...). Qualora le autorità ritengano necessaria un'analisi più approfondita volta a evidenziare gli effetti tossici a breve o a lungo termine, ovvero ritengano opportuno integrare il dato chimico nella valutazione della qualità del sedimento, potranno essere effettuate indagini addizionali, quali saggi biologici condotti su specie selezionate appartenenti a diversi gruppi tassonomici, privilegiando le specie autoctone o quelle per le quali esistano dei protocolli standardizzati”.

Quindi, una batteria di saggi ecotossicologici potrebbe, e forse dovrebbe, includere tutte e tre queste matrici.

In questo documento viene considerata la sola matrice sedimento.

Le linee guida ARPAL (2004) CTN – AIM *Monitoraggio dei sedimenti e delle biocenosi marine. Raccolta, adeguamento ed integrazione delle informazioni* precisano che:

“i saggi biologici vengono condotti esponendo gli organismi a:

- acqua contenente sedimento;
- acqua interstiziale;
- elutriati;
- campioni di sedimento trasportati in laboratorio;
- sedimenti “in situ”.

I saggi *in situ* hanno innegabilmente una grande potenzialità, anche per studi di TIE (Burton e Nordstrom, 2004), ma realisticamente si deve ammettere che siamo ancora lontani dal farli diventare saggi di routine, con la sola eccezione delle prove di bioaccumulo *in situ* con molluschi (ASTM E 2122-02).

Per tutti i saggi biologici da svolgersi in laboratorio va ricordato il rischio di artefatti legato a campionamento, trasporto e conservazione: una modifica delle condizioni originali del sedimento può infatti comportare una variazione anche sensibile della tossicità (si veda, ad esempio, Hose *et al.*, 2006). Un possibile riferimento in tal senso è rappresentato dalla guida ASTM E 1391-02.

Ammettendo che i campioni di sedimento arrivino in tempi utili ed in condizioni idonee in laboratorio, i saggi di tossicità possono essere condotti su diversi comparti:

- I.** acqua sovrantante, cioè al di sopra dell'interfaccia acqua/sedimento. Solitamente è quella che nel campionamento è a diretto contatto con il sedimento, ma in alcuni casi potrebbe essere l'acqua della colonna soprastante. Sicuramente è l'unico comparto possibile per i substrati duri (ambienti **A1** e **B1**); per gli altri ambienti, l'acqua sovrantante può dare utili informazioni circa gli effetti su tutti gli organismi non bentonici in senso stretto, ma che vivono in relazione con il fondo.
- II.** acqua interstiziale. Carr *et al.* (2001a) suggeriscono di utilizzare questo comparto, assieme al sedimento *in toto*, ogni volta possibile, perché offre informazioni complementari e permette di utilizzare tipi diversi di organismi. È anche il comparto che permette di effettuare

TIE (Carr *et al.*, 2001b; 2003b; Stronkhorst *et al.*, 2003a). Secondo Carr (2001; citato in McCready *et al.*, 2004), l'acqua interstiziale può essere conservata congelata fino a due anni prima dei saggi, offrendo la possibilità di dilazionare nel tempo i saggi.

- III. elutriati. Si intende l'acqua e la porzione solubile estratta dal sedimento (ASTM, 1994). L'elutriato, pur costituendo un artefatto, è la simulazione più vicina alle movimentazioni dei fondali e ai dragaggi (USACE, 1991).
- IV. sedimento intero. Si intende il sedimento assieme all'acqua interstiziale, che ha subito una manipolazione minima dopo il campionamento (ASTM, 1994). Il sedimento non deve essere congelato, ma a 4°C può essere conservato per 2 settimane prima dell'esecuzione dei saggi di tossicità (Norton *et al.*, 1999), salvo diversa indicazione dello specifico protocollo. Secondo ISO 16712-05, il sedimento può essere conservato a 4°C al buio fino a 30 giorni prima dell'inizio del saggio. Chapman e Wang (2001) ritengono che questo comparto debba essere il principale strumento nella verifica della tossicità dei sedimenti, soprattutto perché consente di coprire la più grande varietà di possibili vie di esposizione e comporta il minimo cambiamento delle condizioni fisico-chimiche del sedimento stesso.
- V. estratti con solventi. Assieme agli elutriati, sono meno ecologicamente rilevanti e portano ad una sovrastima dei possibili effetti tossici *in situ* (McCready *et al.*, 2004). Per questo, salvo eccezioni questo "comparto" non viene inserito come prescritto in alcuna batteria, ma può essere raccomandato come saggio complementare per studi che prevedono una TIE o per scopi specifici: ad esempio, Bombardier e Bermingham (1999), sull'estratto in DMSO, hanno applicato il saggio Microtox[®] e SOS Chromotest[®] quale saggio di genotossicità (Environment Canada, 1993a). Considerando che l'estrazione con solventi è un passo preliminare obbligatorio per saggi di mutagenesi tipo Ames con acque e sedimenti, i saggi con estratti sono raccomandati, oltre che per scarichi, per gli ambienti recettori **A** e **B**, substrati 3 e 4.

In bibliografia è possibile trovare riferimento anche ad un "sedimento umido" (wet sediment), cioè quello che rimane dopo l'estrazione dell'acqua interstiziale. Bombardier e Bermingham (1999) su sedimento umido, hanno effettuato il Toxi-Chromotest DSTTP con *Escherichia coli* (Kwan, 1993; Environmental Bio-detection Products, 1995). Tuttavia, il sedimento umido non rappresenta un comparto separato, perché comunque verrebbe trattato come il sedimento intero.

Inoltre, a volte si fa riferimento a "sedimento sospeso" o a "materiale particellato in sospensione" (Cotou *et al.*, 2005). Questo potrebbe costituire un "comparto" separato, in particolare per gli ambienti di transizione se viene monitorato anche il tributario d'acqua dolce (è noto infatti che nel passaggio da acqua dolce ad acqua salata avvengono fenomeni diversi a carico degli inquinanti variamente associati al particellato sospeso). In qualche caso, lo studio di questo comparto potrebbe aver senso anche per il monitoraggio di scarichi a mare, se il carico sospeso è rilevante ai fini ecotossicologici.

Tuttavia, esistono notevoli difficoltà tecniche nel raccogliere il materiale particellato sospeso in quantità sufficiente da consentire l'applicazione di saggi ecotossicologici. Pertanto, non si ritiene di costituire un comparto separato per questa fase, anche perché, metodologicamente, se fosse raccolto potrebbe poi essere trattato o come sedimento, oppure come base per la preparazione di elutriati (se interessa ipotizzare il possibile destino degli inquinanti associati al particellato).

Infine, il comparto acqua comporta una ovvia differenza tra ambienti di transizione e costieri: nei primi infatti, dovrebbe essere considerato tanto il comparto **I**₁, acqua dolce (tributario), quanto quello **I**₂ di acqua salmastra, mentre nelle acque costiere solitamente il comparto da considerare è solo acqua marina, ad eccezione dell'obiettivo **b** (scarichi), nel qual caso bisognerà considerare anche l'acqua dello scarico.

L'ordine di elencazione dei comparti sopraesposto non implica un ordine assoluto di importanza; infatti, nel seguito vengono precisate per i diversi ambienti, le priorità, che sono differenti in funzione dell'obiettivo.

Considerando ambienti, obiettivi e comparti, sono plausibili solo alcune combinazioni.

Negli ambienti con substrato di **tipo 1**, substrato duro (roccia, massi, ciottoli), larve e spore degli organismi tipicamente sono planctoniche, quindi la batteria deve ragionevolmente comprendere un

saggio biologico nella matrice acqua; poiché il campionamento di acqua sovrantante potrebbe essere difficoltoso, in mancanza di operatori subacquei, potrebbe essere sufficiente utilizzare acqua della colonna, raccolta in prossimità del fondo.

Quindi:

- l'acqua interstiziale non è un'opzione;
- l'elutriato non è un'opzione;
- la fase solida non è un'opzione;
- l'estrazione con solventi non è un'opzione.

Tenendo conto degli obiettivi, sia per gli ambienti **A** che **B**, è possibile solo l'utilizzo del comparto I per gli obiettivi **a**, **b**, **c** e **d**.

Negli ambienti con substrato di **tipo 2**, sabbia – ghiaia, non è pratico estrarre l'acqua interstiziale dal sedimento *ex situ* (per centrifugazione, filtrazione a pressione – squeezer - o per aspirazione), o *in situ* (dialisi - peeper), ma è possibile ricavare un campione di acqua interstiziale direttamente in campo per aspirazione (con una siringa, attraverso una pietra da acquario immersa nel sedimento del fondo), oppure nel campione ricavato da una benna o un carotatore. Questa tecnica è quella sempre preferibile per ricavare l'acqua interstiziale secondo Carr *et al.*, 2001a, ed è descritta nei dettagli in Carr *et al.* (2004).

L'estrazione dell'acqua interstiziale può essere effettuata con le modalità sopra indicate anche negli ambienti con substrato di tipo **3**, fango, e con substrato di tipo **4**, sedimenti misti, ma in funzione del substrato può essere necessario operare una differente scelta di organismi e/o endpoint (in particolare, alcuni organismi non possono essere utilizzati con determinati substrati).

Ai fini di queste Linee Guida sono stati considerati tutti e cinque i comparti, anche se con una importanza relativa nell'ordine **IV** >> **II** > **I** >> **III** >> **V**. Quindi, considerando i diversi obiettivi, alcune combinazioni possono essere scartate, perché non realistiche od utili, e si ottengono, infine, le seguenti opzioni.

- **Obiettivo a** (monitoraggio): sono prescritti i comparti **I** (acqua sovrantante) e **IV** (sedimento intero). Raccomandato il comparto **II** (acqua interstiziale). Se lo studio viene effettuato per valutare il possibile recupero della zona (obiettivo **a**₁), la batteria prevede anche saggi raccomandati sui comparti **III** (elutriati) e **V** (estratti con solventi).
- **Obiettivo b** (scarichi e recettori): per entrambi è prescritto il comparto **I** (acqua); per il recettore è prescritto anche il comparto **IV** (sedimento). Il comparto **I** potrebbe richiedere organismi diversi, per la differenza di salinità tra scarico e recettore. Tuttavia, secondo il criterio EPA, un'acqua dolce (es. scarico) che si immette in mare (o altro corpo idrico salmastro) non rappresenta una matrice contaminante. L'eventuale effetto tossico esercitato dai contaminanti presenti nell'acqua di scarico dolce dovrebbe essere determinato con organismi dell'ambiente marino o salmastro. In tal modo, inoltre, è simulato anche il comportamento dello scarico che, nella realtà, tenderà a diluirsi effettivamente nel recettore marino o salmastro. A tale scopo il campione di acqua di scarico potrebbe essere arricchito con una salamoia ottenuta mediante evaporazione dell'acqua di mare (Hypersaline brine – HSB; USEPA, 2002° e b). Raccomandato il comparto **II** (acqua interstiziale) recettore. La batteria comprende anche saggi raccomandati sui comparti **III** (elutriati) e **V** (estratti) del sedimento dell'immissario, o dei solidi sospesi dello scarico, se ritenuti potenzialmente pericolosi per un eventuale rilascio di tossici nel recettore. Per valutare la tossicità associata ai solidi in sospensione, potrebbe essere sufficiente eseguire la prova su un campione di acqua di scarico tal quale. Nell'acqua di scarico potrebbero essere eseguiti saggi su estratti (**V**) per avviare la procedura TIE.
- **Obiettivo c** (balneazione): è prescritto il comparto **I** (acqua), ma raccomandabile almeno un saggio sul comparto **IV** (sedimento intero).
- **Obiettivo d** (salvaguardia): sono prescritti i comparti **I** (acqua), **II** (acqua interstiziale) e **IV** (sedimento intero). Per ittiocolture e molluschicolture (obiettivo **d**₂), è inoltre indispensabile uno studio di bioaccumulo. Ai fini di un recupero (obiettivo **d**₃), la batteria comprende anche saggi raccomandati sui comparti **III** (elutriati) e **V** (estratti) come parte di una TIE.

- **Obiettivo e** (dragaggi): è prescritto il comparto **IV** (sedimento intero). Per studiare gli effetti sul sito dragato (obiettivo **e₁**), è prescritto anche il comparto II (acqua interstiziale). Per valutare la dispersione del sedimento nell'area marina adiacente alle operazioni di dragaggio (obiettivo **e₁**) e per studiare gli effetti sul sito di smaltimento in mare, o per ripascimenti, o nell'area adiacente un bacino conterminato costiero (obiettivo **e₃**), sono prescritti saggi sul comparto **III** (elutriati); per studiare gli effetti sul sito di smaltimento a terra (obiettivo **e₂**), sono raccomandati saggi sul comparto **V** (estratti). Poiché l'elutriato viene considerato un artefatto, si ritiene opportuno, chiamando in causa il principio di precauzione, l'impiego oltre al rapporto classico 1:4 di almeno un altro rapporto di diluizione (Arizzi Novelli *et al.*, 2006).

La decisione di studiare anche i comparti raccomandati va ovviamente lasciata allo sperimentatore, in funzione delle condizioni locali, di tempi, costi, ecc.

1.4 - Scelta degli endpoint e degli organismi

Dopo aver individuato ambienti, obiettivi e comparti, si deve procedere alla scelta del numero minimo e tipo di organismi ed endpoint desiderati.

Endpoint

Va precisato che il DLgs 152/2006 non prevede obbligatoriamente l'effettuazione dei saggi tossicologici nelle fasi iniziali del monitoraggio; per le acque marino-costiere i saggi biologici, considerati non prescritti nell'All. 1 par. 3.4.1.3, nella tabella 15 figurano come determinazioni prioritarie nei sedimenti (ma non sono specificate le specie bersaglio da utilizzare nei saggi).

Per quanto riguarda la scelta degli endpoint, quindi, non è possibile fare riferimento a questi disposti legislativi.

Tuttavia, nel Rapporto RTI CTN_AIM 4./2001 (ANPA, 2001) *Elementi per la caratterizzazione fisicochimica biologica ed ecotossicologica dei parametri addizionali (D.Lgs. 152/99) nella matrice acquosa, nel sedimento e nel biota*, viene esplicitamente affermato:

“Si distinguono tre tipologie fondamentali di tossicità (ai quali sono collegate tre metodologie distinte di test):

1. *tossicità acuta (test di tossicità acuta): è l'effetto immediato che una sostanza tossica produce su un organismo vivente (soma);*
2. *tossicità cronica (test di tossicità cronica): è l'effetto a lungo termine che una sostanza tossica produce su un organismo vivente; vengono prese in considerazione diverse generazioni dell'organismo test (soma);*
3. *genotossicità e mutagenesi (test di genotossicità e mutagenesi): è l'effetto che una sostanza produce su un organismo vivente (genoma); vengono prese, in genere, in considerazione diverse generazioni dell'organismo test”.*

È inoltre previsto che sul biota vengano eseguite “analisi di accumulo di metalli pesanti e composti organici, indicati in tabella 14, nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*).

La distinzione tra saggi acuti e cronici si presta ad equivoci, in quanto in letteratura sono presenti definizioni diverse ed a volte contraddittorie.

Ad esempio, Ramade (1977) distingue una tossicità acuta, “che provoca la morte o gravi problemi fisiologici dopo un breve ritardo successivo all'assorbimento per via transtelementaria, polmonare o boccale – in una o più esposizioni – d'una dose molto importante di un composto nocivo”; una tossicità subacuta, che differisce dalla precedente perché “una proporzione significativa della popolazione può sopravvivere all'intossicazione, ma tutti gli individui presentano sintomi clinici determinati dall'assorbimento del tossico”; una tossicità a lungo termine, derivata “non da una esposizione in un

breve periodo a dosi molte elevate, ma al contrario, all'esposizione a concentrazioni molto modeste, a volte anche a dosi infime, di sostanze inquinanti e per la quale la ripetizione degli effetti cumulativi finisce per provocare problemi molto più insidiosi".

Moriarty (1990) distingue invece una tossicità letale, che produce la morte di una frazione definita degli organismi esposti ad un tossico per un tempo prestabilito, da una tossicità subletale, ma sottolinea l'ambiguità di questo termine: sebbene indichi che l'esposizione non induce la morte in un breve tempo, è probabile che qualsiasi effetto che diminuisce la capacità dell'organismo di rispondere al suo ambiente ne accorci la vita. Quindi, in una esposizione subletale, una certa proporzione di individui può morire, rendendo incerta la distinzione tra effetti letali e subletali.

In Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality (ANZECC 2000), nel paragrafo: "*Dati di tossicità cronica*", è riportato: "*Nei test cronici di tossicità è utilizzata una grande varietà di endpoint. Questi possono essere suddivisi in 3 gruppi: funzioni vitali; comportamento; endpoint biochimici. Le funzioni vitali includono la mortalità, alterazioni della riproduzione, schiusa, immobilizzazione e inibizione della crescita. Gli endpoint comportamentali comprendono: mobilità, motilità, velocità di infossamento, velocità di ventilazione, velocità di nuoto, risposte fototattiche e tasso di alimentazione. Gli endpoint biochimici comprendono: inibizione della bioluminescenza, induzione e attività di diversi enzimi (compresi citocromo P-450, EROD, acetilcolinesterasi e metallotioneine), cambiamenti del DNA e del rapporto DNA/RNA, lesioni istopatologiche e disfunzioni del sistema immunitario. Ciò solleva una domanda significativa: quale endpoint del test è accettabile per ricavare linee guida di qualità delle acque? Il dibattito sulla rilevanza ambientale di questi 3 tipi di endpoint non è stato risolto, ma la maggioranza degli scienziati dovrebbe essere d'accordo nel ritenere che la rilevanza ecologica degli endpoint biochimici e comportamentali è dubbia (Holdway 1996b; McCarty e Munkittrick, 1996). OECD (1992a) è di questa opinione, affermando che gli endpoint biologici di sopravvivenza, crescita e riproduzione hanno una rilevanza diretta per l'ecosistema e dovrebbero ricevere un peso superiore rispetto ad altri endpoint nello stabilire linee guida. Questo approccio è stato adottato per le presenti linee guida*".

Secondo Calow (1993), "*I saggi possono anche essere classificati secondo le forme ed evoluzioni temporali delle risposte: le risposte possono essere di tipo quantale (vivi/morti, risposte comportamentali attive o disattive), oppure di tipo continuo (crescita/riproduzione); oppure, relativamente al tempo di generazione, possono essere a breve termine (acute) o a lungo termine (croniche)*". Successivamente, relativamente a saggi sui pesci: "*I periodi di esposizione vengono solitamente classificati come acuti o cronici: viene anche utilizzato il termine subcronico*". E, sempre per i pesci, sono indicate metodologie per: "*Sub-chronic lethal toxicity*" (da OECD, 1984a) e "*Sub-chronic sublethal toxicity*" (drafts EEC, ISO, OECD)

ECETOC (1993) definisce come:

1. Tossicità Acuta - Effetti avversi che si manifestano in un breve tempo (non superiore ad un terzo del tempo medio tra nascita e raggiungimento della maturità sessuale e durante il quale l'organismo può essere mantenuto in buone condizioni in assenza di alimentazione) dopo la somministrazione di una singola dose di una sostanza.
2. Tossicità Subacuta (Subletale) - Effetti avversi che si manifestano dopo l'esposizione ad una sostanza per un periodo ≤ 10 % vita dell'organismo (e durante il quale gli organismi vengono alimentati).
3. Tossicità Cronica - Effetti avversi che si manifestano dopo l'esposizione ad una sostanza per un periodo > 50 % vita dell'organismo.

Secondo queste definizioni, ne consegue che non è possibile stabilire un limite temporale, esempio 24, 48 o 96 h, per distinguere tra saggi acuti e subacuti o cronici, perché batteri, alghe, invertebrati, ecc., hanno una vita media molto diversa.

Vighi e Bacci (1998) scrivono: "*Negli studi di tossicità cronica l'obiettivo è il calcolo di una soglia di tossicità, ovvero di quel livello di esposizione massimo che traccia il confine tra i livelli efficaci e non efficaci a tempo indeterminato (ad es. per la durata della vita media degli organismi selezionati per il saggio)*". [...] "*Una volta acquisiti dati sulla tossicità acuta si scelgono livelli di esposizione più contenuti in modo da non compromettere la funzionalità degli organismi per tempi di trattamento*

più lunghi che per molti organismi corrispondono ad uno o più cicli riproduttivi. L'effetto prescelto è spesso subletale (velocità di crescita, alterazioni della capacità riproduttiva, modificazioni enzimatiche, alterazioni del comportamento)...”.

Secondo il Code of Federal Regulations (2001), in riferimento a saggi cronici con dafnidi: *“Un saggio di tossicità cronico indica un metodo utilizzato per determinare la concentrazione in acqua di una sostanza che produce un effetto avverso su un organismo bersaglio durante un periodo di tempo prolungato. In questa linea guida i criteri di tossicità sono la mortalità e la riproduzione (opzionalmente, anche la crescita)”.*

Secondo United Nations (2006): *“Le linee guida per la valutazione della tossicità acuta propongono sostanzialmente saggi letali a breve termine (pochi giorni) dove vengono misurate le LC50 (o EC50 per parametri strettamente collegati, come l'immobilizzazione per i dafnidi). Le linee guida per la valutazione della tossicità cronica hanno, invece, un approccio molto diverso. La durata del saggio è in relazione al ciclo vitale dell'organismo e, pertanto, può essere molto differente (giorni, settimane, mesi); vengono misurati endpoint subletali invece della mortalità; la variabilità tra gli endpoint misurati nei vari saggi è elevata; viene utilizzata la NOEC invece della LC50 ... Dal punto di vista scientifico, è essenziale considerare la strategia di indagine adottata nei saggi ecotossicologici attualmente previsti dalle normative. La regola per vertebrati ed invertebrati è quella di fare riferimento a endpoint letali per saggi acuti e a endpoint relativi alla riproduzione (o sulla crescita) nei saggi cronici. Tuttavia, è anche possibile trovare esempi dove il principale effetto dopo esposizioni a lungo termine è la letalità (con valori molto bassi di ACR, come osservato nel database), e prodotti chimici che hanno effetti cronici sulla riproduzione dopo esposizioni a breve termine. Inoltre, mentre la durata dei saggi cronici è associata al ciclo vitale degli organismi, la degradabilità delle sostanze chimiche è definita usando sempre la stessa scala temporale”.*

Implicitamente, ISO ha riconosciuto la difficoltà di utilizzare termini di questo tipo perché nella Norma 6107-3: 2001 (Water quality - Vocabulary) non ne dà alcuna definizione, limitandosi a distinguere tra saggi statici, semi-statici, dinamici, ecc.

In letteratura è poi possibile trovare definizioni diverse, che combinano quelle precedenti; ad esempio, si può parlare di tossicità cronica subletale (saggi che coprono l'intero ciclo vitale degli organismi esposti, o solo alcune fasi), e di tossicità acuta prolungata (mortalità in una sola fase del ciclo vitale). In alcuni casi, la tossicità acuta viene identificata con la sola tossicità letale, e la tossicità cronica con quella subletale, anche se in realtà sono noti saggi di tossicità acuta subletale e di tossicità cronica letale. Questa confusione è inevitabilmente riflessa anche nei protocolli standardizzati, che a volte identificano esplicitamente un tipo di tossicità. Ad esempio la Norma ISO 14669 (1999) nel titolo indica che si tratta di un saggio di tossicità acuta letale.

Per evitare di ingenerare confusione e possibili equivoci, nel presente documento si prescinde da qualsiasi definizione; nel seguito, ci si riferirà quindi ai saggi esattamente come sono indicati dagli estensori e come figurano nella bibliografia citata, e ove possibile i saggi verranno identificati riportando sistematicamente il tipo di endpoint determinato e la durata del saggio.

1.5 - Scelta degli organismi e modalità di esecuzione dei saggi (A - H)

Per quanto riguarda gli organismi, Ducrot *et al.* (2005) così riassumono le caratteristiche che dovrebbero avere le specie da scegliere per una batteria di saggi:

- facilità di allevamento e manipolazione. ASTM (1994) contempla anche la possibilità di una raccolta in natura, perché molte specie possono essere mantenute in laboratorio per il tempo necessario alla preparazione ed esecuzione dei saggi, ma non tutte sono allevabili (es., sopravvivono ma non si riproducono);
- disponibilità nell'arco dell'intero anno solare;
- sensibilità (capacità di rilevare i tossici);
- riconoscimento come specie di riferimento in metodi standardizzati;

- larga distribuzione geografica;
- importanza ecologica e/o economica.

Inoltre, dovrebbero essere filogeneticamente ed ecologicamente vicine alle specie dominanti nell'ambiente di studio: per l'ambiente sedimentario, ad esempio, si dovrebbe usare almeno un rappresentante per tipo.

Spesso, viene richiesto che le specie prescelte siano autoctone. ASTM (1994), infatti, indica che esse devono essere indigene del sito da controllare, ma ammette che possano essere utilizzate in alternativa altre specie che abbiano una simile nicchia ecologica e la stessa modalità di alimentazione, o avere un comportamento simile a quello delle specie indigene.

Altre caratteristiche importanti sono il tipo di ciclo vitale e di strategia riproduttiva, le dimensioni, che possono avere rilevanza nel determinare vie di esposizione, meccanismi della tossicità, cinetica e bioaccumulo. Infine, ASTM (1994) osserva che le specie devono essere compatibili con il tipo di esposizione ed endpoint prescelti ed essere tolleranti per un ampio campo di caratteristiche della qualità dell'acqua.

A questo proposito, potrebbe addirittura essere superato il concetto di specie, in quanto spesso il "target ecotossicologico" è una fase del ciclo vitale e quindi un sistema biologico. Per esempio, tutte le fasi zooplanctoniche di specie e/o generi e/o gruppi di organismi adulti, anche profondamente differenti, possono essere comunemente identificate come un singolo "sistema biologico funzionale" che funge da anello di congiunzione tra i produttori (fitoplancton) ed i consumatori secondari (fauna ittica). Tuttavia, è obiettivamente difficile elaborare un protocollo metodologico che indichi genericamente come modello uno stadio di sviluppo, senza specificare almeno una rosa di specie tra le quali scegliere l'organismo che dovrà essere effettivamente utilizzato.

Considerando gli "ambienti", va ricordato innanzi tutto che, per il comparto acqua, gli organismi possono essere differenti tra ambienti di transizione e costieri, per la differenza in salinità. Anche l'acqua interstiziale e gli elutriati potrebbero avere una salinità diversa da quella dell'acqua marina, ed ovviamente diversi sono i campioni di acqua dolce dei tributari delle zone di transizione, o degli scarichi.

La modifica del campione per adeguarlo alle esigenze del o degli organismi da usare nel saggio, con aggiustamento della salinità, consentirebbe però di utilizzare lo stesso organismo, indipendentemente dalla salinità del campione. Purtroppo, è noto che le modifiche di salinità alterano la biodisponibilità dei contaminanti (De Witt *et al.*, 1989) e le risposte omeostatiche degli organismi (Byrne e O'Halloran, 2001). Tuttavia, se l'obiettivo è quello di valutare l'effetto delle acque di scarico "dolci" sull'ambiente recettore marino o salmastro, l'alterazione indotta nel campione in realtà anticipa solo quanto effettivamente avviene in natura.

Per quanto riguarda la rilevanza (ecologica e/o economica) degli organismi, il Guidance Document No 5 (zone di transizione e costiere) sottolinea l'importanza dell'inserimento dei pesci tra gli elementi biologici per le zone di transizione, assieme a flora e invertebrati bentonici; mentre il Guidance Document No 3 (pressioni e impatti) ribadisce che i pesci non sono inclusi tra gli elementi di qualità biologica per gli ambienti costieri; il Guidance Document No 4 (ambienti pesantemente modificati) suggerisce, per le protezioni costiere, l'uso di invertebrati bentonici e macroalghe come indicatori.

Purtroppo, come viene ribadito nel Guidance Document No 7, Monitoring under the Water Framework Directive (prodotto dal Working Group 2.7 – Monitoring nell'ambito della Common Implementation Strategy For The Water Framework Directive (2000/60/EC)), per la WFD vengono considerati elementi di qualità, per di più solo desiderabili e non obbligatori, soltanto i bioassay ed il bioaccumulo su pesci, negli ambienti di transizione, e nemmeno quelli nelle acque costiere.

Tuttavia, come risulta dal pronunciamento del CIS Working Group 2.7 Monitoring¹, i bioassays permettono di verificare gli effetti ambientali in un modo più olistico (e perciò più significativo) del monitoraggio chimico da solo. Pur riconoscendone le possibili limitazioni (rilevanza ecologica, artefatti di campionamento, instabilità dei campioni, ecc.), il Working Group, in linea con le raccomanda-

¹ http://forum.europa.eu.int/Members/irc/env/wfd/library?l=/framework_directive/thematic_documents/12_-_monitoring/factsheets_monitoring/bioassays&vm=detailed&sb=Title

zioni del Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment della Water Framework Directive, afferma che i bioassay dovrebbero essere utilizzati in tutte le fasi di applicazione del WFD, dal Monitoraggio di sorveglianza al Monitoraggio operativo e fino al Monitoraggio di indagine, dove permettono di risalire alle cause del deterioramento della qualità e di stabilire la frazione biologicamente attiva dei contaminanti. È forse la loro funzione più importante per la WFD.

Anche il Technical Report 86 (2003) *Testing of indicators for the marine and coastal environment in Europe. Part 3: Present state and development of indicators for eutrophication, hazardous substances, oil and ecological quality*, European Environment Agency, ammette che è praticamente impossibile monitorare le 140 sostanze pericolose indicate dall'Unione Europea ed afferma "A selection should be made of effects that can be clearly related to hazardous substances and that offer the possibilities of drawing the attention of policy-makers and the public. Imposex, a biological effect of the presence of TBT in marine and coastal waters, may offer such an opportunity".

Neanche nella proposta di una nuova Marine Framework Directive per le acque extra-territoriali (Brussels, 24.10.2005, COM(2005) 505 final, 2005/0211 (COD) Proposal for a Directive Of The European Parliament And Of The Council establishing a Framework for Community Action in the field of Marine Environmental Policy (Marine Strategy Directive)) si indicano come necessari i saggi ecotossicologici e men che meno si citano specifici organismi marini da monitorare.

Il Decreto Legislativo 152 del 3 aprile 2006, recante *Norme in materia ambientale*, nell'Allegato I (*Monitoraggio e classificazione delle acque in funzione degli obiettivi di qualità ambientale*) alla parte Terza, *Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e di gestione delle risorse idriche*, indica solo, tra gli elementi biologici da monitorare:

- composizione, abbondanza e biomassa del fitoplancton;
- composizione e abbondanza dell'altra flora acquatica (macroalghe e Angiosperme);
- composizione e abbondanza dei macroinvertebrati bentonici;
- composizione e abbondanza della fauna ittica per le acque di transizione, e gli stessi, meno i pesci, per le acque costiere.

Il Decreto fa poi riferimento alla WFD per richiamare i criteri ecotossicologici utilizzati per fissare gli standard chimici di qualità ambientale. I dati utilizzati, e quindi ritenuti significativi, per stabilire le concentrazioni, attraverso l'applicazione di un "fattore di sicurezza", sono: la L(E)C acuta "per ognuno dei tre livelli trofici dell'insieme di base"; una NOEC cronica per pesci o dafnia o un organismo rappresentativo delle acque saline; due NOEC croniche per specie appartenenti a due livelli trofici (pesci e/o dafnia o un organismo rappresentativo delle acque saline e/o alghe); NOEC croniche per almeno tre specie (di norma pesci, dafnia o un organismo rappresentativo delle acque saline e alghe) appartenenti a tre livelli trofici. Inoltre, se disponibili, dati di bioaccumulo (senza specifica degli organismi). Quindi, ignorando per ora il contestato riferimento alla NOEC, si accetta almeno il principio che i dati ecotossicologici utili siano, in ordine di rilevanza (inversamente proporzionale ai fattori di sicurezza): tossicità cronica a tre livelli trofici > tossicità cronica a due livelli trofici (alghe + organismo animale) > tossicità cronica di un organismo animale > tossicità acuta per tre livelli trofici > bioaccumulo (parametro addizionale).

Seguendo la logica utilizzata da van Beelen (2003) per i microorganismi e generalizzando a tutti i possibili organismi bersaglio, teoricamente i saggi che compongono una batteria dovrebbero:

- 1) essere basati su organismi bentonici o non bentonici. Più precisamente la distinzione dovrebbe basarsi sullo specifico stadio vitale: qui vengono considerati non bentonici anche gli stadi larvali planctonici di organismi bentonici. Inoltre, non si fa distinzione tra infauna e organismi epibentonici. La scelta di organismi non bentonici è giustificata dal fatto che anche organismi che vivono nella colonna d'acqua possono essere danneggiati da una contaminazione dei sedimenti (ASTM, 1994);
- 2) utilizzare sedimento intero o acqua sovranatante e/o interstiziale;
- 3) essere condotti in presenza di sedimento o senza fase solida.

Le varie combinazioni definiscono 8 diversi tipi teorici di saggi biologici (Tab. 1.1).

Tab. 1.1 – Combinazioni teoriche di saggi biologici previste.

Tipo di studio	Sedimento intero	Organismi bentonici	Sedimento presente
A Con sedimento intero e organismi bentonici	Si	Si	Si
B Con sedimento intero e organismi non bentonici	Si	No	Si
C Con elutriati (o estratti) da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida	Si	No	No
D Con acqua sovranatante o interstiziale + fase solida (es. sedimento artificiale) e organismi bentonici	No	Si	Si
E Con acqua sovranatante o interstiziale e organismi bentonici, senza fase solida	No	Si	No
F Con acqua sovranatante o interstiziale + fase solida (es. sedimento artificiale) e organismi non bentonici	No	No	Si
G Con elutriati (o estratti) da sedimento intero e organismi bentonici, senza fase solida	Si	Si	No
H Con acqua sovranatante o interstiziale e organismi non bentonici, senza fase solida	No	No	No

Nelle combinazioni **A** e **B** si intende che gli organismi, bentonici o no, vengono esposti a sedimento intero al di sopra del quale viene stratificata dell'acqua salina, naturale od artificiale (quindi in realtà viene simulato un microcosmo che contiene sia fase solida, sia fase liquida). Per ASTM (ASTM, 1994) anche quest'acqua è considerata "sovranatante", ma questa definizione dovrebbe essere riservata alla vera acqua sovranatante, in particolare quella a contatto del sedimento durante il campionamento; quella aggiunta al sedimento per l'esecuzione del saggio potrebbe essere indicata come "sovrapposta". A volte nei saggi di Tipo **B** viene anche utilizzato un retino, deposto sul sedimento, perchè ci possa essere diffusione ma gli organismi non possano infossarsi. Ovviamente, specialmente nei saggi di lunga durata, è possibile un passaggio di tossici dalla fase sedimento alla fase acqua sovrapposta (per diffusione e/o bioturbazione). Solitamente l'acqua viene sovrapposta al sedimento cercando di minimizzare il disturbo della superficie, ma il rilascio dalla fase solida può essere volutamente accelerato risospesando il sedimento in acqua e lasciando successivamente decantare. Alcuni Autori (Geffard *et al.*, 2005) utilizzano poi questo insieme di sedimento ed acqua ("sedimento decantato") per l'esposizione degli organismi. Per la suddivisione qui considerata, anche questo tipo di trattamento rientra nei saggi di Tipo **A** o **B**.

Nelle combinazioni **C** e **G**, invece, si utilizzano elutriati, cioè estratti acquosi ottenuti mescolando il sedimento intero con acqua salina, naturale od artificiale, in opportune proporzioni (solitamente 1:4). Successivamente, il sedimento viene separato (per decantazione, filtrazione o centrifugazione) dall'elutriato e gli organismi vengono esposti alla sola fase liquida, che si ritiene abbia però estratto

dal sedimento intero i tossici biodisponibili. Gli estratti si ottengono allo stesso modo, utilizzando un estraente diverso dall'acqua salina. Ovviamente, gli estratti comportano una volontaria, notevole modifica del mezzo, intesa a ipotizzare un rilascio di tossici in condizioni estreme (scenario delle condizioni peggiori). In teoria, l'estraente può essere un modificatore di acidità (acido o base), un complessante o un solvente organico. L'approccio ha una evidente derivazione dalla chimica, dove è stato proposto per studiare la "speciazione" nei sedimenti, ma la sua applicazione in ecotossicologia introduce l'ovvia limitazione che l'estraente non deve essere di per sé tossico. Gli estratti sono comunemente utilizzati per rilevare la genotossicità dei sedimenti (Kammann *et al.*, 2000). Includono anche i saggi (sperimentali) di TIE in fase solida (esempio: Phillips *et al.*, 2006): comportando una marcata manipolazione del sedimento. Ciò non rientra più nella definizione di "sedimento intero" (ASTM, 1994).

Le combinazioni **D** e **F** indicano saggi nei quali una fase acquosa (acqua interstiziale o sovranatante), precedentemente separata dal sedimento intero, viene stratificato sopra una fase solida diversa dal sedimento di partenza (es. sedimento di riferimento o sedimento artificiale) e gli organismi sono esposti alla combinazione fase liquida – fase solida, per rispettare le esigenze di habitat degli organismi stessi.

Non è prevista una combinazione elutriati o estratti + fase solida, anche se teoricamente sarebbe possibile aggiungere un sedimento artificiale o di riferimento, perché non se ne trova riscontro in letteratura.

Le combinazioni **E** e **G** possono sembrare improbabili, ma sono spesso utilizzate, ad esempio con il polichete *Dinophilus gyrociliatus* (Nipper *et al.*, 2002), quando la presenza di una fase solida rende difficile ritrovare gli organismi esposti o comunque misurare l'endpoint, ma l'organismo bentonico è comunque in grado di sopravvivere in assenza di sedimento.

La combinazione **H** indica semplicemente i saggi in cui viene utilizzata una fase acquosa (acqua sovranatante o interstiziale), ma diversa dagli elutriati, con organismi liberamente natanti o flottanti. In senso lato, queste combinazioni comprendono anche le manipolazioni dell'acqua interstiziale per studi di TIE (Carr *et al.*, 2001c; Stronkhorst *et al.*, 2003a).

Un'ultima precisazione: per una batteria di routine si propone di utilizzare sistemi statici, o al massimo semi-statici (con rinnovo periodico del mezzo acquoso), perché i sistemi a flusso continuo, anche se disponibili (esempio: Dan Wall *et al.*, 1998), decisamente non sono fruibili a tutti i laboratori.

Gli ambienti di transizione richiedono un'attenzione particolare. Come ricordano Chapman e Wang (2001), in letteratura è possibile riscontrare metodiche poco appropriate: ad esempio, per esperimenti di Tipo **A** e **B** con sedimenti marini, ma sovrapponendo acqua dolce ed utilizzando organismi d'acqua dolce; oppure, con acqua interstiziale di estuario o elutriati, aumentando la salinità per utilizzare organismi marini. Ovviamente, ciò comporta una potenziale modifica della biodisponibilità, concentrazione e tossicità dei tossici. Gli Autori concludono che l'unico sistema ragionevole di determinare tossicità e biodisponibilità dei sedimenti di ambienti di transizione è quello di sottoporre ai saggi il sedimento tal quale, utilizzando organismi in grado di tollerare il range di condizioni di tali ambienti, in particolare le differenze di salinità.

In questo senso, potrebbero dunque essere utilizzati anche per campioni acquosi organismi eurialini, come ad esempio *Dunaliella tertiolecta*, che consente di eseguire saggi biologici a basse salinità, fino a 20 PSU (Onorati *et al.*, 2007).

Pertanto, per i vari ambienti, obiettivi e comparti, sono ritenuti prescritti i saggi:

- **A1(a, b, c, d)** **I** e **B1(a, b, c, d)** **I** – saggi di tipo H;
- **A2, 3, 4 (a)** e **B2, 3, 4 (a)** – saggi di tipo H, A, B (raccomandati D con acqua interstiziale e C e/o G);
- **A2, 3, 4 (b)** e **B2, 3, 4 (b)** – saggi di tipo H, A e/o B (raccomandati D con acqua interstiziale; C e/o G con sedimento immissario o solidi sospesi scarico);
- **A2, 3, 4 (c)** e **B2, 3, 4 (c)** – saggi di tipo H (raccomandati A e/o B);
- **A2, 3, 4 (d)** e **B2, 3, 4 (d)** – saggi di tipo H, A, B, D (raccomandati C e G);
- **A2, 3, 4 (e)** e **B2, 3, 4 (e)** – saggi di tipo A e B + H (**e₁**) o C (**e₂**, **e₃**).

Un ulteriore criterio, solitamente auspicato, per l'identificazione degli organismi da utilizzare nei saggi, sarebbe l'uso di specie ecologicamente rilevanti e (possibilmente) autoctone.

A questo proposito, va ricordato che, come ribadito nel documento ANPA (2000) *Elementi di identificazione delle acque di transizione*. RTI CTN_AIM 6./2000, il benthos di acque salmastre è meno ricco di specie sia rispetto alle comunità marine, sia a quelle dulciacquicole. Per gli ambienti di transizione quindi potrebbe essere più problematico identificare una vasta gamma di organismi rappresentativi, autoctoni, adatti per i saggi ecotossicologici.

Va poi sottolineato che, per una applicazione di routine e largamente diffusa tra laboratori pubblici e privati, probabilmente bisognerà orientarsi preferibilmente su organismi allevati/coltivati in laboratorio, piuttosto che raccolti in natura, oppure facilmente reperibili per vie commerciali, indipendentemente dal periodo stagionale (acquacolture e/o laboratori che commercializzano le specie di interesse, eventualmente anche in forma criptobiotica, quali cisti o spore).

Per quanto concerne la rilevanza ecologica, il Guidance Document No 2 cita esplicitamente alghe e piante tra gli elementi biologici importanti, pertanto sembra scontato inserire almeno un saggio con un vegetale.

Nella scelta degli animali, non bisogna poi dimenticare alcune considerazioni etiche. Come ricordano le linee guida ARPAL (2004) CTN – AIM *Monitoraggio dei sedimenti e delle biocenosi marine. Raccolta, adeguamento ed integrazione delle informazioni* le Direttive Europee limitano l'uso di vertebrati per i saggi di mortalità; inoltre, l'uso di specie non residenti può essere impedito perché tali specie non sono importabili e/o possono costituire un pericolo di immissione accidentalmente nell'ambiente, come ad esempio il caso di *Americamysis (ex Mysidopsis) bahia*, il cui impiego è previsto dal DD 23.12.2002 per la valutazione dell'impiego in mare di prodotti disinfettanti.

In realtà, la Direttiva 86/609 impone delle limitazioni per la sperimentazione con vertebrati, incluse le forme larvali (ma non menziona specificatamente i pesci), ed esplicitamente esclude le forme fetali o embrionali.

Tuttavia, anche se Cohen *et al.* (2003) suggeriscono addirittura di utilizzare vertebrati terrestri per il monitoraggio ecotossicologico di estuari, e Hoekzema *et al.* (2006) passano in rassegna numerosi sistemi per minimizzare il numero di pesci nei saggi, in considerazione della obiettiva difficoltà di mantenere un allevamento e di effettuare saggi con vertebrati, anche negli stadi embrionali e/o larvali, potrebbe essere necessario restringere il campo a batteri, vegetali e invertebrati. Si ricorda però che in Germania il saggio di embriotossicità su pesci è obbligatorio per il monitoraggio di effluenti.

Il Rapporto RTI CTN_AIM 4./2001 (ANPA, 2001) *Elementi per la caratterizzazione fisicochimica biologica ed ecotossicologica dei parametri addizionali (D.Lgs. 152/99) nella matrice acquosa, nel sedimento e nel biota*, riporta alcune considerazioni in merito al tipo di saggi ecotossicologici da utilizzare per gli ambienti marini e di transizione. Per le alghe, conferma che la legislazione italiana non indica alcuna specie, anche se vengono comunemente utilizzate *Dunaliella tertiolecta* Butcher, *Phaeodactylum tricornerum* e *Skeletonema costatum*. Occasionalmente, sono state impiegate per i saggi su acqua di mare alghe verdi (*Chlorella* sp., *Chlorococcum* sp.), brune, Diatomee (*Isochrysis galbana*, *Nitzschia closterium*, *Thalassiosira pseudonana*), e rosse (*Porphyridium cruentum*). Il saggio algale può essere utilizzato per il controllo dello stato trofico e della tossicità nei recettori, per la presenza di tossici ed elementi eutrofizzanti negli scarichi. Per la metodologia ed eventuali approfondimenti si rimanda al Quaderno ARPAT (1998) "Metodologie di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico". Non vengono presi in considerazione altri saggi ecotossicologici applicabili ad acque marine o salmastre.

Le linee guida ARPAL (2004) CTN – AIM *Monitoraggio dei sedimenti e delle biocenosi marine. Raccolta, adeguamento ed integrazione delle informazioni* propongono un elenco di metodi ufficiali, ripreso da Volpi Ghirardini e Pellegrini (2001). Le linee guida ARPAL raccolgono poi in una tabella i saggi ritenuti più interessanti, suddivisi per comparti. Queste indicazioni sono state prese in considerazione per l'estensione di questo documento, ma in funzione del diverso approccio utilizzato si è poi concordato di adottare batterie diverse da quelle elencate nelle linee guida ARPAL (2004).

Un altro esempio di come il problema può essere affrontato è rappresentato dalla attività della OSPAR Commission, che nel 2005 ha pubblicato il volume *Synergies in Assessment and Monitoring between OSPAR and the European Union. Analysis of synergies in assessment and monitoring of hazardous substances, eutrophication, radioactive substances and offshore industry in the North-East Atlantic. Volume I*. Questa pubblicazione puntualizza che la WFD non ha, o non ha ancora, emanato del-

le linee guida per il monitoraggio delle sostanze pericolose, mentre la OSPAR Commission, nell'ambito del Joint Assessment and Monitoring Programme, nel 1997 ha pubblicato le *JAMP Guidelines for General Biological Effects Monitoring*, che riportano alcuni saggi per sedimento, acqua interstiziale, elutriati e acqua (consultare i relativi *Technical Annexes*).

Nel 2004, assieme a ICES la OSPAR ha anche pubblicato gli Atti del *OSPAR/ICES Workshop on the evaluation and update of background reference concentrations (B/RCS) and ecotoxicological assessment criteria (EACs) and how these assessment tools should be used in assessing contaminants in water, sediment and biota*. 9 – 13 February 2004, The Hague. Non si parla però di saggi ecotossicologici, ma solo di valori di riferimento (concentrazioni) per acqua, sedimenti e biota (in particolare, pesci e *Mytilus edulis*) e di utilizzo di fattori di bioconcentrazione e biomagnificazione.

In teoria, una batteria di saggi ecotossicologici dovrebbe utilizzare un insieme di organismi rappresentativi delle diverse strategie riproduttive, abitudini alimentari, preferenze per il substrato, ecc. In effetti, Ducrot *et al.* (2005) hanno anche proposto un metodo basato sull'analisi statistica delle caratteristiche biologiche ed ecologiche delle specie bentoniche, ma è stato applicato solo ai sedimenti fluviali.

1.6 - APPLICAZIONI PER OBIETTIVI SPECIFICI

Verranno ora prese in considerazione le applicazioni, riportate nella letteratura scientifica, di batterie di saggi biologici per alcuni specifici obiettivi.

Obiettivo a: monitoraggio ambientale in generale (definizione dello stato di qualità ai sensi della WFD, D.Lgs. 152/06)

Questo obiettivo ha una possibile differenziazione (**a₁**) se il monitoraggio è inteso ad identificare strategie di recupero.

Proprio per la sua genericità, l'obiettivo **a** pone particolari problemi per la definizione di una batteria di routine che, presumibilmente, andrà applicata discontinuamente (anzi, al limite una sola volta), in aree per le quali si hanno scarse o nulle informazioni pregresse per quanto concerne l'ecotossicità dei sedimenti.

Ai fini della WFD e Dlgs. 152/99, dovrebbe essere inoltre teoricamente applicabile a 7375 km di coste, il che ovviamente pone dei severi limiti a numero e durata dei saggi.

Ad esempio, sarebbero certamente molto utili studi che prendano in considerazione una catena trofica, anche semplificata. Rice *et al.* (2000) hanno proposto uno studio su biomarker di un pesce, alimentato con policheti esposti a sedimenti contaminati, dimostrando l'estrema sensibilità della metodica. Ma la sola esposizione dei policheti dura 28 giorni ed è seguita da un periodo di 10 – 12 giorni di alimentazione dei pesci!

E' necessario, quindi, trovare un ragionevole compromesso tra realismo ecologico e fattibilità dei controlli di routine.

Partendo dal presupposto che, per questo obiettivo, per ciascuna area sono pensabili una o al massimo poche verifiche annuali (salvo ottenimento di una risposta che richieda approfondimento o monitoraggio intensificato nel tempo), è indispensabile affiancare ai saggi ecotossicologici uno studio sulle comunità bentoniche. Le analisi chimiche dei sedimenti non sono invece indispensabili, a meno di non avere informazioni pregresse che consentano di effettuare determinazioni mirate. In questo caso, il riferimento alle Sediment Quality Guidelines potrà contribuire ad indirizzare anche saggi di tossicità specifici.

In ambienti con substrato duro (**A1** e **B1**) ovviamente è prescritto il comparto **I** (acqua) e sono richiesti saggi di Tipo **H** (con acqua sovranatante, organismi non bentonici).

Per gli ambienti con substrati non duri **A2, 3, 4** e **B2, 3, 4** (sabbiosi, fangosi e misti), ovviamente sono prescritti i comparti **I** (acqua) e **IV** (sedimento). Raccomandato il comparto **II** (acqua interstiziale). Sono quindi necessari saggi di tipo **H, A, B** (raccomandati **D** con acqua interstiziale e **C** e/o **G**).

Considerando i sedimenti superficiali, secondo van der Brink e Kater (2006), tra i saggi indicati dal National Institute for Coastal and Marine Management (RIKZ) in Olanda, la rilevanza ecologica è:

- limitata - bioluminescenza *Vibrio fischeri* Microtox® Solid Phase, sospensione sedimento;
- moderata - sopravvivenza 1 d, *Brachionus plicatilis* Rototoxkit® acqua interstiziale;
- moderata - sopravvivenza e deformazione larvale 2 d, *Crassostrea gigas* elutriato;
- elevata - sopravvivenza 10 d, *Corophium volutator* sedimento intero, statico;
- elevata - sopravvivenza e comportamento (riseppellimento) 14 d, *Echinocardium cordatum* sedimento intero, flusso continuo.

Cioè, sostanzialmente, la rilevanza ecologica diminuisce se non si usa il sedimento intero ed aumenta per tempi di esposizione prolungati.

In Australia, uno studio su sedimenti superficiali di porti, laghi costieri e estuari (McCready *et al.*, 2004) ha riscontrato la seguente scala di sensibilità: sopravvivenza anfipodi < Microtox® acqua interstiziale < anfipodi infossamento < sviluppo larvale riccio < fertilizzazione riccio < Microtox® estratti con solventi.

Si ravvede quindi la necessità di studiare l'acqua interstiziale che, secondo la review di Carr *et al.* (2001a), è indicata per effettuare saggi con stadi embrionali e/o larvali (di molluschi, policheti, crostacei, echinodermi e pesci), e con organismi di differenti livelli trofici: produttori primari (alghe d'acqua dolce e marine) e consumatori primari (invertebrati d'acqua dolce o marini). I saggi di tossicità possono essere un ordine di grandezza più sensibili di quelli con sedimento intero e consentono studi di TIE (Carr *et al.*, 2001c; Stronkhorst *et al.*, 2003). Solitamente, sono anche più rapidi ed economici, ma possono richiedere un aggiustamento della salinità (Carr *et al.*, 2004).

Alcuni esempi:

- Bombardier e Bermingham (1999) hanno usato il saggio Microtox® (*Vibrio fischeri*) ed il saggio di inibizione della fertilizzazione con il riccio *Lytechinus pictus* (Environment Canada, 1992).
- Carr *et al.* (2001b) forniscono le metodiche operative standard per effettuare simultaneamente 3 saggi di tossicità con il riccio *Arbacia punctulata*: sulla fertilizzazione, lo sviluppo embrionale e di Genotossicità/Teratogenicità. Vengono indicati anche i pre-saggi su sperma e uova. Questi saggi sono accompagnati dal saggio di germinazione e crescita dei germogli, che utilizza zoospore quadriflagellate di *Ulva fasciata* e *U. lactuca*. In un successivo lavoro (Carr *et al.*, 2004) è stato usato il solo saggio sullo sviluppo embrionale su riccio.
- Stronkhorst *et al.* (2003) hanno applicato la TIE con saggi di sopravvivenza di *C. volutator*, bioluminescenza con *V. fischeri*, fertilizzazione e sviluppo embrionale 48 h con il riccio *Psammechinus miliaris*.
- Nello studio di TIE con acqua interstiziale di Thomas *et al.* (2003) è stato invece utilizzato il solo saggio di mortalità di *Tisbe battagliai* a 24 e 48 ore.

In generale, se lo studio viene effettuato per valutare il possibile recupero della zona (obiettivo a₁), la batteria comprende anche saggi raccomandati sui comparti III (elutriati) e V (estratti con solventi) e sarebbe opportuno utilizzare tecniche di TIE. Per questo scopo, si potrebbe proporre l'utilizzo del ROTAS™ (Rapid On site Toxicity ASSay), basato sui batteri bioluminescenti².

Obiettivo b: effluenti e ambienti recettori

L'applicazione di saggi di tossicità al monitoraggio degli effluenti ha ormai una lunga storia e sono quindi disponibili molti esempi di batterie. La scelta di organismi e endpoint spesso è condizionata dall'obiettivo principale, l'effluente oppure il recettore (Tinsley *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2004).

² http://www.cysense.com/images/upload/docum/CTPN200531_ROTAS.pdf

Secondo OSPAR (2007): “Lo scarico può presentare un diverso grado di salinità (da dulciacquicolo a prettamente marino). Idealmente, l’organismo test da impiegarsi dovrebbe essere in linea con le caratteristiche del corpo recettore (test con organismi marini per scarichi a mare, test con organismi d’acqua dolce per scarichi convogliati in laghi e fiumi). Nel momento in cui le caratteristiche dell’effluente sono diverse rispetto a quelle del corpo recettore (scarico dulciacquicolo recapitato in mare) dovrebbe essere compiuta una scelta: o modificare l’effluente (salinità, ...) o modificare il protocollo test (selezionare organismi d’acqua dolce anche se lo scarico è convogliato in mare). Ogni approccio presenta i suoi vantaggi e svantaggi e non possono essere dati al momento dei criteri generali di scelta”.

Ai fini delle presenti Linee Guida verrà preso in considerazione l’Obiettivo **b** (scarichi e recettori), ma con enfasi posta sul recettore: pertanto, sono prescritti i comparti **I** (acqua) e **IV** (sedimento) per il recettore (escludendo ovviamente gli ambienti con substrato duro **A1** e **B1**). Infatti, un controllo limitato all’acqua dell’immissario o scarico non garantisce l’assenza di rischio per l’ambiente recettore. Per questo deve essere previsto un saggio di tipo **A** o **B**, con sedimento intero del recettore e organismi bentonici o non bentonici.

Il comparto **I** (acqua) può richiedere batterie differenziate per acqua dolce (tributari di ambienti di transizione e scarichi) e acqua salata o salmastra (ambienti recettori). Non verranno comunque proposte batterie con saggi che prevedono organismi di acqua dolce, che esulano dagli scopi del presente lavoro.

Sono dunque da prevedere saggi di tipo **H** (con acqua sovranatante e organismi non bentonici, senza fase solida). Seguendo il criterio EPA, l’eventuale effetto tossico esercitato dai contaminanti presenti nell’acqua di scarico dolce dovrebbe essere determinato con organismi dell’ambiente marino o salmastro. In tal modo, viene simulato anche il comportamento dello scarico che, nella realtà, tenderà a diluirsi effettivamente nel recettore marino o salmastro. A tale scopo il campione di acqua di scarico potrebbe essere arricchito con una salamoia ottenuta mediante evaporazione dell’acqua di mare (Hypersaline brine - HSB).

Per acque salmastre (**A1, 2, 3, 4**) o salate (recettore **B1, 2, 3, 4** o scarichi salati), la batteria dovrebbe prevedere:

- saggi di Tipo **H**, acqua sovranatante;
- saggi di Tipo **A** con sedimento del recettore e organismi bentonici;
- saggi di Tipo **B** con sedimento del recettore e organismi non bentonici.

Ovviamente, le batterie per acque salmastre possono differire da quelle per acque salate perché gli organismi devono poter tollerare ampie variazioni nella salinità.

Altri saggi raccomandati sono quelli:

- di tipo **H**, con acqua interstiziale del recettore e organismi non bentonici, senza fase solida;
- di tipo **C** o **G**, con elutriati (o estratti) da sedimento intero dell’immissario (o solidi sospesi dello scarico) e organismi bentonici o non bentonici, per ipotizzare l’effetto di un rilascio di tossici dopo immissione del materiale solido sospeso nel recettore.

La review di Power e Boumphrey (2004) conferma che, se sono previsti saggi di tossicità per gli effluenti, in Europa la tendenza è quella di utilizzare batterie senza pesci, composte da batteri, piante ed invertebrati, che impiegano metodi standardizzati e privilegiando quando possibile i microbiotest. Inoltre, i saggi non si limitano più a rilevare la tossicità “acuta” ma anche la tossicità “cronica” e possibili effetti genotossici, mutageni, ecc.

Nel 2005 la OSPAR ha dedicato un volume a *Whole Effluent Assessment*. OSPAR ha infatti adottato il criterio PBT, cioè prevede una serie di saggi (biologici) per determinare Persistenza, Bioaccumulo e Tossicità degli effluenti, includendo gli effetti di distruttori endocrini e genotossici, con particolare riferimento alla suscettibilità delle acque marine come recapito degli effluenti.

La metodologia WEA proposta consiste di una combinazione di saggi per rilevare i potenziali effetti tossici acuti e cronici, la genotossicità, il bioaccumulo e la persistenza. I metodi, derivati da quelli

per sostanze pericolose, potrebbero facilmente essere standardizzati. Sono richiesti ulteriori studi per saggi di tossicità cronica e per il confronto e la validazione di due saggi di bioaccumulo.

OSPAR intende fornire un insieme di “strumenti”, dando cioè la possibilità di scegliere una batteria personalizzata. Dalle prove con 17 effluenti, di ospedali e di industrie di tipologie differenti (fine chemicals, farmaceutici, tessili, cartiere), in 7 diversi Paesi, emerge in generale che l'ordine di sensibilità relativo è: alghe > crostacei cronico > batteri \approx crostacei acuto > pesci acuto.

Il documento OSPAR aggiunge anche che i pesci potrebbero essere eliminati per considerazioni etiche, oltre che per la scarsa sensibilità e/o i costi. Questa raccomandazione è però opinabile, perché la sensibilità varia di molto in funzione dello stadio vitale che si utilizza, così come i costi: giovanili o larve corrispondono a volumi di acqua e costi di gestione minori.

Recentemente OSPAR (2005c) ha aggiornato l'ordine di sensibilità secondo quanto segue: alghe ~ ostriche > crostacei cronico > batteri ~ crostacei acuto > pesci acuto > piante acquatiche. In particolare, il saggio con ostriche rappresenta in alcune normative internazionali una realtà già consolidata (USEPA, 1995; SEPA, 2003; Girling *et al.*, 2004) con applicazioni routinarie finalizzate al controllo delle potenzialità ecotossicologiche degli scarichi e la valutazione dei rischi per il corpo recettore.

Sempre secondo OSPAR, dovrebbero invece essere inclusi saggi di bioaccumulo (membrane semipermeabili), di biodegradabilità, di genotossicità (OSPAR, 2002) e per i distruttori endocrini (OSPAR, 2003). In letteratura si trovano anche saggi di genotossicità con policheti (Jha *et al.*, 1996); con molluschi (Jha *et al.*, 2000); Comet assay con pesci (Kammann *et al.*, 2000; Nehls e Segner, 2005).

Per il bioaccumulo si veda anche JAMP *Guidelines for Monitoring Contaminants in Biota*, OSPAR Commission, Ref. No. 1999-2.

Per OSPAR, una batteria per il comparto acqua dolce dovrebbe comprendere almeno saggi con batteri, alghe e crostacei (cronico): *Vibrio fischeri* 30 min EC50 (Microtox[®]); *Pseudokirchneriella subcapitata* 72h EC50 ISO 8692; *Daphnia magna* 21d NOEC OECD 211. Invece per acque salate: *Vibrio fischeri* 30 min EC50 (Microtox[®]); *Skeletonema costatum* 72h EC50 EN ISO 10253-06; *Tisbe battagliai* 16d EC50 (in house method UK; ISO 14669 riporta 48h LC50). Per acque salmastre: *Vibrio fischeri* 30 min EC50 (Microtox[®]); *Skeletonema costatum* 72h EC50 EN ISO 10253-06; *Nitocra spinipes* 96h EC50 SS 02 81 06 (metodo svedese).

Per EPA, la WEA prevede saggi di tossicità acuta e cronica. Per la tossicità acuta, il manuale USEPA (2002a) indica per gli organismi di acqua dolce: *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia pulex* e *D. magna*, *Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss* e *Salvelinus fontinalis*. Per estuari ed acque marine: *Americamysis* (ex *Mysidopsis*) *bahia*, *Cyprinodon variegatus*, *Menidia beryllina*, *M. menidia*, e *M. peninsulae*.

Con riferimento alla tossicità cronica, il manuale EPA (2002b) riporta i saggi per 5 specie, due pesci, *Cyprinodon variegatus* e *Menidia beryllina*; un crostaceo, *Americamysis* (ex *Mysidopsis*) *bahia*; il riccio *Arbacia punctulata*; e la macroalga rossa *Champia parvula*. 4 metodi, oltre alla mortalità, hanno endpoint cronici di crescita o riproduzione (o entrambi). Il saggio a 9 giorni della sopravvivenza embrio-larvale con *Cyprinodon variegatus* rileva effetti teratogeni. Per il riccio l'endpoint è la fertillizzazione. La salinità viene corretta. La tossicità sub-cronica può essere stimata anche con *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis* (ci sarebbero anche *M. californianus* e *M. trossulus*) come riportato in USEPA (1995).

Obiettivo c: monitoraggio ai fini della balneazione

L'obiettivo c è essenzialmente inteso a prevenire possibili effetti indesiderati sull'uomo, quale utente delle spiagge.

Il Ministero della Salute³ afferma:

“L'Italia ha 7.375,3 km di costa marina, controllata per sei mesi l'anno, da aprile a settembre, con un monitoraggio bimensile effettuato sulla base del DPR 470/82 e successive modificazioni in recepimento alla direttiva europea 76/160 CE. Il monitoraggio viene svolto dai Dipartimenti provinciali

³ <http://www.ministerosalute.it>

delle ARPA sui punti di balneazione indicati dalle Regioni, per un totale di oltre 4.600 punti per il mare e 500 per le acque lacustri e fluviali”.

Il Decreto Legislativo 152 del 3 aprile 2006, nella parte Terza, *Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e di gestione delle risorse idriche*, all'Art. 83, *Acque di balneazione*, rimanda al Decreto del Presidente della Repubblica n. 470 - 08/06/1982, in Attuazione della direttiva CEE n. 76/160 relativa alla qualità delle acque di balneazione. Questo Decreto, modificato dai decreti legge 155/88 e 109/93, prevede solo alcuni parametri chimici e microbiologici, fissando limiti più severi rispetto a quelli dell'Unione europea: 2000 contro 10000 coliformi totali, batteri non patogeni considerati indicatori di contaminazione, in 100 ml di acqua; 100 contro 2000 coliformi fecali in 100 ml di acqua.

Un potenziale problema per la balneazione è l'insorgere di bloom di particolari alghe, in grado di produrre tossine pericolose non solo per gli animali acquatici, ma anche per il bagnante o per il consumatore di alimenti contaminati (es. bivalvi filtratori). I valori soglia italiani per le acque di balneazione sono espressi nella circolare del Ministero della Sanità del 31/7/1998: ad esempio, a proposito delle microalghe tossiche, “*si consiglia una soglia di 500 cell/ml per interdire totalmente la balneazione in acque con fioriture algali da Cianoficce in atto [...]*”.

Linee guida sono state predisposte dalla OMS nel 2004 (si veda in particolare Chapter 7, *Algae and Cyanobacteria in coastal and estuarine waters*).

Secondo l'UNESCO, su circa 5000 alghe, solo 300 possono proliferare fino a formare bloom, e di queste 75 possono produrre tossine (Andersen, 1996). Il monitoraggio possibile consiste nel campionamento molto frequente del fitoplancton ed eventuale ricerca di tossine nel momento della fioritura di alghe identificate come potenzialmente tossiche.

In questa fase potrebbe essere possibile utilizzare un saggio con *Vibrio fischeri*, o altro saggio speditivo sufficientemente sensibile, per verificare la presenza di agenti tossici, ma in generale non sembrano disponibili in bibliografia saggi ecotossicologici che permettano di prevedere l'eventuale insorgenza del fenomeno. Infatti, nella review di Pierce e Kirkpatrick (2001), vengono descritti diversi metodi di determinazione delle ficotossine, nelle acque o nei prodotti destinati all'alimentazione umana (molluschi e pesci), oppure di identificazione delle microalghe produttrici di tossine, ma tutti i saggi vengono applicati a posteriori, quando cioè il problema si è già manifestato con un impatto sulla salute pubblica, e non come tecniche di routine di controllo della balneazione.

Tuttavia, la proliferazione algale di specie tossiche e non, è legata a condizioni di elevata eutrofizzazione, quindi un saggio di crescita con alghe potrebbe servire a stabilire se esistono condizioni predisponenti il bloom. E però da verificare se un saggio algale (es. il metodo ARPAT, 1998, come riportato in Sbrilli *et al.*, 1999; 2000), possa effettivamente stabilire se esistono condizioni predisponenti il bloom di microalghe tossiche.

Teoricamente sarebbe anche possibile che un bagnante possa subire danni per una esposizione ad acque e/o sedimenti contaminati da tossici chimici, ma la possibilità sembra così remota da non richiedere un controllo ecotossicologico di routine di tutte le aree balneabili.

Inoltre, la tossicità per vertebrati superiori si manifesta solitamente a concentrazioni più elevate di quella rilevabile per gli organismi solitamente utilizzati nei saggi ecotossicologici. Persino i limiti per le acque potabili sono superiori, così diventa trascurabile anche il rischio per ingestione accidentale di modeste quantità di acqua di mare.

Quindi, considerando che molte, se non tutte, le aree destinate alla balneazione dovranno essere monitorate in generale per rispondere ai requisiti della WFD e del D.Lgs. 152/06, non sembra necessario pensare a batterie di saggi esplicitamente formulate per questo obiettivo.

Potrebbe però essere proponibile il saggio con batteri bioluminescenti (*Vibrio fischeri*) ed il kit ELISA per le micotossine algali.

Obiettivo d: salvaguardia, protezione e recupero di ambienti particolari

L'obiettivo **d** (suddiviso in **d₁**: riserve, parchi e zone di particolare pregio naturalistico; **d₂**: ittiocolture e molluschicoltura, ecc.) rappresenta un caso particolare del monitoraggio ambientale e richiede solo un livello superiore di attenzione.

Il Decreto Legislativo 152 del 3 aprile 2006, nell'Allegato II (*Criteri per la classificazione dei corpi idrici a destinazione funzionale*) alla parte Terza, *Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e di gestione delle risorse idriche*, Tabella 1/C, stabilisce un elenco di parametri fisici e chimici che devono essere rispettati, ma non prescrive saggi ecotossicologici. Si richiede però l'esame gustativo dei molluschi, per accertare l'assenza di sostanze che influiscono sul sapore, e la determinazione della "sassitossina (prodotta dai dinoflagellati)", ma senza indicare il metodo di analisi. Lo stesso Decreto Legislativo 152 del 3 aprile 2006, al Titolo III, capo IV della parte Terza, Art. 111, indica poi che un altro decreto individuerà i criteri per contenere l'impatto ambientale di acquaculture e piscicoltura.

Pertanto, si propone che per tutti gli ambienti vengano utilizzate le batterie del monitoraggio ambientale in generale, ma rendendo obbligatori (prescritti) anche i saggi che per l'obiettivo **a** erano raccomandati.

Inoltre, nel caso di ittiocolture e molluschicoltura, è indispensabile affiancare i saggi di tossicità con studi di bioaccumulo, sia *in situ*, ad esempio con bivalvi (ASTM, 2002a), sia in laboratorio (ASTM, 2000b), sia con membrane semipermeabili (OSPAR WEA 2005). Tra gli organismi adatti, viene indicato anche il *Mytilus galloprovincialis*, utilizzabile per salinità comprese tra 10 e 33‰ (espressamente citato dal D.Lgs. 152/99). Ma questo tipo di saggi esulano dal compito di questo gruppo di lavoro.

Obiettivo e: dragaggi

Il Decreto Legislativo 152 del 3 aprile 2006, nella parte Terza, *Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e di gestione delle risorse idriche*, Titolo III, *Tutela dei corpi idrici e disciplina degli scarichi*, Capo IV, *Ulteriori misure per la tutela dei corpi idrici*, Art. 109, *Immersione in mare di materiale derivante da attività di escavo e attività di posa in mare di cavi e condotte*, indica solo che è necessaria una autorizzazione, ma non specifica su quali basi l'autorizzazione viene rilasciata o negata. Al Titolo IV, *Strumenti di tutela*, Capo II, *Autorizzazione agli scarichi*, l'Art. 137, *Fanghi derivanti dal trattamento delle acque reflue*, precisa che è vietato il loro smaltimento in acque superficiali dolci e salmastre.

Tuttavia, il DLgs. 152/2006 rimanda alla emanazione di uno specifico decreto ministeriale con i relativi allegati tecnici. ICRAM e APAT, su richiesta del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, nell'Agosto 2006 (con successiva revisione nel Novembre 2007) hanno redatto il "Manuale per la movimentazione di sedimenti marini", che rappresenta la base tecnica del decreto attuativo attualmente in fase di concertazione con altri Dicasteri. Tale testo riporta:

"Contestualmente alla caratterizzazione chimico-fisica, o successivamente alle risultanze analitiche, devono essere condotte analisi ecotossicologiche che concorrono alla definizione della qualità dei materiali da dragare. Esse devono essere eseguite su aliquote di sedimento "fresco" (non congelato), secondo quanto riportato al punto 3.1.

Per il prelievo di sabbie da aree litoranee utilizzate per attività di manutenzione ordinaria di ripascimento (punto 4.4.1), l'esecuzione delle analisi ecotossicologiche (saggi biologici di tossicità) può essere valutata caso per caso, in funzione del livello di conoscenze pregresse sull'area e in accordo con l'Autorità competente al rilascio dell'autorizzazione.

Nel caso in cui i saggi biologici vengano eseguiti contestualmente alle analisi di cui al punto 2.2.1, questi devono essere eseguiti su almeno 1/3 dei campioni, distribuiti in maniera rappresentativa in tutto il volume di materiale da caratterizzare.

Nel caso di indagini eseguite a posteriori rispetto alle analisi di cui al punto 2.2.1, i saggi biologici devono essere eseguiti su almeno 1/3 dei campioni, distribuiti in modo tale da perseguire il massimo riutilizzo quantitativo dei sedimenti, seguendo le priorità di gestione riportate in Tab. 2.2.

La lista di specie utilizzabili è la seguente:

ALGHE

- *Dunaliella tertiolecta*;
- *Pheodactylum tricornutum*;
- *Skeletonema costatum*

BATTERI

- *Vibrio fischeri*

ROTIFERI

- *Brachionus plicatilis*

MOLLUSCHI

- *Crassostrea gigas*
- *Mytilus galloprovincialis*
- *Tapes philippinarum*

CROSTACEI

- *Acartia clausi*;
- *Acartia tonsa*;
- *Ampelisca diadema*;
- *Balanus* (= *Amphibalanus*) *amphitrite*;
- *Corophium insidiosum*;
- *Corophium orientale*;
- *Tisbe battagliai*;
- *Tigriopus fulvus*

ECHINODERMI

- *Paracentrotus lividus*;
- *Sphaerechinus granularis*;

PESCI

- *Dicentrarchus labrax*;
- *Sparus aurata*

Devono essere scelte almeno tre specie-test appartenenti a gruppi tassonomici diversi, di cui almeno una da applicare alla fase solida del sedimento (sedimento tal quale o privato dell'acqua interstiziale) e almeno una da applicare alla fase liquida (elutriato), così come riportato al punto 3.2.2.

A garanzia della qualità del dato, un soggetto pubblico deve verificare l' idoneità delle metodiche utilizzate per le analisi ecotossicologiche, eventualmente eseguendo contemporaneamente le analisi su almeno un campione".

Il Manuale ricordato propone inoltre una precisa e dettagliata classificazione qualitativa dei sedimenti integrando i dati chimici ed ecotossicologici. Per questi ultimi individua delle classi di risposta in funzione delle EC20 ed EC50.

Per quanto riguarda l'applicazione di batterie di saggi ecotossicologici all'estero, una approfondita review per vari comparti dei sedimenti marini è stata compilata dall'Agenzia Federale dell'Ambiente Tedesca (Herbst e Nendza, 2000; Nendza, 2002), prendendo in considerazione: sensibi-

lità, specificità, disponibilità degli organismi, variabilità del metodo, costo/efficacia, etica, standardizzazione e intercalibrazione. Sono così state definite batterie per tre livelli a complessità crescente:

- Livello 1: monitoraggio e rilevamento di impatti tossici;
- Livello 2: caratterizzazione di impatti tossici;
- Livello 3: verifica di alterazioni *in situ*.

Al primo livello si prevedono saggi su elutriati (bioluminescenza con *V. fischeri*, crescita alghe *P. tricornutum* e/o *S. costatum*), sospensioni di sedimento (sviluppo embrio-larvale con bivalvi *C. gigas* e/o echinoidi *A. punctulata*) e sedimento intero (sopravvivenza anfipode *C. volutator* e/o *Bathyporeia sarsi*).

Al secondo livello vengono utilizzati saggi su elutriati (spermiotossicità con bivalvi *C. gigas* o echinoidi *A. punctulata*, sopravvivenza con crostacei *T. battagliai*, *A. tonsa*, *N. spinipes* e con pesci), su sedimento intero (sopravvivenza con anfipode + miside, crescita e riproduzione con anfipodi e/o policheti), su estratti (mutagenicità con batteri *S. typhimurium*).

Al terzo livello sono previsti studi sulla struttura della comunità, biomarker e bioaccumulo.

Sembra promettente il saggio combinato di sopravvivenza a 96 h di *Ampelisca abdita* e *Americamysis (ex Mysidopsis) bahia*, oppure *C. volutator* (o *B. sarsi*) e *T. battagliai* (o *A. tonsa*). Si tratta di un saggio con sedimento intero, con 10 anfipodi e 10 misidacei introdotti in una camera con 20 g sedimento umido e 60 mL acqua di mare. Purtroppo, *A. bahia* non è reperibile in Italia. Nendza (2002) ricorda inoltre che *C. volutator* e *B. sarsi* pongono problemi di reperibilità degli organismi (non allevabili) e di mortalità estiva dei controlli.

Tuttavia, per questo specifico obiettivo, la reperibilità stagionale non dovrebbe essere insuperabile, purché lo studio di fattibilità del dragaggio venga effettuato nei periodi adatti.

In sintesi, le batterie teoricamente proponibili, in funzione della rilevanza di ciascun saggio, degli ambienti (esclusi ovviamente ambienti **A1** e **B1**, substrati duri) e degli obiettivi, potrebbero essere le seguenti:

Ambienti **B2** (sabbia - ghiaia), **B3, 4** (acque costiere, substrato fangoso o sedimenti misti) e obiettivo (**e₁**, effetti sul sito dragato):

- saggio Tipo **A** (con sedimento intero e organismi bentonici);
- saggio Tipo **B** (con sedimento intero e organismi non bentonici);
- saggio Tipo **H** (con acqua interstiziale e organismi non bentonici).

Per gli obiettivi **e₁**, effetti sul sito dragato, **e₂** e **e₃**, smaltimento rispettivamente a terra e in mare aperto di sedimento dragato da ambienti **B2, B3, B4**, sono da prevedere anche saggi di Tipo C, con elutriati (o estratti) da sedimento intero e organismi non bentonici.

Per gli ambienti di transizione **A2, 3, 4** si applicano le stesse batterie dei corrispondenti ambienti **B**, con l'accorgimento di preferire organismi tolleranti le variazioni di salinità.

Concludendo, nella review di Long *et al.* (2001) si ribadisce che i saggi ecotossicologici per il materiale dragato costituiscono l'approccio migliore per integrare gli effetti di contaminanti multipli, anche se non sono predittori precisi degli effetti ambientali. Infatti, la loro rilevanza ecologica non è ancora stata provata e, più in particolare, una certa percentuale di mortalità degli organismi di una data specie in saggi di laboratorio non implica automaticamente che una popolazione della stessa specie, nel sito di sversamento dei fanghi dragati, sia soggetta alla stessa percentuale di mortalità, in quanto le caratteristiche sedimentologiche reali non vengono adeguatamente simulate nei saggi di laboratorio. Per questo, Long *et al.* (2001) ritengono che i saggi ecotossicologici siano certamente necessari, ma non possano sostituire l'analisi della comunità bentonica.

1.7 - Conclusioni

Un approfondito esame della letteratura scientifica ha permesso di identificare un possibile approccio per la identificazione di batterie di saggi ecotossicologici differenziate in funzione del tipo di ambiente sul quale verrà effettuata l'indagine e dell'obiettivo prefissato. Infatti, le diverse combinazioni ambiente – obiettivo determinano i requisiti che la batteria di saggi ecotossicologici dovrebbe avere per quanto concerne matrici, organismi ed endpoint da utilizzare.

Per quanto concerne i possibili “obiettivi”, anche se i D.Lgs. 152/99 e D.Lgs 258/00 prescrivono esplicitamente che “dovranno essere eseguite obbligatoriamente indagini sulle biocenosi di maggior pregio ambientale (praterie di fanerogame, coralligeno, etc.)”, non sembra possibile identificare batterie specifiche per questi ambienti, che quindi dovranno essere considerati in funzione delle caratteristiche ambientali generali e rientrare tra le aree di transizione o costiere, distinte per il tipo di substrato (duro, sabbioso-ghiaioso, fangoso, misto).

Le batterie devono essere identificate soprattutto in funzione del loro utilizzo di routine. Ad esempio, vanno privilegiati gli organismi allevabili, oppure facilmente reperibili per vie commerciali indipendentemente dal periodo stagionale (acquaculture e/o laboratori che commercializzano le specie di interesse, anche in forme criptobiotiche). Per il requisito della praticità (specie allevabili e/o reperibili in commercio) sarebbe auspicabile che fossero creati degli “allevamenti centralizzati”, in grado di fornire il materiale biologico a richiesta. Va però tenuto presente che l'adozione di specie allevabili, ma alloctone, potrebbe richiedere una autorizzazione e certamente, se venisse ravvisata l'esigenza di inserire una tale specie in una batteria, andranno indicate le opportune avvertenze per evitare l'introduzione nell'ambiente di una specie alloctona. Poiché non è pensabile chiedere che ciascun laboratorio mantenga un numero elevato di allevamenti diversi, si deve cercare anche di contenere il più possibile il numero di saggi da includere in una batteria, pur mantenendo allo stesso tempo una buona copertura per sensibilità e rilevanza ecologica (tutte le batterie dovrebbero includere almeno batteri, alghe e invertebrati e prevedere la rilevazione di endpoint diversi, non solo letali).

Sempre in riferimento alla routine, le differenze tra batterie in funzione dell'ambiente e del substrato vanno limitate all'essenziale, anche se è evidente che sarà necessario tener conto delle esigenze degli organismi in funzione della salinità e del substrato. Oltre al saggio appropriato per il substrato dominante, si propone però di utilizzare anche un saggio di tipo A per gli altri substrati ogni volta che un tipo di substrato non dominante copre almeno il 25% dell'area (salvaguardando comunque, la discrezionalità dell'operatore, che può autonomamente decidere di saggiare anche substrati relativamente rari, ovviamente con la batteria appropriata, se ne ravvisa la necessità).

Ancora privilegiando l'utilizzo di routine, per i vari saggi preferibilmente andranno proposti sistemi statici, o al massimo semi-statici (con rinnovo periodico del mezzo acquoso), perché i sistemi a flusso continuo, anche se disponibili (esempio: Dan Wall *et al.*, 1998), decisamente non sono alla portata di tutti i laboratori.

Al momento, le presenti Linee Guida non contemplano i biomarker, considerandoli allo stato attuale non ancora proponibili per batterie di routine, anche in considerazione del grado di standardizzazione relativamente basso e delle difficoltà di interpretazione in chiave ecosistemica (Forbes *et al.*, 2006). Ciò non toglie che, tra le raccomandazioni, in taluni casi si possa indicare anche la necessità di affiancare i saggi di tossicità con studi sulla composizione quali-quantitativa del benthos, di bioaccumulo e di biomarker.

Nella successiva tabella 1.1 sono sintetizzati tutti i tipi di saggi identificati in funzione dei comparti e degli obiettivi.

Sulla base dei criteri così identificati è stato elaborato un metodo di valutazione delle batterie di saggi ecotossicologici che teoricamente potrebbero essere proposte. Tale metodo viene proposto e discusso nel Capitolo 2.

Tab. 2.1 – Saggi prescritti e raccomandati per gli ambienti A e B in funzione dei comparti e degli obiettivi.

Substrato		Ambienti di transizione (A) – Acque marine costiere (B)								
		prescritti				raccomandati				
			1 duro	2 sabbia ghiaia	3 fango	4 misto	1 duro	2 sabbia ghiaia	3 fango	4 misto
Obiettivi	a - monitoraggio ambientale	Co	I	I-IV	I-IV	I-IV		II	II	II
		Sa	H	A-B-H	A-B-H	A-B-H		D-C/G	D-C/G	D-C/G
	a₁ - recupero	Co	I	I-IV	I,IV	I,IV		II-III-V	II-III-V	II-III-V
		Sa	H	A-B-H	A-B-H	A-B-H		D-C/G	D-C/G	D-C/G
	b - scarichi idrici	Co	I	I	I	I		III-V	III-V	III-V
		Sa	H	A/B-H	A/B-H	A/B-H		D-C/G	D-C/G	D-C/G
	b₁ - ambienti recettori	Co	I	I-IV	I-IV	I-IV		II	II	II
		Sa	H	A/B-H	A/B-H	A/B-H		D-C/G	D-C/G	D-C/G
	c – balneazione	Co	I	I	I	I		IV	IV	IV
		Sa	H	H	H	H		A/B	A/B	A/B
	d - ambienti particolari	Co	I	I-II-IV	I-II-IV	I-II-IV				
		Sa	H	A-B-D-H	A-B-D-H	A-B-D-H		C-G	C-G	C-G
	d₁ - riserve, parchi e zone di particolare pregio naturalistico	Co	I	I-II-IV	I-II-IV	I-II-IV				
		Sa	H	A-B-D-H	A-B-D-H	A-B-D-H		C-G	C-G	C-G
	d₂ - ittiocolture e molluschicoltura	Co	I	I-II-IV	I-II-IV	I-II-IV				
		Sa	H	A-B-D-H	A-B-D-H	A-B-D-H		C-G	C-G	C-G
	d₃ - recupero di zone particolari degradate	Co	I	I-II-IV	I-II-IV	I-II-IV		III-V	III-V	III-V
		Sa	H	A-B-D-H	A-B-D-H	A-B-D-H		C-G	C-G	C-G
	e - sedimenti da dragare	Co		IV	IV	IV				
		Sa		A-B	A-B	A-B				
	e₁ - effetti nel sito da dragare e nelle aree adiacenti	Co		IV-II-III	IV-II-III	IV-II-III				
		Sa		A-B-H	A-B-H	A-B-H				
	e₂ - effetti nel sito di smaltimento a terra	Co		IV	IV	IV		V	V	V
		Sa		A-B-C	A-B-C	A-B-C				
e₃ - effetti nel sito di deposizione in mare	Co		III-IV	III-IV	III-IV					
	Sa		A-B-C	A-B-C	A-B-C					

Comparti (Co)

- I** acqua sovranatante o della colonna soprastante
- II** acqua interstiziale
- III** elutriati
- IV** sedimento intero
- V** estratti con solventi

Saggi (Sa)

- A** Con sedimento intero e organismi bentonici
- B** Con sedimento intero e organismi non bentonici
- C** Con elutriati (o estratti) da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida
- D** Con acqua sovranatante o interstiziale + fase solida (es. sedimento artificiale) e organismi bentonici
- E** Con acqua sovranatante o interstiziale e organismi bentonici, senza fase solida
- F** Con acqua sovranatante o interstiziale + fase solida (es. sedimento artificiale) e organismi non bentonici
- G** Con elutriati (o estratti) da sedimento intero e organismi bentonici, senza fase solida
- H** Con acqua sovranatante o interstiziale e organismi non bentonici, senza fase solida

CAPITOLO 2: CRITERI DI GIUDIZIO PER LA VALUTAZIONE DELLA VALENZA ECOLOGICA E PRATICA DI BATTERIE DI SAGGI BIOLOGICI

2.1 - Introduzione

In ecotossicologia è ormai accettato il principio che la potenziale tossicità di un materiale di prova (naturale e/o sintetico) possa essere accertata solo utilizzando una batteria di saggi ecotossicologici, poiché nessun singolo modello sperimentale è in grado di garantire in assoluto, da solo, l'attendibilità dei risultati per tutte le possibili tipologie di matrici e/o sostanze.

Resta, quindi, il problema di verificare quale batteria di saggi ecotossicologici sia effettivamente in grado di rispondere alle esigenze, in particolare considerando requisiti di scientificità e praticità: infatti, se da un lato è necessario garantire che i saggi biologici che compongono la batteria abbiano solide basi conoscitive sull'ecologia strutturale e funzionale dei modelli sperimentali proposti, dall'altro è indispensabile contenerne numero e complessità entro limiti ragionevoli, compatibili con una applicazione di routine.

In tal senso, il presente Capitolo tenta di identificare i criteri di giudizio sui quali basare una valutazione della valenza ecologica e pratica di batterie di saggi ecotossicologici, così da consentire un confronto tra batterie già in uso e nuove batterie che, ipoteticamente, potrebbero essere proposte per conseguire obiettivi di salvaguardia ambientale di vario tipo. Vengono, quindi, descritte due metodologie distinte concernenti i criteri per la ponderazione esperta di alcuni fattori ritenuti che, verosimilmente, concorrono alla valutazione della valenza "ecologico - scientifica" e di "praticità - fruibilità" di batterie di saggi ecotossicologici, in funzione del tipo di ambiente e della applicazione.

È di fondamentale importanza premettere che tale proposta deve essere intesa come una possibile "convenzione" (ancorché da perfezionare e modificare sulla base delle esperienze applicative dei vari gruppi di ricerca) che consenta di "giudicare" e quindi confrontare in maniera obiettiva, attraverso la ponderazione esperta di alcune variabili, la valenza di qualunque batteria di saggi biologici, in termini di rappresentatività ecologica e/o praticità di realizzazione/applicazione.

Essa, inoltre, fornisce gli elementi per la costituzione di batterie di saggi "relativamente aperte", i cui parametri di valutazione possono essere periodicamente aggiornati, in funzione delle nuove acquisizioni scientifiche, normative o più semplicemente in base all'esperienza già maturata nell'ambito dei vari gruppi di ricerca nazionali.

In particolare, vengono individuati alcuni parametri ai quali viene assegnato un punteggio, mediante giudizio esperto, da combinare opportunamente nella formulazione di un indice numerico, affinché la batteria in esame possa essere considerata rappresentativa dell'ambiente di studio e dello scopo dell'indagine ambientale.

Viene, inoltre, stabilito inoltre un punteggio minimo (valido solo per l'indice di valenza ecologica della batteria) derivante dalla sommatoria dei parametri codificati, al fine di considerare ammissibile, cioè sufficientemente rappresentativa dell'ambiente e dell'applicazione specifica, la particolare batteria di saggi biologici costituita.

2.2 - Valenza ecologica della batteria di saggi biologici

2.2.1 Prerequisiti

Qualunque batteria di saggi biologici deve soddisfare, indipendentemente dall'ambiente di studio e dalla specifica applicazione, i seguenti prerequisiti:

1. La batteria di saggi ecotossicologici deve presentare, indipendentemente dal numero di end-point, almeno 3 specie di organismi.
2. Gli stadi vitali delle specie selezionate utilizzati nei saggi devono essere ben distinti dal punto di vista filogenetico ed appartenere a livelli funzionali diversi selezionati tra: un produttore primario vegetale, un decompositore/saprofita, un detritivoro/filtratore, un consumatore propriamente detto.
3. La batteria di saggi ecotossicologici selezionata dovrebbe possedere una sensibilità e un potere discriminatorio complessivi tale da renderla capace di rispondere al maggior numero di forme di inquinamento possibile.

Si propone quindi che la batteria debba prevedere: almeno un saggio con batteri eterotrofi o organismi vegetali; almeno un saggio con consumatori propriamente detti; almeno un saggio con un'esposizione prolungata o un endpoint diverso dalla mortalità - immobilità.

2.2.2 Parametri da ponderare mediante giudizio esperto

I parametri ritenuti significativi per una corretta valutazione della valenza ecologica e della praticità – applicabilità di una batteria che soddisfa i prerequisiti sopra citati sono i seguenti:

1. **Standardizzazione dell'endpoint (S_{ep}).** Il saggio ecotossicologico da includere nella batteria deve poter garantire il confronto tra laboratori diversi e quindi deve essere basato su un protocollo metodologico di provata affidabilità, definito in tutti i particolari che potrebbero influenzare i risultati della prova (strumentazione e materiali di laboratorio, reagenti, organismi, ecc.), con particolare riferimento alle specie considerate, alle matrici del campione di prova e agli ambiti di applicazione. Pertanto, si propone che questo parametro assuma un fattore di ponderazione proporzionale al livello di standardizzazione del protocollo metodologico secondo il percorso di normazione stabilito in ambito UNICHIM, ovvero:
 - (a) **livello I** - l'endpoint considerato, a carattere sperimentale, è stato descritto dettagliatamente e pubblicato almeno una volta su una rivista nazionale o internazionale con referee;
 - (b) **livello II** - l'endpoint considerato è stato pubblicato ed è stato "validato" da almeno un esercizio di interconfronto con un numero di laboratori ≥ 8 o normato da un ente nazionale straniero (es. AFNOR, DIN, EPA, ASTM, ecc.);
 - (c) **livello III** - l'endpoint considerato è standardizzato da un ente sovranazionale (ISO, CEN, OECD, ecc.) e/o normato dall'ente di normazione nazionale italiano (UNI).
2. **Rappresentatività della Specie nell'ecosistema di studio (RS_{eco}).** Essa dovrebbe essere proporzionale al periodo del ciclo vitale della specie-test effettivamente trascorso nell'ambiente di studio, indipendentemente dalla distribuzione geografica dell'organismo e dai rapporti con la matrice.
3. **Valenza della distribuzione geografica della specie-test (DG).** Essa dovrebbe essere proporzionale alla presenza/assenza dell'organismo nel Mediterraneo e nella specifica area costiera oggetto di studio.
4. **Rappresentatività dello Stadio Vitale impiegato nella matrice (RSV_M).** Essa dovrebbe essere proporzionale al rapporto che lo specifico stadio del ciclo vitale impiegato nel saggio ecotossicologico contrae in natura con la matrice considerata.

5. **Rappresentatività della Matrice rispetto all'applicazione (RM_{appl}).** Essa dovrebbe essere proporzionale alla importanza della matrice sulla quale viene eseguito il saggio ecotossicologico rispetto agli obiettivi dell'indagine (ad esempio l'elutriato, che simula la movimentazione dei sedimenti, possiederà la massima rappresentatività in caso di dragaggio, mentre avrà minor peso in caso di monitoraggio costiero). Per una descrizione approfondita degli obiettivi possibili dell'indagine, si rimanda alla Parte 1 del documento "Batterie per saggi ecotossicologici su sedimenti in acque di transizione e marine costiere";
6. **Rilevanza e Sensibilità dell'Effetto (RES).** Nel caso in cui si intenda valutare la valenza ecologica della batteria in termini predittivi e di prevenzione, quindi rispetto alla sua capacità di rilevare segnali biologici precoci, essa dovrebbe essere inversamente proporzionale alla gravità degli effetti, in funzione del periodo di esposizione. Ciò significa che si avranno fattori di ponderazione elevati per effetti sub-letali di lunga esposizione e fattori di ponderazione bassi per effetti letali acuti da misurare su brevi periodi espositivi.

I 6 parametri così identificati vengono combinati, con l'algoritmo in seguito descritto, utilizzando una "ponderazione esperta", assegnando cioè a ciascuno di essi un fattore numerico.

Le scale dei fattori di ponderazione proposte hanno una estensione simile, per evitare che un parametro assuma automaticamente un "peso" predominante, e sono contenute in un campo volutamente limitato (da 4 a 7 fattori), per non complicarne eccessivamente l'interpretazione.

Per i parametri sopra identificati vengono quindi proposti i seguenti fattori numerici di ponderazione (FP):

FP	Standardizzazione dell'endpoint (S _{ep})
0	Quando l'endpoint considerato, così come riportato nel protocollo (specie considerate, matrici e ambiti di applicazione) è di carattere puramente sperimentale, non è mai stato dettagliatamente descritto in una pubblicazione con referee, né sottoposto ad interconfronto.
1	Quando l'endpoint considerato, così come riportato nel protocollo (specie considerate, matrici e ambiti di applicazione), è stato descritto dettagliatamente e pubblicato almeno una volta su una rivista nazionale o internazionale (Livello I normazione UNICHIM).
2	Quando l'endpoint considerato, così come riportato nel protocollo (specie considerate, matrici e ambiti di applicazione), è stato pubblicato ed è stato "validato" da almeno un esercizio di interconfronto con ≥ 8 laboratori o normato da un ente nazionale straniero (es. AFNOR, DIN, EPA, ASTM, ecc.) (Livello II normazione UNICHIM).
3	Quando l'endpoint considerato, così come riportato nel protocollo (specie considerate, matrici e ambiti di applicazione), è standardizzato da un ente sovranazionale (ISO, CEN, OECD, ecc.) e/o normato dall'ente di normazione nazionale italiano (UNI) (Livello III normazione UNICHIM).

FP	Rappresentatività della Specie nell'area di Studio (RSeco)
1	Quando la specie-test non trascorre nessun periodo del proprio ciclo vitale nell'area di studio (laguna, porto, foce fluviale, mare aperto, fondali mobili, scogliere, bassi fondali mobili, ecc.).
2	Quando la specie-test trascorre almeno parte dello stadio da adulto nell'area di studio.
3	Quando la specie-test trascorre almeno parte degli stadi giovanili (uovo-larva-subadulto) nell'area di studio.
4	Quando la specie-test trascorre l'intero ciclo vitale nell'area di studio.

È opportuno precisare che RS_{eco} non si riferisce alle specie indigene e/o endemiche (tale aspetto viene ponderato in un fattore successivo), ma a specie magari non presenti nell'area geografica di studio, perché con una diversa distribuzione geografica (atlantica, tropicale, ecc.), ma che nel loro areale vivono nello stesso tipo di ambiente o habitat e che sono pertanto, da questo punto di vista, rappresentative di un determinato ecosistema.

FP	Distribuzione Geografica della specie test (DG)
1	Quando la specie test presenta un areale di distribuzione extra mediterranea
2	Quando la specie test presenta un areale di distribuzione cosmopolita (incluso il Mediterraneo)
3	Quando la specie test, cosmopolita, è effettivamente presente nello specifico tratto di costa o area oggetto di studio
3,5	Quando la specie test risulta endemica del Mediterraneo
4	Quando la specie test, endemica del Mediterraneo, è effettivamente presente nello specifico tratto di costa o area oggetto di studio

FP	Rappresentatività dello Stadio Vitale impiegato nella matrice (RSVM)
1	Quando lo stadio vitale impiegato nel saggio biologico in natura non contrae alcun rapporto con la matrice da testare
2	Quando la specie-test in natura contrae un rapporto con la matrice da testare in una fase del ciclo vitale diversa da quella impiegata nel saggio biologico
3	Quando la specie-test in natura contrae rapporti con la matrice da testare durante almeno una parte dello stadio vitale impiegato nel saggio biologico
4	Quando la specie-test in natura contrae rapporti con la matrice da testare durante l'intera durata della fase del ciclo vitale impiegato nel saggio biologico
4	Quando la specie test, endemica del Mediterraneo, è effettivamente presente nello specifico tratto di costa o area oggetto di studio

Rappresentatività della Matrice rispetto all'applicazione (RM_{appl})				
Matrice	Monitoraggio (obiettivo a, c, d₂)	Monitoraggio effluenti/scarichi liquidi (obiettivo b)	Monitoraggio fondali (obiettivo d, d₁, d₃)	Dragaggi (obiettivo e)
Effluente	-	6	-	-
Acqua della colonna	6	5	2	2
Acqua interstiziale	5	4	5	4
Elutriato	4	3	4	6
Estratti	1	1	1	1
Sedimento tal quale	3	2	6	5
Sedimento privo di acqua interstiziale	2	1	3	3

Le matrici sopra indicate in alcuni casi si potrebbero prestare ad ambiguità di interpretazione: ad esempio, esistono diverse modalità per ottenere campioni di acqua interstiziale, elutriati, estratti. La definizione operativa delle matrici richiamate per questo parametro esula però dalle finalità delle pre-

senti Linee Guida, e si rimanda pertanto ad una manualistica successiva. In questo contesto, le matrici sinteticamente richiamate sono ritenute sufficientemente rappresentative della tipologia di campioni che potrebbero essere sottoposte a saggio per gli obiettivi indicati (dragaggio, monitoraggio della colonna d'acqua, di effluenti/scarichi, dei fondali).

FP	Rilevanza e Sensibilità dell'effetto RES
5	Comportamento
4	Mutagenicità e genotossicità
3	Sviluppo (schiusa uova, fecondazione, metamorfosi, fissazione larve, ecc.)
2	Crescita (taglia, peso, divisione cellulare, ecc.)
1,5	Bioluminescenza
1	Mortalità - immobilità

I fattori per mortalità - immobilità e bioluminescenza vengono raddoppiati se l'endpoint viene misurato dopo una esposizione protratta nel tempo.

Nell'impossibilità di stabilire una definizione comune che contenga tutte le possibili terminologie in uso (saggi acuti, acuti prolungati, cronici, subcronici, letali, subletali, ecc.), si specifica che per esposizione protratta nel tempo si intende una esposizione che, con l'eccezione dei batteri, considerata sempre non prolungata, risponda ad almeno due dei seguenti requisiti:

1. che abbia durata superiore o uguale al 10 % del ciclo vitale delle specie utilizzata;
2. che copra più di uno stadio vitale;
3. che copra almeno un ciclo riproduttivo;
4. che richieda l'alimentazione degli organismi.

Dopo aver calcolato, per ciascun endpoint, le ponderazioni precedenti, si calcola una ulteriore ponderazione per la batteria prefigurata, per tener conto del numero dei saggi e del tipo di endpoint. Questo fattore di ponderazione è moltiplicativo per l'intera batteria e prende il nome di **Rilevanza della Batteria (RB)**.

La rilevanza della batteria viene ponderata sulla base di un parametro **RB_s** (relativo alle specie), al quale si aggiunge un parametro **RB_t** (relativo ai livelli funzionali).

RB_s - La batteria deve comprendere almeno tre specie differenti. Sono preferiti i saggi che rilevano effetti diversi (non solo mortalità). Viene aggiunto 0,25 punti per ogni specie aggiuntiva, oltre alle 3 minime previste.

FP	Rilevanza della Batteria rispetto alle specie (RBs)
1	3 specie, solo mortalità - immobilità
1,25	3 specie di cui almeno 1 con effetti diversi dalla mortalità - immobilità
1,25+	Più di 3 specie, solo mortalità - immobilità (aggiungere 0,25 punti per ogni specie aggiuntiva oltre la 4a)
1,50+	Più di 3 specie, almeno 1 specie con effetti diversi dalla mortalità - immobilità (aggiungere 0,25 punti per ogni specie aggiuntiva oltre la 4a)

RB_t - Gli stadi vitali degli organismi utilizzati nella batteria devono comprendere almeno tre dei livelli ecologici funzionali precedentemente definiti.

FP	Rilevanza della batteria rispetto al livello funzionale (RBt)
1	almeno 2 livelli funzionali
3	almeno 3 livelli funzionali
4	tutti e 4 i livelli funzionali
+0,25	Aggiungere 0,25 punti per ogni specie addizionale oltre le 3 minime richieste *

* Gli organismi animali onnivori (es. filtratori) vengono automaticamente considerati consumatori.

Se vi sono più di 3 specie, aggiungere 0,25 punti per ogni specie addizionale (ad esempio, se vi sono 4 specie, ma solo produttori/decompositori e consumatori, si avrà $1 + 0,25 = 1,25$; se vi sono 4 specie, ma con produttori, decompositori e consumatori, sarà $3 + 0,25 = 3,25$. Ma se 4 specie coprono tutti i 4 livelli funzionali, si avrà un “premio” perché il punteggio sale automaticamente a 4. Se le specie sono 5, e coprono 4 livelli funzionali, sarà però $4 + 0,25 = 4,25$).

La rilevanza della batteria **RB** è data dalla somma di **RB_s** e **RB_t**.

La Valenza Ecologica Totale **VET_{batt}** della batteria di saggi biologici, pertanto diventa:

$$VET_{batt} = (RB_s + RB_t) \sum (S_{ep} + RS_{eco} + DG + RSV_M + RM_{appl} + RES)_{endpoint}$$

La rilevanza complessiva della batteria di saggi biologici viene espressa in termini percentuali rispetto alla massima valenza teoricamente possibile in funzione del numero di endpoint e di specie costituenti.

Ad esempio, la batteria minima ammissibile (3 specie e 3 endpoint), può collezionare in via teorica, per ciascun endpoint:

- $S_{ep} = 3$ (endpoint standardizzato e/o normato (Livello III UNICHIM));
- $RS_{eco} = 4$ (la specie trascorre l'intero ciclo vitale nell'ecosistema di studio);
- $DG = 4$ (la specie è endemica del Mediterraneo ed è presente nello specifico tratto di costa o area oggetto di studio);
- $RSV_M = 4$ (la specie-test in natura contrae rapporti con la matrice da testare durante l'intera durata della fase del ciclo vitale impiegato nel saggio biologico);
- $RM_{appl} = 6$ (massima rappresentatività della matrice rispetto all'applicazione);
- $RES = 5$ (endpoint più rilevante misurato dopo esposizione di lunga durata);
- $RB_s = 1,25$ (delle 3 specie, almeno 1 effetto diverso da mortalità - immobilità);
- $RB_t = 3$ (le 3 specie coprono 3 diversi livelli funzionali).

$$VET_{batt} = (1,25+3) \times 3 (3+4+4+4+6+5) = 331,5$$

Per 4 endpoint (specie), ciascuno con fattori massimi, $RB_s = 1,50$, $RB_t = 4$ (le specie coprono tutti e 4 i livelli funzionali), $VET_{batt} = 572$.

Per 5 endpoint (specie), ciascuno con fattori massimi, $RB_s = 1,75$, $RB_t = 4,25$, $VET_{batt} = 780$.

Per 6 endpoint (specie), ciascuno con fattori massimi, $RB_s = 2,00$, $RB_t = 4,5$, $VET_{batt} = 1014$.

Per 7 endpoint (specie), ciascuno con fattori massimi, $RB_s = 2,25$, $RB_t = 4,75$, $VET_{batt} = 1274$, e così via.

La rilevanza ecologica della specifica batteria di endpoint (REC_{batt}), espressa rispetto alla massima valenza teoricamente possibile diventa: $REC_{batt} = (VET/VET_{max}) * 100$.

Il limite di questo approccio è che naturalmente, più vengono aumentati gli organismi/endpoint e più, paradossalmente, diviene difficile avvicinarsi in pratica al VET_{max} .

Per stabilire se la batteria ipotizzata raggiunge almeno i requisiti minimi di “scientificità” è necessario quindi calcolare anche una VET_{min} , secondo il seguente approccio.

Per principio, se tutti i parametri da ponderare sono rilevanti, per ciascuno bisogna trovare un requisito “minimo significativo”. Quindi, considerando che si tratta di una ponderazione “predittiva”, almeno un endpoint deve avere i seguenti fattori “minimi significativi”:

- $S_{ep} = 3$ (endpoint di III livello);
- $RS_{eco} = 4$ (la specie-test trascorre l'intero ciclo vitale nell'ecosistema di studio);
- $DG = 2$ (la specie-test presenta un areale di distribuzione cosmopolita);
- $RSV_M = 3$ (la specie-test in natura contrae rapporti con la matrice da testare durante almeno una parte dello stadio vitale impiegato nel saggio biologico);
- $RM_{appl} = 6$ (in funzione dello scopo, almeno un endpoint nella matrice più rappresentativa);
- $RES = 1,5$ (almeno un endpoint diverso da mortalità - immobilità).

Per il secondo endpoint, il punteggio minimo per ogni parametro di ponderazione dovrebbe essere almeno:

- $S_{ep} = 2$ (endpoint di II livello);
- $RS_{eco} = 2$ (la specie-test trascorre almeno parte dello stadio di adulto nell'ecosistema di studio);
- $DG = 2$ (la specie-test presenta un areale di distribuzione cosmopolita);
- $RSV_M = 3$ (la specie-test in natura contrae rapporti con la matrice da testare durante almeno una parte dello stadio vitale impiegato nel saggio biologico);
- $RM_{appl} = 3$;
- $RES = 1$.

Per il terzo, è ragionevole ammettere, in via transitoria, un punteggio minimo meno rigoroso:

- $S_{ep} = 2$ (endpoint di II livello);
- $RS_{eco} = 2$ (la specie-test trascorre almeno parte dello stadio di adulto nell'ecosistema di studio);
- $DG = 1$ (la specie-test presenta un areale di distribuzione extra-mediterranea);
- $RSV_M = 2$ (la specie-test in natura contrae un rapporto con la matrice da testare in una fase del ciclo vitale diversa da quella impiegata nel saggio biologico);
- $RM_{appl} = 1$;
- $RES = 1$.

Non sono richiesti requisiti minimi per tutti gli endpoint successivi.

Si noti che per S_{ep} è previsto almeno un endpoint di II livello. Nel caso si intendesse valutare la possibilità di utilizzare un metodo di livello inferiore, si consiglia di effettuare il calcolo usando comunque un fattore 2: in tal modo, dovrebbe risultare evidente se quell'endpoint contribuisce significativamente alla VET_{min} e, in tal caso, costituirebbe un buon incentivo per iniziare la procedura di standardizzazione con un interconfronto.

Sulla base dei requisiti così identificati, una batteria di 3 endpoint avrebbe i seguenti questi fattori:

Endpoint	Sep	RSeco	DG	RSVM	RMappl	RES	Totale
1	3	4	2	3	6	1,5	19,5
2	2	2	2	3	3	1	13
3	2	2	1	2	1	1	9

Inoltre, almeno un endpoint deve essere diverso dalla mortalità/immobilità (subletale) ($RB_s = 1,25$) e le specie devono coprire almeno 3 diversi livelli funzionali ($RB_t = 3$). Quindi, si ottiene una $VET_{min} = 176,375$.

Poiché VET_{max} per 3 endpoint è 331,5 la $REC_{min} = (VET_{min}/VET_{max}) * 100 = 53,21 \%$.

Per 4 endpoint si ottiene, invece:

Endpoint	Sep	RSeco	DG	RMappl	RSVM	RES	Totale
1	3	4	2	3	6	1,5	19,5
2	2	2	2	3	3	1	13
3	2	2	1	2	1	1	9
4	1	1	1	1	1	1	6

Con:

- RBs = 1,5
- RBt = 3,25 (almeno 3 livelli funzionali)
- VET_{min} = 225,625
- VET_{max} per 4 endpoint è 572
- REC_{min} = (VET_{min}/VET_{max})*100 = 39,44 %

Per 5 endpoint si ottiene:

Endpoint	Sep	RSeco	DG	RMappl	RSVM	RES	Totale
1	3	4	2	3	6	1,5	19,5
2	2	2	2	3	3	1	13
3	2	2	1	2	1	1	9
4	1	1	1	1	1	1	6
5	1	1	1	1	1	1	6

Con:

- RBs = 1,75
- RBt = 3,5 (almeno 3 livelli funzionali)
- VET_{min} = 280,875
- VET_{max} per 5 endpoint è 780
- REC_{min} = (VET_{min}/VET_{max})*100 = 36,01 %

Per 6 endpoint si ottiene:

Endpoint	Sep	RSeco	DG	RMappl	RSVM	RES	Totale
1	3	4	2	3	6	1,5	19,5
2	2	2	2	3	3	1	13
3	2	2	1	2	1	1	9
4	1	1	1	1	1	1	6
5	1	1	1	1	1	1	6
6	1	1	1	1	1	1	6

Con:

- RBs = 2,00
- RBt = 3,75 (3 livelli funzionali)
- VET_{min} = 342,125
- VET_{max} per 6 endpoint è 1014
- REC_{min} = (VET_{min}/VET_{max})*100 = 33,74 %

e così via.

Da tale valutazione emerge il concetto che, minore è il numero di endpoint/organismi e livelli funzionali coperti, maggiore è la REC_{min} richiesta e quindi maggiori i “requisiti” che i singoli saggi devono possedere. Viceversa, l’aumento di endpoint e di livelli funzionali consente di essere meno rigorosi, nel complesso, nei requisiti dei singoli saggi biologici.

Nella successiva tabella 2.1 viene descritto un caso applicativo di calcolo ad una batteria di saggi biologici costituita da 5 organismi da applicare nel caso di un dragaggio di una barra di foce fluviale nel Tirreno.

Tab. 2.1. Caso applicativo di calcolo ad una batteria di saggi biologici costituita da 5 organismi da applicare nel caso di un dragaggio di una barra di foce fluviale nel Tirreno.

Specie	Matrice utilizzata	Endpoint	Se p	RS _{eco}	DG	RSV M	RM _{appl}	RE S	Tot.
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	elutriato	Inibizione Crescita a 96h	2	4	2	1	6	2	17
<i>Vibrio fischeri</i>	Acqua interstiziale	Inibizione Bioluminescenza	3	4	2	4	4	1,5	18,5
<i>Corophium orientale</i>	Sedimento intero	Mortalità a 10 gg	3	4	4	4	5	1	21
<i>Paracentrotus lividus</i>	elutriato	Spermio tossicità a 1h	2	1	4	1	6	3	17
<i>Tigriopus fulvus</i>	Acqua interstiziale	Mortalità naupli a 96h	2	1	4	1	4	1	13
RBs = 1,75, RBt = 4,25									
VET									519

Con VET_{max} = 780 e REc = (519/780 x 100) = 66,54 %. Quindi, se RBt = 4,25, questa batteria avrebbe una REc superiore alla REC_{min} per 5 endpoint (= 36,01 %).

2.3 - Valenza pratica della batteria di saggi biologici

Alla ponderazione “scientifica” di cui sopra ne va affiancata un’altra, di tipo pratico, per la valutazione di una *batteria di routine*, che prende in considerazione altri parametri. In particolare, tra i pre-requisiti si aggiunge la disponibilità degli organismi durante tutto l’anno; inoltre, considerando le difficoltà di reperimento, viene introdotto un fattore per la scelta tra fornitori - allevamenti e raccolta in ambienti naturali.

Innanzitutto, anche in questo caso, nel limite del possibile, la scala di ponderazione dovrebbe essere abbastanza uniforme per i diversi parametri (cioè con gli stessi valori di ponderazione minimi e massimi), per evitare che automaticamente un parametro prevalga sugli altri. Costituisce un'eccezione un parametro obiettivamente più rilevante di altri, nel qual caso i relativi pesi possono avere valori superiori.

1. **Reperibilità organismi (RO).** La disponibilità saltuaria degli organismi non necessariamente impedisce l'adozione dei relativi saggi ecotossicologici in una batteria, ma limita la loro utilità ai casi nei quali non è previsto o necessario un monitoraggio che potrebbe essere condotto durante tutto l'anno, in diversi periodi stagionali, ecc. Ad esempio, la pianificazione dell'attività di un laboratorio richiede di ripartire nell'arco dell'intero anno i saggi da effettuare su ambienti diversi: se gli organismi sono sempre disponibili, è possibile monitorare molti più ambienti diversi, in diversi mesi dell'anno, mentre se la disponibilità è limitata, il carico di lavoro pesa unicamente sul periodo di disponibilità. Inoltre, nel secondo caso, diventa impossibile garantire gli interventi "a richiesta", in qualunque momento sia necessario verificare gli effetti di un incidente (sversamenti accidentali o altro). Nel caso di raccolta in ambienti naturali, il prelievo deve essere ecologicamente sostenibile e non comportare un rischio per la popolazione di origine. Nel caso di allevamento, sia autoctono che da parte di fornitori specializzati, è richiesto un controllo di qualità che garantisca la disponibilità di organismi di determinazione tassonomica certa ed in ottima salute.
2. **Standardizzazione protocollo metodologico (SP).** I protocolli metodologici devono essere condivisi ed utilizzabili da più utenti ed i risultati devono essere confrontabili. Ovviamente, devono essere preferite le norme nazionali vincolanti, se esistono (i disposti legislativi superano le standardizzazioni internazionali)
3. **Effetto sulla scala di rischio (ER).** I vari endpoint riflettono una maggiore o minore sensibilità e tendono a dare risposte specifiche, con una diversa interpretazione in funzione della classificazione di rischio. Se un saggio prevede endpoint multipli, per quel saggio il fattore di ponderazione è la somma dei singoli endpoint misurabili ("premio" per le maggiori informazioni ottenibili con un minimo aggravio di lavoro e/o costi).
4. **Preparazione della matrice (PM).** Le diverse matrici da sottoporre al saggio richiedono manipolazioni più o meno difficoltose.
5. **Fattibilità della batteria (FB).** L'esecuzione dei saggi con la batteria identificata può essere più o meno agevole, richiedere strumentazione o esperienze professionali particolari (solitamente, abbinate ad una strumentazione dedicata, necessaria per l'esecuzione di saggi di tossicità, quale può essere uno stereomicroscopio, un luminometro o un contaglobuli elettronico). La valutazione è abbastanza soggettiva. Si noti che la scala è invertita, rispetto alle altre ponderazioni, privilegiando i saggi che non richiedono una strumentazione e/o esperienza particolare.
6. **Impegno operativo della batteria (IB).** Anche in questo caso, non è certamente facile la ponderazione di fattori economici; comunque, assumendo un costo unitario per il tempo degli operatori, il principale fattore è rappresentato dall'impegno delle risorse umane richieste per l'allestimento ed esecuzione del saggio..

Questi 6 parametri, combinati, con l'algoritmo in seguito descritto, consentono una "ponderazione esperta", assegnando cioè a ciascuno di essi un fattore numerico secondo quanto di seguito precisato.

FP	Reperibilità degli organismi (RO)
1	Gli organismi per i saggi devono essere raccolti in ambienti naturali e non sono disponibili tutto l'anno (per difficoltà obiettive, ad es. meteorologiche o stagionali, della raccolta)
2	Gli organismi per i saggi possono essere allevati, ma non sono disponibili tutto l'anno (es., maturità sessuale solo in alcuni periodi)
3	La specie è reperibile presso fornitori qualificati, ma gli organismi non sono disponibili tutto l'anno

4	Gli organismi per i saggi devono essere raccolti in ambienti naturali e sono disponibili tutto l'anno
5	La specie è allevabile, gli organismi per i saggi provengono da allevamenti autarchici e sono disponibili tutto l'anno
5	La specie è reperibile presso fornitori qualificati e gli organismi sono disponibili tutto l'anno

FP	Standardizzazione (SP)
1	Il protocollo metodologico è sperimentale (“personalizzato”)
2	Il protocollo metodologico è validato da prove interlaboratorio (≥ 8 laboratori) o normato da un ente nazionale (es. AFNOR, DIN, EPA, ASTM, ecc.)
3	Il protocollo metodologico è standardizzato da un ente sovranazionale (ISO, CEN, OECD, ecc.)
4	Il protocollo metodologico è prescritto da un disposto legislativo in Italia

FP	Effetto dell'endpoint sulla scala di Rischio (ER)
1	Comportamento
2	Mutagenicità e genotossicità
3	Sviluppo (schiusa uova, fecondazione, metamorfosi, fissazione larve, ecc.)
4	Crescita (taglia, peso, divisione cellulare, ecc.)
4,5	Bioluminescenza
5	Mortalità - immobilità

FP	Fattibilità della Batteria (FB)
4	Normale strumentazione di laboratorio (compresi termostati, centrifughe, spettrometro molecolare, agitatori, stufe, ecc.)
3	Strumentazione dedicata con rilevazione automatica dell'endpoint (lettura strumentale)
2	Strumentazione dedicata e rilevazione manuale dell'endpoint (es. riconoscimento al microscopio di aberrazioni)
1	Strumentazione ed esperienza professionale specialistica (es. genomica)

FP	Preparazione della Matrice (PM)
1	Estratto
2	Elutriato
3	Acqua interstiziale o sedimento disidratato
4	Sedimento tal quale
5	Acqua della colonna o effluente

La valenza totale VT_{batt} della batteria di saggi biologici, pertanto diventa:

$$VT_{batt} = \sum (RO + SP + ER + PM + FB + IB)_{endpoint}$$

La Valenza Totale (VT_{max}) teorica sarebbe quindi:

- VT_{max} 3 endpoint = 3 [(5+4 + 5 + 5 + 4 + 5)] = 84;
- VT_{max} 4 endpoint = 4 [(5+4 + 5 + 5 + 4 + 5)] = 112;
- VT_{max} 5 endpoint = 5 [(5+4 + 5 + 5 + 4 + 5)] = 140;
- VT_{max} 6 endpoint = 6 [(5+4 + 5 + 5 + 4 + 5)] = 168;
- VT_{max} 7 endpoint = 7 [(5+4 + 5 + 5 + 4 + 5)] = 196;

e così via.

La rilevanza pratica percentuale (RP_{batt}) di una specifica batteria di saggi si calcola dal rapporto:
 $RP_{batt} = (VT/VT_{max}) \times 100$.

Riprendendo l'esempio della ponderazione "scientifica" (Tab. 2.1), la valenza pratica con la medesima batteria condurrebbe ai fattori di cui alla tabella 2.2.

Tab. 2.2. Caso applicativo di calcolo ad una batteria di saggi biologici costituita da 5 organismi da applicare nel caso di un dragaggio di una barra di foce fluviale nel Tirreno.

Specie	Matrice utilizzata	Endpoint	RO	SP	ER	FB	PM	IB	Tot.
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	elutriato	Inibizione Crescita a 96h	5	3	4	4	2	3	21
<i>Vibrio fischeri</i>	acqua interstiziale	Inibizione Bioluminescenza	5	3	4,5	3	3	5	23,5
<i>Corophium orientale</i>	Sedimento intero	Mortalità a 10 gg	4	3	5	4	4	3	23
<i>Paracentrotus lividus</i>	elutriato	Spermiossicità a 1h	1	2	3	4	2	5	17
<i>Tigriopus fulvus</i>	acqua interstiziale	Mortalità naupli a 96h	5	2	5	4	3	3	22

Conseguentemente il calcolo sarebbe: $VT_{batt} = 106,5$; $VT_{max} = 140$ e $RP_{batt} = (VT/VT_{max}) \times 100 = (106,5/140) \times 100 = 76,07\%$.

2.4 - Conclusioni

Sulla base dei criteri di valutazione identificati si ritiene sia possibile giungere ad una valutazione obiettiva della validità scientifica e pratica di una batteria di saggi di ecotossicità, reale o ipotetica, mediante l'opportuna ponderazione di numerosi parametri che caratterizzano i possibili saggi biologici.

Per una corretta applicazione è necessario effettuare separatamente due tipi di calcoli: il primo consente di calcolare una "rilevanza scientifica", il secondo una rilevanza pratica".

La ponderazione "scientifica" viene proposta come utile strumento per valutare l'attendibilità di una batteria di saggi ecotossicologici da applicare per ricerche e approfondimenti sito – specifici; la ponderazione alternativa "pratica" privilegia un approccio per un uso di routine. Il confronto sistematico di entrambe le ponderazioni indica, quindi, quanto la rilevanza scientifica penalizza la praticità o, in alternativa, quanto la praticità fa perdere in rilevanza.

Combinandole assieme, ad esempio facendo la media tra rilevanza scientifica e rilevanza pratica, si ha infine una valutazione "scientifico – pratica".

Ovviamente, la doppia ponderazione (con il relativo confronto) può essere anche utilizzata per ipotizzare diverse batterie alternative, per cercare la combinazione che massimizza sia la rilevanza che la praticità, nell'ottica di cercare un compromesso che aumenti la rilevanza scientifica, senza penalizzare eccessivamente la rilevanza pratica.

Va sottolineato che questo approccio di doppia ponderazione + compromesso (media tra REc e RP_{batt}) fornisce molti elementi di giudizio, ma non pretende di introdurre un automatismo che sostituisca l'interpretazione "esperta".

Pertanto, si propone a tutti i lettori/fruitori delle presenti Linee Guida di verificare i parametri identificati e, soprattutto, i relativi fattori di ponderazione, applicando sistematicamente gli algoritmi proposti alle proprie esperienze personali, allo scopo di identificare eventuali modifiche migliorative che verranno incluse nei futuri aggiornamenti di questo documento.

CAPITOLO 3: IDENTIFICAZIONE DEGLI ORGANISMI E DEGLI ENDPOINT

3.1 - Introduzione

Sulla base dei criteri identificati ed illustrati nel Capitolo 1, è stata esaminata criticamente la bibliografia esistente e le esperienze originali di ricerca dei componenti dei singoli Gruppi, per arrivare ad identificare e proporre, nell'ambito dei diversi gruppi di organismi, i saggi ecotossicologici che rispecchiano i requisiti per una loro potenziale inclusione in batterie per sedimenti di acque di transizione e marine costiere.

A tale scopo, per ciascun saggio viene identificato il tipo di prova (secondo la classificazione di tabella 1.1), il modello biologico, la matrice utilizzata, l'endpoint, la durata dell'esposizione, l'obiettivo per il quale può essere proposto ed il riferimento bibliografico per il protocollo metodologico.

Quale ulteriore elemento di giudizio, per ciascuno dei saggi proposti vengono, inoltre, attribuiti i fattori di ponderazione necessari per valutare obiettivamente la valenza scientifica e pratica delle batterie che teoricamente possono essere costituite combinando opportunamente i saggi di organismi appartenenti a diversi livelli trofici. I criteri ed i fattori numerici di ponderazione sono stati dettagliatamente discussi nel Capitolo 2 di questo documento.

Per ciascuno dei saggi viene pertanto attribuito un punteggio per i fattori che non dipendono da matrice e/o applicazione:

- Standardizzazione dell'endpoint (S_{ep});
- Rappresentatività della specie (RS_{eco});
- Valenza della distribuzione geografica della specie (DG) (limitatamente alle opzioni: extra-mediterraneo, cosmopolita, endemico);
- Rilevanza e sensibilità dell'effetto (RES);
- Reperibilità organismi (RO);
- Standardizzazione protocollo metodologico (SP);
- Effetto sulla scala di rischio (ER);
- Fattibilità (FS);
- Economicità (IS).

Ovviamente, FS e IS indicheranno in questo caso la fattibilità e l'economicità dello specifico saggio biologico, anziché della batteria.

La valutazione della valenza scientifica e pratica delle batterie che teoricamente possono essere costituite combinando i diversi saggi viene proposta e commentata nel Capitolo 4.

3.2 - Batteri

Dalle review di van Beelen (2003) e Parvez *et al.* (2006) emerge chiaramente che il saggio con *Vibrio fischeri* è il candidato più probabile, essendo adatto per i vari comparti, standardizzato e già largamente utilizzato. Per il suo uso, è raccomandato come diluente acqua di mare sintetica al 35% secondo la "ricetta" EN ISO 10253 – 06 (Onorati e Mecozzi, 2004).

Esistono anche saggi che prevedono il contatto diretto con il sedimento od una sua sospensione: oltre al Microtox[®] in fase solida, si può citare il Toxi ChromoPad (Kwan, 1995) ed il MetPAD (Bitton *et al.*, 1992), basati sull'inibizione della β -galattosidasi in un ceppo mutante di *Escherichia coli*; il Sediment Contact Test (BCA) con *Bacillus cereus* (Rönnpagel *et al.*, 1995), che è uno Standard Tedesco (DIN 38412, part 48); un nuovo saggio per contatto (Heise e Ahlf, 2005) che prevede l'uso di *Vibrio proteolyticus*, invece di *V. fischeri*.

Ringwood *et al.* (1997) riportano che, specialmente con sedimenti argillosi, i batteri tendono ad essere “persi” per adesione alle particelle. Tuttavia, alcune varianti metodologiche per il test solid-phase (Onorati *et al.*, 1998; Volpi Ghirardini *et al.*, 1998; 2009), seppur con approcci diversi e magari adatti ad ambienti diversi, compensano tale perdita di batteri e permettono di aumentare l’affidabilità del test tenendo conto di altri confounding factors, come la variazione di pH nella diluizione del campione di sedimento.

Esistono anche studi che prevedono l’uso di sensori sui quali vengono immobilizzati dei batteri: il Cellsense, ad esempio, misura l’attività respiratoria di *Escherichia coli* ed è stato utilizzato come biosensori di tossicità di effluenti (Farré *et al.*, 2001); in un altro biosensore amperometrico è immobilizzata *Pseudomonas putrida* (Farré e Barceló, 2001). Al momento, l’inserimento di questo tipo di biosensori nelle batterie di saggi ecotossicologici non sembra però proponibile.

Il saggio con *Vibrio fischeri* (ISO, 2006) è indicato per condurre saggi di tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici), di tipo C (con elutriati o estratti da sedimento intero, organismi non bentonici, senza fase solida), di tipo F (con acqua sovranatante o interstiziale + fase solida, organismi non bentonici), o di tipo H (con acqua sovranatante o interstiziale, organismi non bentonici, senza fase solida).

I saggi prevedono come endpoint la diminuzione della bioluminescenza.

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica possono essere espresse come da tabb. 3.1 e 3.2, rispettivamente.

Tab. 3.1. Valenza scientifica del saggio con *Vibrio fischeri*.

	Sep	RSeco	DG	RES	Totale
<i>Vibrio fischeri</i>	3	4	2	1,5	10,5

Tab. 3.2. Valenza pratica del saggio con *Vibrio fischeri*.

	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Vibrio fischeri</i>	5	4	4,5	3	5	21,5

3.3 - Alghe

Di particolare interesse per la sua semplicità e chiarezza la definizione di saggio algale secondo Trainor (1984):

“...La maggior parte dei saggi algali sono teoricamente molto simili. Dopo l’eliminazione degli organismi indigeni attraverso un sistema di rimozione meccanica, di regola per mezzo della filtrazione in ambiente sterile, introdurre la specie algale prescelta per il saggio nel campione d’acqua, il quale viene utilizzato come terreno di coltura. Incubare quest’ultimo in ambiente controllato per alcuni giorni. La crescita algale, o l’assenza di essa, è indice di presenza di nutrienti o di sostanze tossiche ... “.

L’utilizzo di organismi vegetali per la valutazione dell’effetto tossico o biostimolante è noto da tempo. Eklund e Kautsky (2003) hanno proposto saggi con macroalghe, considerando come endpoint la riproduzione (nell’alga rossa tropicale e sub-tropicale *Champia parvula* o temperata *C. tenuicorne*, e tra le alghe brune *Laminaria* spp. e *Fucus* spp.), oppure l’inibizione nella crescita (in alghe verdi, brune e rosse). Il saggio con *Champia parvula* è previsto da USEPA (2002a) tra i test di tossicità cronica per effluenti e recettori marini e di estuario. Alla Texas A & M University è stato messo a punto un test di germinazione e crescita dei germogli che utilizza zoospore quadriflagellate di *Ulva fasciata*

e *U. lactuca* (Carr *et al.*, 2001b; Nipper *et al.*, 2002). Herbst e Nendza (2000) hanno proposto il test di crescita EN ISO 10253-2006 modificato per l'utilizzo con acqua interstiziale o elutriati con aggiustamento della salinità. Purtroppo, ciò può portare ad artefatti: Neill (2005), infatti, ricorda che, negli estuari, oltre ai nutrienti possono agire da agenti limitanti per i vegetali anche altri fattori, quali salinità e ombreggiamento (solidi sospesi, nel caso delle alghe). La review di Lytle e Lytle (2001) sottolinea come l'utilizzo di specie vegetali (microalghe, macroalghe e macrofite) nei test di fitotossicità sia generalmente sottovalutato e richieda una maggior attenzione, in particolare per gli ambienti di estuario e per studi sulla bioconcentrazione.

Un'esperienza rivolta a caratterizzare sotto il profilo tossicologico i sedimenti di un porto industriale mediante la prova di tossicità algale ha dimostrato che la produzione di elutriato determina il passaggio dal sedimento alla frazione acquosa di elevate concentrazioni di nutrienti che possono "mascherare" l'eventuale effetto tossico (Di Capua *et al.*, 2001). La prova di crescita algale condotta con *D. tertiolecta*, confrontata con la prova di tossicità con batteri luminescenti e con la prova con *Artemia salina*, si è dimostrata largamente più sensibile nella determinazione della tossicità delle acque di scarico industriali (Baldi *et al.*, 1993; Sbrilli *et al.*, 1995). La prova di crescita algale per la valutazione dello stato trofico, così come descritta in ARPAT (1998), esprime un notevole potenziale informativo sullo stato di qualità dei corpi idrici; la prova consente, infatti, di valutare contemporaneamente l'eventuale effetto tossico, il fattore limitante primario e secondario, la frazione biodisponibile dei principali nutrienti. Sulla base della crescita nell'aliquota di campione senza alcuna aggiunta di nutrienti la prova consente, inoltre, di classificare le acque marine costiere in base alle potenzialità trofiche con una sensibilità che si è dimostrata superiore all'indice trofico TRIX (Sbrilli *et al.*, 1999; 2000).

Eklund (2005) descrive un test, promettente ma non standardizzato, di inibizione della crescita con la macroalga rossa *Ceramium tenuicorne*, cosmopolita e coltivabile a partire da un clone ed utilizzabile per acque marine e salmastre (salinità compresa tra il 4‰ ed il 32‰).

Tra le altre ricerche in corso, si possono ricordare quelle di Stauber *et al.* (2002), sulla messa a punto di metodi citometrici per rilevare differenti endpoint con microalghe e per effettuare test con sedimento intero, oltre che con acqua interstiziale e/o sovrantante. Adams e Stauber (2004) descrivono questa applicazione utilizzando la diatomea marina bentonica *Entomoneis cf punctulata* (il genere è accettato dal Registro Europeo delle Specie Marine⁴). Franklin *et al.* (2004) propongono poi un metodo che permette l'esposizione contemporanea di più alghe marine o di acqua dolce.

Indipendentemente dalle applicazioni specifiche, la citometria a flusso è potenzialmente molto interessante, ma richiede una strumentazione che almeno per ora non è disponibile nella maggior parte dei laboratori.

Nelle presenti Linee Guida l'attenzione è rivolta alla valutazione della prova di inibizione della crescita algale mediante l'uso di alghe monocellulari. In particolare gli organismi marini presi in esame sono: *Phaeodactylum tricornutum* e *Dunaliella tertiolecta*.

I primi metodi internazionali di riferimento per le acque marine risalgono agli anni Settanta: USEPA (1974) e IRSA-CNR (1978). Alla seconda metà degli anni Ottanta risalgono le pubblicazioni USEPA relative all'applicazione del saggio algale per il controllo delle acque di scarico (1988).

ARPAT (1998) ha pubblicato una sintesi critica delle metodologie rivolte all'utilizzo di microalghe di acqua dolce e marina (*Dunaliella tertiolecta*) per il controllo delle acque di scarico e per la valutazione dello stato trofico e tossicologico dei corpi idrici ricettori.

Una metodica per l'esecuzione del saggio algale con organismi marini è stata recentemente aggiornata nella norma UNI EN ISO 10253 (2006).

L'uso di *P. tricornutum* è stato sperimentato in un esercizio di interconfronto mediante l'utilizzo del metodo ISO (2006). L'uso di *D. tertiolecta* è stato sperimentato mediante l'utilizzo della precedente metodica modificata attraverso l'introduzione del terreno di coltura per *D. tertiolecta* (ARPAT, 1998).

⁴<http://www.marbef.org/data/erms.php>

Entrambe le alghe possono essere quindi impiegate utilizzando il protocollo UNI EN ISO 10253 (modificato, per *D. tertiolecta*) per saggi di tipo C (con elutriati o estratti da sedimento intero, organismi non bentonici, senza fase solida) o di tipo H (con acqua sovranatante o interstiziale, organismi non bentonici, senza fase solida). I saggi prevedono come endpoint il tasso di crescita a 72 h.

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica può essere espressa come da tabb. 3.3 e 3.4, rispettivamente.

Tab. 3.3. Valenza scientifica del saggio con *Dunaliella tertiolecta* e *Phaeodactylum tricornutum*.

	Sep	RSeco	DG	RES	Totale
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	3	4	2	2	11
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	2	4	2	2	10

Tab. 3.4. Valenza pratica del saggio con *Dunaliella tertiolecta* e *Phaeodactylum tricornutum*.

	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	5	4	4	2	3	18
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	5	1	4	2	3	15

In sostanza, le due alghe sono equivalenti per la valenza scientifica, con una leggera preferenza di *P. tricornutum* per la valenza pratica, in quanto il protocollo per *D. tertiolecta* non è normato in Italia (SP = 1).

3.4 - Rotiferi

I rotiferi della specie *Brachionus plicatilis* (O. F. Muller, 1786 - *Brachionidae* classe *Rotatoria*) sono organismi ad ampia distribuzione geografica e sempre ben rappresentati da specie autoctone, esistendo almeno 9 varietà.

Questa specie è di facile allevamento, utilizzata soprattutto per l'alimentazione dei primi stadi larvali di pesce in impianti di acquacoltura (Cataudella e Canada, 2000). In particolare un ceppo riprodotto e stabulato in vari laboratori di ricerca europei, ha origine dalle saline del Mare di Azov. I primi stadi embrionali possono infatti bloccare il loro sviluppo e rinchiudersi in un involucro protettivo; le cisti possono rimanere dormienti per alcuni anni prima di schiudere.

Dal punto di vista morfologico gli individui hanno generalmente una dimensione inferiore a 1 mm (tra i 70 ed i 700 µm), anche se si possono distinguere due sottogruppi, definiti tipo 'S-' (small) e 'L-' (large) (Snell e Carrillo, 1984).

Il ciclo vitale è breve: in condizioni ottimali la crescita da uovo ad adulto avviene in 2-5 giorni. In riproduzione sviluppa sacche ovigere ben visibili, che consentono di valutare il tasso di rinnovamento della popolazione, condizionato dalla temperatura dell'acqua (inquinamento fisico), dalla abbondanza di cibo (effetto indiretto di degrado dell'habitat), oltre che dalla contaminazione diretta di composti tossici. La riproduzione avviene principalmente per via partenogenetica, favorendo l'osservazione degli effetti anche in caso di popolazioni ridotte.

Considerando che uno dei capisaldi in ambito tossicologico è quello di utilizzare specie chiave nei rapporti trofici della rete alimentare, ritroviamo in *B. plicatilis* queste caratteristiche. Esso si af-

fianca allo zooplancton di dimensioni maggiori in qualità di consumatore primario di fitoplancton ed è alimento base per numerosi consumatori secondari (Hernroth, 1983).

La specie è euriterma ed eurialina (Fengqi, 1996), con un *optimum* di temperatura compreso tra i 10 °C ed i 35 °C ed una resistenza estrema alle variazioni di salinità (5 – 35 PSU) (Persoone *et al.*, 1989). Per quanto riguarda le condizioni ambientali, la sensibilità a composti tossici di riferimento pare essere direttamente proporzionale alla temperatura ed inversamente proporzionale alla salinità, ma, rispetto ad altre specie, *B. plicatilis* sembra avere una variabilità minore nelle repliche di saggi sul medesimo campione (Persoone *et al.*, 1989).

Pur nella consapevolezza della modesta sensibilità di questi organismi per la maggior parte degli inquinanti, non si possono ignorare alcuni fattori che rendono il loro utilizzo utile all'interno di una batteria di saggi (Wells, 1998; USEPA, 1993). In particolare, oltre alle caratteristiche di ampia distribuzione geografica e resistenza alle variazioni di salinità e temperatura, si ricordano anche:

- La semplicità del saggio. Il saggio risulta nel suo insieme standardizzato e relativamente facile da eseguire dopo un opportuno tirocinio ed i risultati appaiono dotati di buona coerenza interna e riproducibilità.
- La reperibilità durante tutto l'arco dell'anno delle cisti; esiste un indubbio vantaggio nell'utilizzo di cisti di *B. plicatilis*, per la possibilità di avviare un saggio biologico anche con breve preavviso e per la garanzia di controllo esistente sul ceppo di origine. È valida anche la possibilità di usare popolazioni allevati come alimentazione in impianti di produzione itticolture. In tal caso però dovrebbero essere controllate la standardizzazione di stabulazione, l'omogeneità genetica e l'assenza di derive genetiche.
- La presenza di un protocollo normato.
- L'economicità del saggio.

Come protocollo operativo viene applicata la norma ASTM E 1440 (1991 rev. 1998), che considera come endpoint la mortalità o l'incapacità di attività natatoria. Tuttavia, l'esperienza del gruppo *ad hoc* in ambito UNICHIM, suggerisce la necessità di modifiche relativamente alle procedure di schiusa delle forme criptobiotiche e di adattamento.

ASTM considera come lettura di controllo quella alle 24 ore, ma come definitiva alle 48 ore, prossima al 70 % del ciclo vitale. Si tratta dunque di un saggio di tossicità acuta, dove si osserva l'effetto immediato che una sostanza tossica produce su un organismo vivente (soma). L'endpoint è la "non motilità", quindi gravi problemi fisiologici dopo un breve lasso di tempo successivo all'esposizione del contaminante. Molto promettenti si prospettano le sperimentazioni di endpoint subletali relativi ad alterazioni della capacità natatoria.

Normalmente *B. plicatilis* viene dunque usata come specie che valuta reflui con concentrazione di sali elevate o matrici provenienti da acque di transizione (Francese, 2001), ma può essere ben utilizzata per aree situate in ambiti sensibili (aree naturalisticamente pregiate o sotto tutela) ove vi sia un impatto antropico (Francese, 2003).

Rispetto alle definizioni adottate nelle presenti Linee Guida (conformi a quanto definito nel Guidance Document No 5, dal Working Group 2.4 coast secondo la Water Framework Directive 2000/60/EC), il rotifero marino si può definire pertinente agli ambienti A (ambienti acquatici di transizione, in un campo di salinità variabile anche riconducibili ad un gradiente di salinità, ma con valori sempre inferiori a quelli della zona costiera adiacente). Più specificatamente, classificando la matrice di sedimento in base alla composizione media del substrato, il saggio biologico con rotifero si può definire pertinente agli ambienti **A3** (fango) e **A4** (sedimenti misti).

Per quanto riguarda gli obiettivi, definiti sulla base degli impatti possibili, il saggio ecotossicologico con il rotifero marino *B. plicatilis* si ritiene pertinente a quelli di seguito descritti: monitoraggio di scarichi idrici e relativi ambienti recettori (**b**); monitoraggio per protezione ambienti particolari come zone di particolare pregio naturalistico o di produzione acquacolturale, in particolare in porticcioli o marina compresi nei perimetri di parchi o riserve naturali ed in particolare per impianti flottanti di molluschicoltura o di itticoltura offshore, vista anche l'appartenenza alla catena trofica naturale delle

specie allevate (d_1 e d_2); caratterizzazione dei sedimenti da dragare per la valutazione degli effetti, nel sito da dragare e nel sito di destinazione (e_1).

La matrice potrà essere analizzata nei seguenti comparti. Il primo è **(I)** - acqua sovrantante -, cioè al di sopra dell'interfaccia acqua/sedimento. Più specificatamente si può intendere come tale la lama in uscita dallo scarico che si mantiene separata dal resto del corpo idrico per differente densità prima del mescolamento; parimenti si intende acqua di interfaccia quella porzione superiore allo strato superficiale di sedimento, in cui si mantiene elevata l'attività batterica, preda ottimale del rotifero. Altro comparto è il **(III)** – elutriato-, cioè quella porzione solubile estratta dal sedimento in modo meccanico (meglio con agitazione che mescolamento), che presumibilmente raccoglie come soluti o come complessi particolato - molecole la rata di composti biodisponibili. Più specificatamente l'elutriato, è la simulazione più vera delle movimentazioni di fondali durante i dragaggi o le azioni di bonifica. Infine, per quanto riguarda il saggio con *B. plicatilis*, esso ben si applicherebbe ad un comparto speciale definito dal particellato sospeso, là dove un organismo sospensivoro decompositore come il rotifero è in grado di aggredire alla ricerca di alimento granuli di modeste dimensioni e venire in contatto con eventuali contaminanti ivi complessati.

Seguendo la logica proposta nel Capitolo 1, *Brachionus plicatilis* si configura rappresentativo per il saggio di tipo **C** (elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo **H** (acqua sovrantante e organismi non bentonici, senza fase solida).

A conclusione si può indicare il saggio con rotiferi, come un saggio aggiuntivo, obbligatorio in caso di reflui misti, di valutazione della qualità di siti destinati ad acquacoltura o di porticcioli da diporto, aggiuntivo o per approfondimento in caso di caratterizzazioni per dragaggi o bonifiche.

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è descritta nelle tabb. 3.5 e 3.6, rispettivamente.

Tab. 3.5. Valenza scientifica del saggio con *Brachionus plicatilis*.

	Durata	Sep	RSeco	DG	RES	Totale
<i>Brachionus plicatilis</i>	48 h	2	4	2	1	9

Tab. 3.6. Valenza pratica del saggio con *Brachionus plicatilis*.

	Durata	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Brachionus plicatilis</i>	48 h	5	2	5	2	3	17

3.5 - Crostacei

Tra i crostacei marini utilizzati per saggi ecotossicologici vi sono sia organismi appartenenti al plancton che al benthos.

Copepodi

Tra i copepodi marini le specie più comunemente utilizzate sono *Tisbe battagliai*, *Nitocra spinipes* e *Acartia tonsa*.

Considerando la rilevanza ambientale, si ricorda però che, secondo l'European Register of Marine Species (ERMS):

- *Tisbe battagliai* è presente in Europa, ma non nel Mediterraneo;
- *Nitocra spinipes* non è segnalato in Europa neanche il genere.

Il copepode planctonico *Acartia tonsa* è specie cosmopolita tipica di ambienti ad alto trofismo e comune in estuari e lagune costiere. Segnalata fin dai primi anni 90 nelle lagune dell'alto Adriatico (Farabegoli *et al.*, 1989; Sei *et al.*, 1996a), in alcune lagune è diventata specie dominante del popolamento zooplanctonico soppiantando le specie congeneriche autoctone (Comaschi *et al.*, 2000; Sei *et al.*, 2006a) e recentemente è stata riportata la sua presenza anche nella Laguna di Lesina (Sei *et al.*, 2006a). Dove *Acartia tonsa* non è presente o è molto rara (basso Tirreno), i saggi potrebbero essere estesi a specie congeneriche (*Acartia clausi*), anche per evitare l'introduzione di specie aliene. *Acartia tonsa* è reperibile tutto l'anno con abbondanze particolarmente elevate da marzo/aprile a ottobre/novembre. Il campionamento è relativamente facile e richiede un'imbarcazione con un retino per il prelievo di zooplancton. La specie, tuttavia, è reperibile anche commercialmente e può essere facilmente allevata in laboratorio.

Tigriopus fulvus (Fisher, 1860) è un copepode arpacticoido autoctono, meiobentonico, eurialino ed euritermo, facilmente riconoscibile, di piccole dimensioni (lunghezza 0,7-0,8 mm), con sessi separati e dimorfismo sessuale. È ben distribuito nel suo habitat - piano sopralitorale delle coste rocciose del Mediterraneo (Carli e Fiori, 1977). Lo sviluppo di *T. fulvus* avviene attraverso cinque stadi naupliari e cinque stadi di copepodite. In laboratorio il tempo necessario per passare dalla schiusa al raggiungimento dello stadio adulto può variare in funzione delle condizioni di allevamento e, in particolare, della quantità e qualità del cibo somministrato, della temperatura e della salinità dell'acqua (Carli *et al.*, 1989; Pane *et al.*, 1996; Todaro *et al.*, 2001). I naupli sono adatti per saggi di tossicità (fino a 96 h) in matrice acquosa (elutriati e acqua interstiziale), ma sono state effettuate sperimentazioni anche per rilevare endpoint subletali, sia su nauplii (rilascio delle mute), sia sugli adulti. *Tigriopus fulvus* è inserito tra le specie utilizzabili indicate per analisi ecotossicologiche (saggi biologici di tossicità) dalla Regione Veneto (Dgr. n°4170 del 30 dicembre 2005), dalla Legge Regionale Toscana 4 aprile 2003, n. 19, dalla provincia di Livorno Dipartimento dell'Ambiente e del Territorio e dalle procedure operative per la movimentazione materiali in ambiente marino ed in zone ad esso contigue dell'ARPAT (D.D.G. n° 323 del 27-6-2005).

Anostraci

L'utilizzo di specie del genere *Artemia* (Crustacea, Anostraca) in ecotossicologia è ben documentato: negli ultimi 20 anni il genere è stato largamente impiegato per valutare la tossicità acuta di contaminanti organici ed inorganici. Weideborg *et al.* (1997) e Davoren *et al.* (2005) ritengono che il saggio di tossicità acuta con *Artemia salina* non sia sufficientemente sensibile per poter essere incluso in una batteria di saggi per sedimenti marini o di estuario. Risultati preliminari di saggi a lungo termine (Manfra *et al.*, 2009) hanno evidenziato però una maggiore sensibilità rispetto ai saggi acuti per quanto riguarda la sopravvivenza come parametro di risposta. Altri autori (Brix *et al.*, 2003, 2004), che recentemente hanno valutato la tossicità a lungo termine con *Artemia*, evidenziano che la sopravvivenza costituisce l'endpoint più sensibile tra quelli da loro considerati (sopravvivenza, crescita intesa come biomassa degli organismi e riproduzione).

I metodi di esecuzione dei saggi sia acuto (Guzzella, 1997) che a lungo termine (Manfra *et al.*, 2009) presentano una relativa semplicità di realizzazione, poiché consentono l'utilizzo di cisti reperibili in commercio o di naupli ottenuti da organismi partenogenetici facilmente allevabili in laboratorio, la realizzabilità a domanda, la facile rilevazione della risposta utilizzando l'endpoint letale.

Anfipodi

I Crostacei Anfipodi sono ampiamente utilizzati nei saggi biologici per valutare la qualità dei sedimenti di ambienti marini e di transizione (Chapman e Wang, 2001).

La guida ASTM (1999) descrive il saggio statico con sedimento intero a 10 giorni con anfipodi marini e di estuario, indicando l'utilizzo di: *Rhepoxynius abronius*, *Eohaustorius estuarius*, *Ampelisca*

abdita, *Grandidierella japonica*, *Leptocheirus plumulosus*, specie che però non sono state segnalate nel Mar Mediterraneo (Ruffo, 1982).

In Europa, *Corophium volutator* risulta tra le specie raccomandate (OSPAR, 1995) in particolare in Olanda, Gran Bretagna e Belgio è indicato per saggiare sedimenti contaminati e caratterizzare materiale dragato (den Besten *et al.*, 2003). È un animale fossorio che forma un tubo e si nutre sulla superficie del sedimento, sopporta variazioni di salinità e di granulometria del sedimento. Peters e Ahlf (2005) hanno allevato per circa tre anni una popolazione di *C. volutator* in laboratorio con successo. Lungo le coste Mediterranee questa specie non risulta però presente. Il protocollo internazionale ISO 16712 (2005) indica *Corophium orientale* come unica specie di anfipode presente nel Mediterraneo da utilizzare nel saggio acuto a 10 giorni.

Per quel che riguarda il genere *Corophium*, in Mediterraneo esistono 17 specie, tra queste fino ad oggi solo *Corophium orientale* e *Corophium insidiosum* sono state oggetto di studi ecotossicologici.

Corophium orientale Schellenberg, 1928 è una specie endemica del Mar Mediterraneo ampiamente diffusa in acque salmastre (Ruffo, 1982). Sebbene *C. orientale* sia presente in tutto il Mediterraneo, i siti di campionamento italiani idonei per il suo routinario impiego nei saggi biologici conosciuti fino ad oggi sono pochi: Fiume Magra (SP), Fiume Serchio (PI), Valli di Comacchio (FE), Fiume Bruna (GR). La sensibilità delle popolazioni del fiume Serchio e Magra è stata valutata mensilmente per un anno, confrontando la loro risposta a due differenti tossici di riferimento (Cadmio ed SDS). I risultati di questo studio non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra le due popolazioni che, quindi, possono essere utilizzate indifferentemente nei saggi di tossicità (Lera *et al.*, 2008). Altri siti in cui è stata rilevata la presenza di *C. orientale* non sono risultati idonei per un impiego nei saggi biologici, poiché la specie è presente in scarsa quantità oppure presente insieme ad altre specie affini (es. *C. insidiosum*). Tra i vantaggi dell'impiego di *C. orientale* nei saggi si possono ricordare la reperibilità della specie durante tutto l'anno e la buona tolleranza alle variazioni di salinità, che può essere gradualmente aumentata (4-6 ‰ al giorno) fino ad ottenere la salinità dei campioni da saggiare.

La norma ISO 16712-05 indica tra le specie utilizzabili per il saggio biologico a 10 giorni *C. orientale*, utilizzabile anche per il saggio a 28 giorni (Bigongiari *et al.*, 2001). L'applicabilità del metodo con *Corophium orientale* ai sedimenti è stata verificata in diversi studi costieri (Lera *et al.*, 2008; Bigongiari *et al.*, 2004a; Bigongiari *et al.*, 2004b; Bigongiari *et al.*, 2001; Bigongiari *et al.*, 1998; Onorati *et al.*, 1999) e di ambienti di transizione, tra cui la Laguna di Venezia, riportati in Picone *et al.* (2008).

Corophium insidiosum (Crawford, 1937) è una specie tubicola che vive infossata nei sedimenti mobili ampiamente distribuita sulle coste del Mediterraneo. Possiede molte delle caratteristiche richieste per essere considerata *specie-saggio*. Si adatta bene alle variabili ambientali (temperatura, salinità, granulometria) alla densità e ai diversi tipi di alimentazione (Prato e Biandolino, 2006a; Prato *et al.*, 2007a). È reperibile durante tutto l'anno con abbondanze particolarmente elevate in primavera-estate (Prato e Biandolino, 2006a). Risulta essere molto sensibile ai tossici di riferimento come cadmio, rame e mercurio (Prato *et al.*, 2006a). I saggi biologici con *C. insidiosum* mostrano risultati promettenti per valutare la qualità dei sedimenti (Annicchiarico *et al.*, 2007; Prato *et al.*, 2006b), e potranno essere utilizzati in alternativa o affiancati a quelli con *C. orientale*.

Entrambe sono specie che possono essere mantenute facilmente in laboratorio per lunghi periodi, purtroppo fino ad oggi non risulta che siano stati effettuati allevamenti però, vista l'estrema affinità con *C. volutator*, è plausibile che anche l'allevamento di queste specie sia fattibile.

Il campionamento dei due *Corophiidae* è molto semplice e veloce poiché si effettua setacciando il sedimento nativo, raccolto con una pala o una benna Van Veen, attraverso un setaccio con maglie da 500 µm, gli organismi così ottenuti vengono poi selezionati attraverso una pila di setacci. In laboratorio gli organismi vengono introdotti in contenitori adeguati con il loro sedimento nativo, in condizioni di temperatura costante (15 ± 2 °C), luce continua ed aerazione continua. L'esecuzione del saggio biologico è molto semplice e non necessita di apparecchiature particolari ma una semplice strumentazione comunemente presente in un laboratorio biologico.

Ampelisca diadema è una specie a larga ripartizione ecologica, in grado di colonizzare ambienti estremamente differenziati. Esemplari di *A. diadema* sono stati rinvenuti in prossimità della costa e

verso il largo fino a 80 metri di profondità, sia in fondali sabbiosi, sia fangosi dell'Alto e Medio Adriatico. Il rinvenimento di popolazioni nei fondali a livello dei prodelta fluviali e della Laguna di Venezia suggeriscono che *A. diadema* possieda una certa tolleranza ad elevati tassi di sedimentazione ed una discreta capacità di sopportare variazioni di salinità. Ad oggi *A. diadema* è l'unica specie del genere *Ampelisca* in grado di colonizzare habitat salmastri.

Dalla bibliografia emerge che *Ampelisca diadema* è diffusa nell'Atlantico Nord-Orientale ed in tutto il Mediterraneo. In particolare, è stata rinvenuta al largo delle coste dell'Atlantico Orientale (Irlanda, Inghilterra, Scozia, Francia), del Mar Nero e del Mar Mediterraneo Occidentale ed Orientale (Francia, Italia, Grecia, Egitto, Algeria) (Bellan-Santini, 1982; Ruffo, 1982) ed è stata segnalata nei fondali al largo delle coste di Liguria, Toscana, Lazio, Campania, Puglia, Marche, Emilia Romagna, Veneto e Friuli Venezia Giulia (Ruffo, 1982; Argano *et al.*, 1995; ARPA Emilia Romagna, pers.oss., ARPAT Toscana pers.oss.; Simonini *et al.*, 2005 a, b, pers.oss.). Le popolazioni di *A. diadema* dei fondi fangosi al largo delle coste romagnole possono raggiungere densità di 10000 - 15000 ind/m². Il campionamento prevede l'impiego di una rete a ramponi (rapido), costituita da una bocca con armatura metallica, alla quale è attaccata una rete doppia, dotata sul lato inferiore di denti più o meno arcuati. Con tale procedura è possibile raccogliere fino a 10 - 30000 animali in breve tempo che possono essere trasportati e stabulati all'interno di vasche da 30-50 L contenenti acqua marina e con uno strato di 2 cm di sedimento sul fondo. Per l'allevamento, in laboratorio le vasche vengono mantenute in locali a temperatura controllata (20 - 24 °C), fotoperiodo di 12h luce/ 12 ore buio, salinità 32 PSU ed abbondante aerazione. Ogni settimana parte dell'acqua delle vasche viene sostituita con acqua marina pulita. Due volte alla settimana, ed in ogni caso dopo il rinnovo parziale dell'acqua, gli animali vengono nutriti con una sospensione di mangimi artificiali per filtratori, di origine animale o vegetale (Tetramin[®]), oppure con diatomee e alghe verdi (*Isochris* e *Nannochloropsis*, Verde Vivo, Acquaristica srl). Le colture di laboratorio possono essere mantenute per circa tre mesi avendo cura di sostituire le vasche una volta al mese.

Per i saggi biologici si usa una metodica molto simile a quella adottata per *Corophium*, ed il saggio dura 10 giorni (endpoint mortalità). Sono state effettuate numerose prove tra due laboratori (ICRAM, UNIMORE) e ormai il protocollo metodologico è definito. Risulta molto più sensibile alle sostanze pure di altri anfipodi comunemente impiegati in Europa per l'esecuzione dei saggi biologici. Il ciclo biologico, l'autoecologia e la sinecologia di *A. diadema* originaria di un'area al largo di Cesenatico sono stati recentemente caratterizzati. Densità popolazioni di *A. diadema* sembrano essere in grado di influenzare la struttura e la composizione delle comunità di fondo. I risultati suggeriscono che *A. diadema* rappresenti la specie chiave degli ecosistemi bentonici di una ampia zona di mare, compresa tra le batimetrie di 8 - 10 m e 20 - 25 m, che si estende dal delta dell'Isonzo a Pesaro, nella quale si concentrano numerose sorgenti di impatto antropico diretto ed indiretto (pozzi metaniferi, impianti di mitilicoltura, aree di immersione dei dragaggi portuali, porti, foci fluviali ecc.).

Gammarus aequicauda è una specie endemica del Mediterraneo ad ampia diffusione. Vive sui fondi mobili entro una batimetria di 0 - 20 m, generalmente tra macroalghe *Chaetomorpha linum*, *Enteromorpha intestinalis* e *Ulva* ssp, ma si rinviene facilmente anche sotto le pietre o sulla superficie del sedimento. Popola frequentemente anche lagune, acquitrini e pozze costiere. Ha un'alimentazione di tipo onnivoro costituita da macroalghe, detrito organico che ricava "raschiando" dalla superficie dei granuli di sedimento. Durante tutto l'anno è facilmente reperibile con densità variabili (Prato e Biandolino, 2003). Il campionamento è molto semplice, può essere effettuato setacciando il sedimento (raccolto con benna Van Veen, o con una pala) e le macroalghe attraverso una serie di setacci. Gli organismi trattenuti introdotti in un contenitore con il sedimento nativo vengono trasportati e stabulati in laboratorio. Uno studio su *Gammarus aequicauda* (Prato e Biandolino, 2005) ha evidenziato che la taglia influenza la sensibilità: gli adulti sono meno sensibili degli individui pre-riproduttivi. Pertanto per il saggio vengono selezionati individui in età pre-riproduttiva, corrispondenti alle dimensioni di 2 - 4 mm. Può essere allevato facilmente in laboratorio mostrando una buona sensibilità ai tossici di riferimento e una buona capacità di discriminare differenti livelli di contaminazione. (Prato *et al.*, 2006b; 2007c). Ha mostrato una buona tolleranza alle variabili ambientali (temperatura, salinità, granulometria) alla densità e ai diversi tipi di alimentazione (Prato e Biandolino, 2005). Per il saggio di tossicità si usa una metodica molto simile a quella utilizzata per il *Corophium* spp.

Cirripedi

Infine, un organismo forse ancora poco utilizzato, ma che offre buone prospettive, è il cirripede toracico *Balanus amphitrite* che, a seguito di una revisione filogenetica (Pitombo, 2004), ha recentemente cambiato nome in *Amphibalanus amphitrite*. Questo organismo sessile è una specie dominante tra gli organismi del fouling ed ha una distribuzione cosmopolita (Desai *et al.* 2006). È un crostaceo con una fase adulta bentonica ed una fase larvale planctonica che si compie attraverso diversi stadi di sviluppo. Gli embrioni (I stadio), mantenuti all'interno della cavità del mantello dell'organismo adulto, vengono rilasciati nell'ambiente, quando raggiungono il II stadio di sviluppo naupliare. Lo sviluppo prosegue attraverso la successione di altri 4 stadi naupliari planctotrofici e uno stadio finale lecitotrofico denominato cypris che si insedia sul substrato (artificiale o naturale) metamorfosando nella fase adulta. Gli adulti di questa specie, euriterma ed eurialina, sono diffusi su tutto il territorio italiano e facilmente reperibili su qualsiasi substrato artificiale (carene, pontili galleggianti, ecc.). Nelle nostre acque è possibile rinvenirlo dal limite superiore della fascia infralitorale fino a circa 65-70 metri di profondità. L'allevamento ed il mantenimento in laboratorio (Geraci e Romairone, 1990; Greco *et al.*, 2006) sono relativamente facili in quanto sono necessarie le classiche attrezzature per allevare organismi marini (termostatazione, fotoperiodo, ossigenazione, colture algali e *Artemia salina* per alimento, ecc). Si possono allevare comodamente circa 30 - 40 organismi adulti per ogni singolo beaker da 500 mL, con rinnovo del mezzo ogni 2 giorni. Se ben alimentati sono in grado di produrre le larve (rilasciate al II stadio naupliare) 2-3 volte alla settimana per un intero anno senza il rinnovo dello stock di adulti. Anche le larve sono facilmente allevabili per tutto il ciclo planctonico (VI stadi naupliari e una larva insediante lecitotrofica denominata "cypris") in beaker. Le differenti fasi larvali sono utilizzabili per biosaggi che prevedono un classico saggio acuto in scatole multipozzetto o per saggi cronici in semplici "gabbie" di esposizione. Si richiede qualche ora per l'allestimento del saggio e 24 - 48 di esposizione per i saggi di mortalità e sub-letali (utilizzando i naupli fase II-III), oppure 7 giorni (con rinnovo e alimentazione) per l'esecuzione del saggio cronico (utilizzando tutte le fasi). Gli endpoint rilevabili possono essere acuti come la sopravvivenza (a 24 - 48 h), cronici come l'alterazione dello sviluppo degli stadi naupliari e della metamorfosi della larva insediante e sub-letali come l'alterazione di una funzione fondamentale come il nuoto naupliare (endpoint tossicologico già abbondantemente utilizzato e studiato a diversi livelli sia in vertebrati che invertebrati ed alghe). Per queste ragioni, la standardizzazione e lo studio della potenziale applicabilità di alcuni endpoint tossicologici che sfruttano tutte le fasi larvali sono stati ampiamente indagati (Wu *et al.*, 1997a, b; Lame *et al.*, 2000; Magillo *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2005; Faimali *et al.*, 2006a,b,c; Choong *et al.*, 2006; Faimali *et al.*, 2008; Garaventa *et al.*, 2010) e recentemente un test che prevede l'immobilità larvale di questa specie ha terminato il processo di normazione UNICHIM (PrMU 2245, 2010).

Sulla base della review precedente, vengono di seguito proposti per l'inclusione nelle batterie:

1. il saggio con *Acartia tonsa* a 24/48 h, endpoint mortalità (PrMU 2365, 2010), e quello a 7 gg, endpoint sviluppo/mortalità (PrMU 2366, 2010), per saggi di tipo **C** (con elutriati o estratti da sedimento intero, organismi non bentonici, senza fase solida), o di tipo **H** (con acqua sovrantante o interstiziale, organismi non bentonici, senza fase solida);
2. il saggio con *Tigriopus fulvus* (adulti) a 24/48/96 h, endpoint mortalità (PrMU 2396, 2010) e endpoint rilascio mute (naupli) a 24/48/96 h (Faraponova *et al.*, 2005), per saggi di tipo **C** (con elutriati o estratti da sedimento intero, organismi non bentonici, senza fase solida), o di tipo **H** (con acqua sovrantante o interstiziale, organismi non bentonici, senza fase solida);
3. il saggio di screening con *Artemia* sp. a 24 h (APAT IRSA-CNR, 2003) e il saggio definitivo a 14 giorni (PrMU 2244, 2010), endpoint mortalità, per saggi di tipo **C** (con elutriati o estratti da sedimento intero, organismi non bentonici, senza fase solida), o di tipo **H** (con acqua sovrantante o interstiziale, organismi non bentonici, senza fase solida);
4. il saggio con *Corophium orientale* a 10 giorni, endpoint mortalità (ISO 16712/2005), per saggi di tipo **A** (con sedimento intero e organismi bentonici); il saggio a 28 gg (Bigongiari *et al.*, 2001) per saggi di tipo **A** (con sedimento intero e organismi bentonici); il saggio a 96 h (PrMU 2346, 2010) per saggi di tipo **E** (con acqua sovrantante o interstiziale e organismi bentonici).

5. il saggio con *Amphibalanus amphitrite* a 24/48 h, endpoint immobilizzazione (PrMU 2245, 2010), per saggi di tipo **B** (con sedimento intero e organismi non bentonici), di tipo **C** (con elutriati o estratti da sedimento intero, organismi non bentonici, senza fase solida), o di tipo **H** (con acqua sovranatante o interstiziale, organismi non bentonici, senza fase solida).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica del saggio con *Acartia tonsa* è superiore per acque di transizione che per acque marine costiere, perché RS_{eco} transizione = 4, mentre scende a 1 per le acque marine costiere (Tab. 3.7).

Tab. 3.7. Valenze scientifiche del saggio con *Acartia tonsa*.

	Durata	Sep	RSeco	DG	RES	Totale
<i>Acartia tonsa</i>	24/48 h	3	4/1	2	1	10/7
	7 gg	3	4/1	2	3	12/9

Per quanto attiene alla valenza pratica, le ponderazioni esperte sono riportate in tabella 3.8.

Tab. 3.8. Valenze pratiche del saggio con *Acartia tonsa*.

	Durata	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Acartia tonsa</i>	24/48 h	5	2	5	2	2	16
	7 gg	5	2	3	2	1	13

Per il saggio con *Tigriopus fulvus* la valenza scientifica è massima per ambienti costieri con substrato duro, dove RS_{eco} = 4, che scende a 1 per gli altri ambienti (Tab. 3.9). Analogamente, per quanto riguarda le valenze pratiche si avranno i fattori di cui in tabella 3.10.

Tab. 3.9. Valenze scientifiche del saggio con *Tigriopus fulvus*.

	Durata	Sep	RSeco	DG	RES	Totale
<i>Tigriopus fulvus</i> (adulti)	24/48/96 h	1	4/1	2	1	8/5
<i>Tigriopus fulvus</i> (naupli)	24/48/96 h	2	4/1	2	1	9/6

Tab. 3.10. Valenze pratiche del saggio con *Tigriopus fulvus*.

	Durata	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Tigriopus fulvus</i> (adulti)	24/48/96 h	5	1	5	2	3	16
<i>Tigriopus fulvus</i> (naupli)	24/48/96 h	5	2	5	2	3	17

Per il saggio con *Artemia* sp. le valenze scientifiche e pratiche sono dettagliate in tabella 3.11 e 3.12, rispettivamente.

Tab. 3.11. Valenze scientifiche del saggio con *Artemia* sp.

	Durata	Sep	RSeco	DG	RES	Totale
<i>Artemia</i> sp.	24 h	2	1	2	1	6
	14 gg	3	1	2	2	8

Tab. 3.12. Valenze pratiche del saggio con *Artemia* sp.

	Durata	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Artemia</i> sp.	24 h	5	2	5	4	4	20
	14 gg	5	2	5	4	1	17

Anche per *Corophium orientale* RS_{eco} diminuisce da 4 ad 1 passando dalle acque di transizione a quelle marine costiere, ed ovviamente il saggio non può essere applicato per substrati rocciosi, ma solo in quelli ghiaiosi – sabbiosi, fangosi o misti (Tab. 3.13). Per la valenza pratica i fattori di ponderazioni sono quelli di tabella 3.14.

Tab. 3.13. Valenze scientifiche del saggio con *Corophium orientale*.

	Durata	Sep	RSeco	DG	RES	Totale
<i>Corophium orientale</i>	10 gg	3	4/1	3,5	1	11,5/8,5
	28 gg	2	4/1	3,5	2	11,5/8,5
	96 gg	3	4/1	3,5	1	11,5/8,5

Tab. 3.14. Valenze pratiche del saggio con *Corophium orientale*.

	Durata	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Corophium orientale</i>	10 gg	1	3	5	4	1	14
	28 gg	1	2	5	4	1	13
	96 gg	1	2	5	4	1	13

Il saggio con *Amphibalanus amphitrite* ha la massima valenza scientifica per ambienti costieri con substrato duro, dove $RS_{eco} = 4$, che scende a 3 per gli altri tipi di ambienti (Tab. 3.15).

Tab. 3.15. Valenza scientifica del saggio con *Amphibalanus amphitrite*.

	Durata	Sep	RSeco	DG	RES	Totale
<i>Amphibalanus amphitrite</i>	24/48 h	3	4/3	2	1	10/9

Per quanto concerne, invece, la valenza pratica del saggio con *Amphibalanus amphitrite* è possibile proporre i fattori di ponderazione di cui alla tabella 3.16.

Tab. 3.16. Valenza pratica del saggio con *Amphibalanus amphitrite*.

	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Amphibalanus amphitrite</i>	5	3	5	2	3	17

3.6 - Molluschi

La review di Rittschof e McClellan-Green (2005) evidenzia i molti motivi per i quali i molluschi sono spesso utilizzati come modelli in ricerche di ecotossicologia. Nonostante per gli studi di tossicità i molluschi, ed in particolare i bivalvi, filtratori, siano più adatti per valutare la tossicità del particolato sospeso e quindi della colonna d'acqua (Rittschof e McClellan-Green 2005), l'elevata sensibilità dei saggi con i primi stadi vitali è ormai riconosciuta come importante strumento per la valutazione della tossicità dei sedimenti (Nendza, 2002).

Il primo saggio di embriotossicità con le ostriche è stato sviluppato da Woelke (1972) e successivamente modificato da Thain e Watts (1984). Dagli anni Settanta sono stati condotti numerosi studi sugli effetti degli inquinanti sullo sviluppo embrionale delle varie specie. Attualmente i saggi di embriotossicità con i bivalvi sono inclusi in tutte le liste dei saggi biologici per il monitoraggio degli ambienti marino-costieri e di transizione (ICES, 1997; Chapman e Wang, 2001; Nendza, 2002). Le specie maggiormente utilizzate sono alcune specie di ostrica (57 %) e di mitilo (22 %); tra gli altri bivalvi, solo *Mercenaria mercenaria* (famiglia Veneridae) e *Mulinia lateralis* (famiglia Mactridae) vengono usati di routine nei saggi di tossicità (His *et al.*, 1999a).

Nonostante i numerosi studi e il vasto utilizzo, il livello di standardizzazione di questi saggi è ancora poco chiaro. Esistono, infatti, due protocolli standard per i saggi di embriotossicità con i molluschi bivalvi, proposti da USEPA (1995) e da ASTM (2004). Inoltre, His *et al.* (1997a) hanno proposto una semplificazione del protocollo dell'USEPA, con l'obiettivo di rendere i saggi più pratici e quindi più facilmente utilizzabili. I suddetti protocolli presentano delle differenze talvolta anche importanti e che riguardano le specie da utilizzare per i saggi, le modalità di reperimento degli adulti, alcune condizioni sperimentali (tempo e temperatura di incubazione), l'utilizzo di pools di gameti e l'endpoint. Nonostante propongano specie differenti, i protocolli prevedono che il saggio possa essere applicato sempre almeno ad una specie di ostrica e ad una specie di mitilo. Le modalità di reperimento degli organismi adulti fanno riferimento sia a popolazioni di allevamento che a popolazioni naturali; nel caso in cui siano scelte le popolazioni naturali, ASTM (2004) e USEPA (1995) consigliano un periodo di stabulazione e/o di condizionamento di 1-8 settimane, mentre His *et al.* (1997a) per *M. galloprovincialis* non prevedono questa fase.

Per quel che concerne l'esecuzione del saggio, solo ASTM (2004) prevede l'utilizzo di un pool di gameti, mentre USEPA (1995) e His *et al.* (1997a) prediligono la selezione dell'esemplare che ha fornito le migliori uova fecondate. Differenze sussistono anche sulle condizioni sperimentali di esposizione dei gameti, con tempi che vanno dalle 24 alle 72 h e temperature comprese tra 16 e 25 °C. La maggior discrepanza tra i protocolli riguarda l'endpoint: secondo ASTM (2004) vanno conteggiate solo le larve, che devono essere distinte tra normali e malformate; secondo USEPA (1995) e His *et al.*

(1997a), vanno inclusi nel conteggio anche gli stadi pre-larvali (che non sono riusciti a raggiungere lo stadio D-shape) e le larve morte (conchiglie vuote).

Esaminando i principali studi eseguiti negli anni 1990-2000 e riportati in letteratura internazionale riguardanti l'utilizzo dei saggi di embriotossicità con i bivalvi per la valutazione della tossicità di campioni ambientali si rileva che la maggior parte dei lavori sono condotti con la specie *C. gigas* (13 studi su 14); sono in aumento le indagini condotte su una batteria di saggi costituita da più specie di bivalvi (2 studi su 14) o da altri saggi con invertebrati, come ad esempio il riccio *P. lividus* (3 studi su 15). Le condizioni in cui vengono condotti i saggi possono essere ancora molto differenti, soprattutto per i vari tipi di endpoint (sviluppo embrionale, sviluppo larvale, crescita larvale). Anche le unità di misura in cui sono riportati i risultati differiscono molto tra gli studi, rendendo difficile un confronto. Le matrici ambientali su cui sono condotti i saggi sono rappresentate da elutriato (10 studi su 14), sebbene la tecnica di elutriazione non sia univoca, sedimento decantato o tenuto in sospensione (7 studi su 14) e acqua marina superficiale (2 studi su 14).

Sicuramente la matrice più rappresentativa per le larve planctoniche è l'elutriato, che però, non è in grado di estrarre dal sedimento alcuni contaminanti, soprattutto organici. L'applicazione del saggio con embrioni all'acqua interstiziale, anche se le larve in natura non vengono a contatto con essa, è generalmente accettata e utilizzata dal momento che gli stadi embrio-larvali sono buoni strumenti per rilevare effetti subletali altrimenti non misurabili (Carr *et al.*, 2001a; Nipper *et al.*, 2002).

Rispetto al saggio con l'echinoide *Paracentrotus lividus*, il saggio di embriotossicità con i bivalvi è più rappresentativo per gli ambienti di transizione e le matrici acquose possono essere valutate senza la correzione della salinità, dal momento che le larve di bivalve tollerano un range di salinità 25-35 ‰.

Geffard *et al.* (2004) ritengono che anche nel saggio sullo sviluppo embrionale (con *Crassostrea gigas*) bisognerebbe utilizzare sedimento decantato, invece che acqua sovrantante, perché le larve anormali vengono prodotte per contatto con il sedimento contaminato, ma non si osservano anomalie se esposte soltanto all'acqua sovrantante. Jha *et al.* (2000) hanno, inoltre, messo a punto un saggio di genotossicità usando gli stadi embrionali e larvali di *Mytilus edulis*, esposti a sedimento intero.

Alcune alterazioni del comportamento fossorio di vari molluschi bivalvi sono state utilizzate come endpoint in saggi di tossicità per i sedimenti *in toto* (estuarini e marini). L'osservazione che alterazioni di questo tipo sono correlabili alla presenza di contaminanti ha stimolato vari studi sia in campo, sia in laboratorio, (Pearson *et al.*, 1981; Phelps *et al.*, 1983, 1985, 1989). Il meccanismo fisiologico principale che determina tale comportamento (e di conseguenza anche le sue eventuali modificazioni) pare sia riconducibile alla percezione chemosensoriale, che è stata dimostrata essere alla base di risposte comportamentali diverse, come l'allontanamento dalla sorgente di contaminazione, una riduzione nell'assunzione di cibo o alterazioni nel comportamento riproduttivo (Hebel *et al.*, 1997).

A partire dagli anni '80 sono state sperimentate varie tipologie di saggi biologici (cronico ed acuto) che hanno utilizzato bivalvi bentonici di specie diverse (*Protothaca staminea*, *Macoma baltica*, *Donax trunculus*, *Tapes decussatus*, *T. philippinarum*, *Mia arenaria*) ed essenzialmente due diversi endpoint (velocità e percentuale di organismi riaffossati) a diversi intervalli di tempo. Benché al momento non siano disponibili metodi standardizzati per questo test, gli sviluppi più recenti relativi ad applicazioni ecotossicologiche prevedono l'esecuzione di saggi di tipo sub-letale acuto (durata 24 o 48h) effettuati esponendo organismi test al sedimento *in toto*. La rapidità e la semplicità di esecuzione ed i costi contenuti rendono questo test particolarmente adatto nello screening preliminare di campioni ambientali (Giesy e Hoke, 1989). Inoltre, è importante sottolineare anche il possibile significato ecologico attribuibile a questo test, in quanto il comportamento fossorio è ritenuto un meccanismo di tipo adattivo messo in atto da alcuni organismi bentonici per sfuggire a predatori (Doerding, 1982; Pearson *et al.*, 1981) e/o a condizioni ambientali sfavorevoli (Eisler, 1979; Olla *et al.*, 1980).

Numerose evidenze sperimentali sono state ottenute da vari ricercatori in Europa e negli Stati Uniti. Ad esempio, Byrne e O'Halloran (1999; 2001) hanno dimostrato che il tasso di riaffossamento delle vongole estuarine *Scrobicularia plana* e *Ruditapes philippinarum* veniva significativamente alterato dopo che gli animali venivano esposti a sedimenti provenienti da aree caratterizzate da alte concentrazioni di metalli. I risultati riportati da Kaschl e Carballeira (1999) hanno dimostrato che ad alte concentrazioni di rame *T. philippinarum* evita di riaffossarsi nei sedimenti ed inoltre mantiene chiuse le valve. Un analogo rallentamento nella velocità di riaffossamento è stato osservato da Roper e Hickey

(1994) nel bivalve *Macoma liliana* quando posta a contatto con sedimenti contaminati sia da rame che da zinco. Phelps *et al.* (1983) hanno ottenuto risultati simili in *Protothaca staminea* esposta a sedimenti inquinati con solo rame, mentre Pearson *et al.* (1981) hanno dimostrato, sempre in *Protothaca staminea*, che il rallentamento del riaffossamento, osservato in animali esposti a sedimenti inquinati, determina un aumento della pressione predatoria. Un'ulteriore dimostrazione della correlazione negativa tra i contenuti di mercurio e cadmio nei sedimenti e la velocità di riaffossamento del bivalve estuarino *Macoma baltica* è stata riportata da McGreer (1979). Per quanto riguarda la vongola filippina, Shin *et al.* (2002) hanno osservato un ritardo nel riaffossamento di *T. philippinarum* in presenza di sedimenti contaminati in laboratorio con concentrazioni crescenti di cadmio e in sedimenti naturali con diverso contenuto di metalli.

Byrne e O'Halloran (2001) hanno proposto l'uso di *Tapes semidecussatus* in saggi a 21 giorni con sedimento intero, perché è un organismo allevabile, disponibile tutto l'anno, facilmente conservabile in laboratorio e adatto per l'uso con ambienti salmastri (salinità 4–30 ‰). Il saggio ha due svantaggi, la durata e l'assenza di standardizzazione.

La disponibilità degli organismi (e vale anche per gli altri invertebrati) sta diventando sempre più l'elemento condizionante per l'adozione di un nuovo saggio. Cripe (2006), ad esempio, riferisce che un nuovo saggio con il mollusco bivalve *Mulinia lateralis*, proposto per sedimenti di estuario, è stato accolto favorevolmente, secondo una valutazione di più laboratori coordinata dall'EPA, ma per essere accettato richiedeva un miglioramento delle tecniche di allevamento. L'articolo propone poi una metodica che consente di avere sempre gli organismi per condurre saggi a 7 giorni, competitivi con il classico saggio a 10 d con anfipodi.

Per quanto concerne la presenza sulle coste italiane, dall'European Register of Marine Species (ERMS) risulta che:

- *Mytilus edulis* è presente nel Mediterraneo;
- *Tapes semidecussatus* è presente nel Mediterraneo (segnalata come *Tapes semidecussata*). Micheletti *et al.* (2004) hanno studiato il bioaccumulo in *Tapes philippinarum* nella laguna di Venezia. *T. philippinarum* è alloctono, introdotto nel 1980 e ora ha rimpiazzato quasi completamente *T. decussatus*.
- *Macoma* sp.: è presente nel Mediterraneo;
- *Rangia cuneata*: non è segnalato in Europa neanche il genere;
- *Crassostrea* sp.: presente in Europa, non nel Mediterraneo (ma Arizzi Novelli *et al.* (2005) hanno utilizzato *Crassostrea gigas* e *Mytilus galloprovincialis*, il tipico "mitilo Mediterraneo");
- *Mulinia lateralis*: non è segnalato in Europa neanche il genere.

Sono quindi indigeni sia *Mytilus* che *Tapes semidecussata*, ma non gli altri molluschi citati.

La specie *Crassostrea gigas* non è autoctona del Mediterraneo, tuttavia è stata introdotta per scopi commerciali a partire dagli anni Cinquanta e ormai è diffusa nell'Adriatico. In laguna di Venezia, ad esempio, *C. gigas* è stata introdotta per fini produttivo-commerciali nel 1966 e presenta attualmente una distribuzione addirittura superiore a quella della specie autoctona *Ostrea edulis*. La reperibilità di organismi adulti maturi per l'esecuzione dei saggi di tossicità è stata recentemente superata con l'allestimento di "sea farms" specializzate che condizionano gli animali per almeno 4-6 settimane, mantenendoli a temperatura costante e nutrendoli adeguatamente in modo da ottenere una maturità sessuale anche fuori dal normale periodo riproduttivo. La praticità di queste sea farms si ripercuote ovviamente sul costo del saggio: per gli animali reperiti in natura i laboratori devono sostenere il solo costo di campionamento, mentre gli organismi acquistati da centri di condizionamento hanno un costo decisamente maggiore, ma al contempo garantiscono la maturità e la buona qualità dei gameti (attraverso una piccola biopsia delle gonadi per ogni organismo adulto fornito).

L'impiego delle ostriche può essere ostacolato dall'assenza nel nostro paese di impianti di ostricoltura specializzati nel condizionamento degli animali. Fino ad oggi in Italia i mitili sono stati considerati solo allo stadio adulto, sia come indicatori di bioaccumulo, data la loro capacità di accumulare rilevanti concentrazioni d'inquinanti nei tessuti, sia come specie sentinella in indagini su biomarker di

esposizione e di effetto (Frenzilli *et al.*, 2001; Dolcetti *et al.*, 2002; Cavaletto *et al.*, 2002; Nasci *et al.*, 2002).

Recentemente l'impiego dei bivalvi nei saggi di tossicità in Italia ha riguardato *Mytilus galloprovincialis* e *Crassostrea gigas* (Losso, 2004) e *Tapes philippinarum* (Savorelli *et al.*, 2007).

Per quel che riguarda ostrica e mitilo, l'applicabilità dei saggi per la valutazione della tossicità dei sedimenti della laguna di Venezia è stata indagata applicando i saggi sia ad elutriati (Arizzi Novelli *et al.*, 2006; Losso *et al.*, 2007a) che ad acque interstiziali (Losso *et al.*, 2009) e valutando i possibili contributi alla tossicità da parte di ammoniaca e solfuri (Losso *et al.*, 2007a).

Il saggio non è stato applicato direttamente ai sedimenti, come proposto da ASTM (1998), in quanto le larve di bivalve non vengono mai a diretto contatto con il sedimento e non ci sono studi di letteratura che hanno valutato il possibile contributo alla tossicità legato alla frazione più fine del sedimento. Recentemente, è stata inoltre valutata la tossicità delle acque di scarico di impianti di depurazione tradizionali e a tecnologia avanzata come i bioreattori a membrana ad ultra-filtrazione (*i.e.* migliori tecnologie disponibili) sia con il saggio con il mitilo che con l'ostrica (Libralato, 2007).

La conduzione di saggi di tossicità acuta ha messo in evidenza l'elevata sensibilità delle larve di *M. galloprovincialis*, ai contaminanti inorganici e ad alcuni ceppi patogeni emergenti di *Vibrionaceae* (Narracci *et al.*, 2007; Prato *et al.*, 2006a; 2006c; 2006d; 2007e). Ciò ha permesso il loro utilizzo nella valutazione della qualità dei sedimenti del Mar Piccolo e Golfo di Taranto, inserendoli anche all'interno di batterie di saggi ecotossicologici (Annicchiarico *et al.*, 2007; Prato *et al.*, 2007e).

Per quel che riguarda la vongola, è stato messo a punto un saggio embriotossicologico con il bivalve *Tapes philippinarum* (Savorelli *et al.*, 2007). La metodologia è conforme alle procedure proposte da USEPA (1995) per *Mytilus galloprovincialis* e *Crassostrea gigas*, modificate opportunamente per adattare alla specie oggetto di studio. I saggi embriotossicologici con la vongola filippina si mostrano promettenti ad essere affiancati o utilizzati in alternativa a quelli con mitilo ed ostrica per indagini a livello gestionale, per valutare la qualità di acque e sedimenti di aree lagunari interessate da attività produttive (allevamenti di bivalvi).

Poiché la vongola filippina si riproduce nei mesi estivi da luglio a settembre, potrebbe essere utile affiancata ai bivalvi *Mytilus galloprovincialis* (periodo riproduttivo: ottobre-marzo) e *Crassostrea gigas* (periodo riproduttivo: maggio-luglio) nell'ambito di una programmazione annuale di saggi embriotossicologici. Il protocollo metodologico è conforme alle procedure proposte da USEPA (1995) per *Mytilus galloprovincialis* e *Crassostrea gigas*, modificate opportunamente per adattare alla specie oggetto di studio (stimolazione termica a 22 – 28 °C per indurre l'emissione dei gameti; incubazione degli embrioni a 24 °C per 24 h). La metodologia è riportata anche sul protocollo condiviso impiegato dal Gruppo "Molluschi" per il recente esercizio di interconfronto. Infatti tale protocollo, che si intende portare a normazione, sottolinea la possibilità di utilizzare i tre bivalvi indicati (*Mytilus galloprovincialis*, *C. gigas* e *Tapes philippinarum*). Il saggio embriotossicologico con *T. philippinarum* viene impiegato nei medesimi ambienti e comparti e con gli stessi obiettivi dei saggi con mitilo ed ostrica. Si faccia riferimento, pertanto, alle indicazioni su mitilo ed ostrica.

Sulla base della review precedente, vengono proposto per l'inclusione nelle batterie i saggi con *Crassostrea gigas* a 24 h e quello con *Mytilus galloprovincialis* a 48 h, endpoint embriotossicità, per saggi di tipo C (con elutriati o estratti da sedimento intero, organismi non bentonici, senza fase solida), o di tipo H (con acqua sovranatante o interstiziale, organismi non bentonici, senza fase solida).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, le valenze scientifiche e pratiche di *C. gigas* e *M. galloprovincialis* vengono riportate, rispettivamente, nelle tabelle 3.16 e 3.17.

Tab. 3.16. Valenze scientifiche dei saggi con *Crassostrea gigas* e *Mytilus gallo provincialis*.

	Durata	Sep	RSeco	DG	RES	Totale
<i>Crassostrea gigas</i>	24 h	1	4	2	3	10
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	48 h	2	4	2	3	11

Tab. 3.17. Valenze pratiche dei saggi con *Crassostrea gigas* e *Mytilus galloprovincialis*

	Durata	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
Crassostrea gigas	24 h	3	1	3	2	3	12
Mytilus galloprovincialis	48 h	3	2	3	2	3	13

3.7 - Echinoidi

L'allestimento di saggi di tossicità, capaci di combinare rapidità delle risposte con alta sensibilità e rilevanza ecologica, ha orientato da diversi decenni la comunità scientifica internazionale verso lo sviluppo di saggi che impiegano gli stadi del ciclo vitale più critici e sensibili, quali la fecondazione e lo sviluppo embrionale dei ricci di mare (Dinnel *et al.*, 1988; Pagano *et al.*, 1986).

Per tali organismi, con fecondazione esterna ed embrioni e larve privi di protezioni, il successo riproduttivo dipende in larga misura dalle condizioni ambientali. La fecondazione dell'uovo dipende dalla perfetta regolazione delle interazioni tra uovo e spermio, ed il successivo sviluppo dalle interazioni tra blastomeri e tessuti, e tra questi e le condizioni ambientali (Arizzi Novelli *et al.*, 2002a).

L'affidabilità del riccio di mare come bioindicatore è riconosciuta a livello mondiale e già negli anni '80 i saggi di fecondazione e di sviluppo embrionale sono stati inclusi nella lista ICES (1997) dei saggi biologici più attendibili per il monitoraggio dell'inquinamento marino. Procedure standard per i saggi di fecondazione e di sviluppo embrionale sono state messe a punto per le specie della costa orientale (*Arbacia punctulata*, *Strongylocentrotus droebachiensis*) e per quelle della costa occidentale (*Strongylocentrotus purpuratus*, *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Dendraster excentricus*) degli Stati Uniti (USEPA, 1994c, 1995, 2000a; ASTM, 1995, 2004) e per il Canada (Environment Canada, 1992).

Le guide ASTM ed i protocolli US EPA descrivono il saggio acuto statico di fecondazione e il saggio sub-cronico di sviluppo embrionale degli echinoidi suddetti che dall'European Register of Marine Species (ERMS) risultano specie non endemiche. Infatti *A. punctulata* non è segnalata in Europa; *S. droebachiensis* è presente in Europa ma non in Mediterraneo (sinonimi *Echinus dröbachiensis*, *Echinus granularis*, *Echinus neglectus*, *Strongylocentrotus chlorocentrotus*, *Toxopneustes pictus*); *S. purpuratus* non è segnalato in Europa e del *D. excentricus* non è segnalato in Europa neanche il genere. Non vi sono specie indigene tra quelle indicate, né specie allevabili.

In Italia le specie autoctone *Paracentrotus lividus*, *Sphaerechinus granularis* e *Arbacia lixula* sono da sempre oggetto di ricerche in campo fisiologico, biochimico ed embriologico (Giudice, 1986; Yokota *et al.*, 2002; Matranga, 2005). In particolare, la specie *P. lividus* ha trovato applicazione anche in campo ecotossicologico sia per quanto riguarda l'applicazione del saggio di fecondazione agli ambienti marino-costieri (Lera e Pellegrini, 2006; Lera *et al.*, 2006), sia per quanto riguarda il saggio sullo sviluppo embrionale (difetti nello sviluppo ed aberrazioni mitotiche), dopo esposizione dello sperma agli agenti tossici, oppure, più frequentemente, considerando l'esposizione dell'embrione, a partire dalle prime divisioni dello zigote. In letteratura si ritrovano numerosi esempi di esposizione a sostanze pure e a effluenti (Pagano *et al.*, 1985; 1988; Bressan *et al.*, 1991; Pieroni *et al.*, 1992; Graillet *et al.*, 1993; Arizzi Novelli *et al.*, 2002b, 2003a,b, Losso *et al.*, 2004; Russo *et al.*, 2003; Angelini *et al.*, 2005; Shroeder *et al.*, 2005, Manzo *et al.*, 2006), a miscele (Manzo *et al.*, 2008), ad acque e a sedimenti naturali (Pagano *et al.*, 1993, 2001; Pinto *et al.*, 1995; Volpi Ghirardini *et al.*, 1999, 2003, 2005). La scelta del *P. lividus* è dovuta soprattutto al fatto che è la specie di echinoide più diffusa e comune con un periodo riproduttivo sicuramente più lungo rispetto alle altre specie, anche se limitato a circa 8 mesi nell'arco dell'anno. Presenta inoltre una maggiore facilità ad essere campionato e reperito in natura e stabulato e allevato in laboratorio. Un'altra peculiarità legata alla specie è data dalla possibilità di riproduzione in laboratorio con buona probabilità di arrivare alla fase adulta, anche in sistemi a circuito chiuso che non necessitano di un continuo approvvigionamento di acqua di mare (Grosjean *et al.*, 1998; Spirlet *et al.*, 2000). Infatti, dopo la fase embrionale che si completa tra le 60 e le 72 ore e per la quale non è necessario un apporto esterno di cibo, le larve vengono cibate con alghe monocellulari verdi e brune per un periodo di circa 28 giorni, al termine della quale avviene la meta-

morfosi da larva ad individuo adulto. Durante questo periodo si accresce, a partire da poche cellule di uno solo dei due sacchi celomatici, il rudimento del futuro giovanile di riccio di mare (Matranga e Bonaventura, 2002).

Recenti studi hanno evidenziato che *P. lividus*, che tra le altre peculiarità è specie edule, in diverse località del sud Italia (coste pugliesi adriatiche e ioniche e coste siciliane), è meno abbondante di *A. lixula* (Guidetti *et al.*, 2003, 2004, Gianguzza *et al.*, 2006), la cui reperibilità risulta maggiormente agevole poiché occupa preferibilmente i livelli più superficiali (Chelazzi *et al.*, 1997). Inoltre è estremamente più semplice trovare esemplari in grado di emettere perché le gonadi si presentano mature durante tutto l'anno, sebbene le larve si ritrovino (soprattutto nel mar ligure) pelagiche solo ad agosto (Tortonese, 1965, osservazione personale). Per *P. lividus*, sebbene in determinate regioni del Mediterraneo si sia osservata l'emissione tutto l'anno (Guettaf *et al.*, 2000), recentemente l'esame istologico delle gonadi, ha dimostrato un ciclo di gametogenesi con sei fasi riproduttive e un periodo di emissione dei gameti principale che accade fra aprile e giugno (Sellem *et al.*, 2007). Per tali motivi, il gruppo di ricerca dell'Università di Genova (Falugi, comunicazione personale) ha intrapreso un percorso di validazione del saggio di fecondazione con la specie *A. lixula*, con l'obiettivo di fornire uno strumento in più per quelle località o per i periodi dell'anno in cui *P. lividus* non può essere utilizzato, così come è stato verificato nel Golfo di Napoli per la specie *S. granularis*.

Il protocollo per il saggio di fecondazione (saggio a 60 minuti) per *Paracentrotus lividus* Lmk, proposto formalmente da alcuni anni a livello nazionale nell'ambito del gruppo UNICHIM, deriva dalle competenze e dalle esperienze di diversi gruppi italiani; dopo una fase di valutazione della riproducibilità intralaboratorio, della sensibilità verso sostanze pure e di applicazione a matrici ambientali (e-lutriti e acqua interstiziale; Arizzi Novelli *et al.*, 2007) è stato sottoposto a esercizi di intercalibrazione che ne hanno evidenziato e riconfermato la validità come saggio rapido, affidabile e riproducibile. Durante gli esercizi di intercalibrazione tra i diversi laboratori coinvolti, sono stati ottenuti risultati di riproducibilità e confrontabilità dei dati con tossico di riferimento molto buoni con coefficienti di variazione del 16 % considerando che si tratta di un saggio biologico con organismi provenienti da popolazioni naturali. Le problematiche relative proprio alla reperibilità in natura ma che sono indipendenti dalla validità della metodologia proposta, potrebbero essere facilmente superate dalla possibilità di reperire animali da strutture che si occupano della riproduzione di tali organismi e che attualmente in Italia sono in fase avanzata di sperimentazione. Il protocollo è stato applicato da differenti realtà tecnico-scientifiche (ARPA, Centri di ricerca, Università) anche in programmi di monitoraggio nazionali (L.979/98) ed è sicuramente il tipo di saggio sugli echinoidi che negli ultimi anni ha avuto una maggiore diffusione nelle batterie per la valutazione dei qualità delle matrici naturali provenienti da ambienti costieri.

Il protocollo per il saggio di embriotossicità a 72 h proposto con la stessa specie (Arizzi Novelli *et al.*, 2002a), è considerato anch'esso rapido, ma con un endpoint sicuramente più impegnativo, in quanto richiede la conoscenza degli stadi di sviluppo larvali della specie utilizzata. Sono disponibili a tale scopo, le tavole di sviluppo per un corretto riconoscimento delle fasi di sviluppo da oocita, uovo vergine, zigote fino a giovanile di riccio adulto (Giudice, 1986, Matranga e Bonaventura, 2002). Tale saggio è inoltre da considerarsi molto più sensibile rispetto al saggio di fecondazione e presenta un endpoint più complesso in quanto va a valutare lo sviluppo larvale distinguendo i plutei normali da quelli che presentano malformazioni scheletriche e/o del tratto digerente e/o delle braccia. È possibile, inoltre, condurre una valutazione più approfondita sugli effetti prodotti durante lo sviluppo embrionale, mettendo in evidenza, all'interno della categoria di plutei anormali, altre categorie, seguendo in parte i criteri utilizzati da alcuni autori (Warnau *et al.*, 1996, Graillet *et al.*, 1993). Anche questo saggio, è stato sottoposto ad una fase iterativa di valutazione che passo dopo passo ed in accordo con un programma di controllo qualità (QA/QC) ne ha valutato precisione, riproducibilità intralaboratorio, comparabilità con metodi standard, sensibilità verso sostanze pure (Arizzi Novelli *et al.*, 2002b, 2003a) e fattori di confusione (Arizzi Novelli *et al.*, 2003b), capacità discriminante (Volpi Ghirardini *et al.*, 2005b) ed infine l'applicabilità agli ambienti marino-costieri e di transizione (Volpi Ghirardini *et al.*, 2005a; Losso *et al.*, 2006; 2007; Fabbrocini *et al.*, 2003, Manzo *et al.*, 2008). Di tale saggio già esiste una versione pubblicata sul manuale di tecniche acquatiche edita da CRC (Volpi Ghirardini *et al.*, 2005a). I principali vantaggi nell'uso di questo saggio sono essenzialmente l'alta sensibilità della risposta e la brevità di esecuzione (72 h); inoltre la sensibilità di questo saggio verso le principali categorie di contaminanti è confrontabile con quella dei più comuni saggi cronici e per tale motivo il saggio di embrio-

tossicità con *P. lividus* può essere considerato un saggio sub-cronico oltre al fatto che prevede l'esposizione degli organismi per tutta la durata della fase larvale.

Anche per questo saggio è stata iniziata una fase sperimentale di intercalibrazione, visti i buoni risultati ottenuti con prove di interconfronto effettuate da due laboratori che hanno messo in evidenza come anche tale metodologia possa essere agevolmente trasferita previa formazione degli operatori e una volta acquisita possa rispettare le caratteristiche di ripetibilità e di riproducibilità che contraddistinguono tale saggio e rendono valida la metodologia.

I due saggi insieme forniscono risposte complementari utili per la valutazione della qualità degli ambienti e rappresentano quindi degli affidabili metodi di indagine ecotossicologica e dei promettenti strumenti per il monitoraggio ambientale di ambienti marino-costieri.

Come già accennato, una variante ulteriore ai due tipi di saggi, poco discriminativa ed oggi meno utilizzata, ma che potrebbe assumere il significato di un saggio di "screening", utile nei casi in cui venga comunque richiesta una elevata sensibilità, è quella in cui viene attuata l'esposizione dello sperma e dopo la fecondazione continuata l'esposizione dell'embrione, valutando successivamente (dopo 48 h) il corretto sviluppo dei plutei.

Il riccio di mare si presta quindi, per la conduzione sia di un saggio molto rapido di fecondazione, sia di un saggio di sviluppo embrionale da considerare anch'esso rapido, ma con un endpoint sicuramente più significativo. Il saggio di sviluppo embrionale o di embriotossicità consente infatti una valutazione simultanea di una serie di parametri quali le anomalie dello sviluppo, le alterazioni del successo riproduttivo, della qualità della progenie e si presta ad essere utilizzato in diverse situazioni ambientali e a diversi livelli che possono condurre anche a diversificazioni delle metodologie (per esempio la valutazione degli effetti sullo sviluppo può differire nel caso in cui il saggio parta dall'uovo fecondato e quindi dall'esposizione dello zigote o parta ancora prima dall'esposizione dei gameti maschili).

Ai fini di questo documento si deve comunque concludere che il saggio di fecondazione potrebbe essere incluso da subito nelle batterie di saggi, mentre per quello di embriotossicità, non ancora del tutto "maturo", potrebbe essere sviluppato un protocollo metodologico concordato e condiviso, sulla base dei primi risultati dell'intercalibrazione svolta. Si potrebbero quindi approfondire le problematiche riguardanti il saggio di embriotossicità su *P. lividus*, esaminando anche la possibilità, dopo intercalibrazione in diversi laboratori italiani, di valutare l'endpoint per la caratterizzazione della tossicità a 48 ore, in accordo con quanto riportato da recenti articoli scientifici riguardanti l'embriotossicità.

Sulla base della review precedente, si ritiene di proporre per l'inclusione nelle batterie, per saggi di tipo **C** (con elutriati o estratti da sedimento intero, organismi non bentonici, senza fase solida), o di tipo **H** (con acqua sovranatante o interstiziale, organismi non bentonici, senza fase solida), il saggio con *Paracentrotus lividus* a 1 h, endpoint fecondazione, e quello con lo stesso organismo, a 72 h, endpoint embriotossicità.

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, le valenze scientifiche del saggio con *P. lividus* possono essere valutate come da Tabella 3.18.

Tab. 3.18. Valenze scientifiche dei saggi con *Paracentrotus lividus*.

	Durata	Sep	RSeco	DG	RES	Totale
<i>Paracentrotus lividus</i>	1 h	2	4	2	3	11
	72 h	1	4	2	3	10

Le valenze scientifiche, invece, sono descritte in tabella 3.19.

Tab. 3.19. Valenze pratiche dei saggi con *Paracentrotus lividus*.

	Durata	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Paracentrotus lividus</i>	1 h	2	2	3	2	3	12
	72 h	2	1	3	2	1	9

3.8 - Anellidi Policheti

ASTM (2000a, b) descrive in dettaglio l'esecuzione del saggio statico con sedimento intero a 10 giorni (sopravvivenza), oppure 20-28 giorni (sopravvivenza e crescita) con anellidi policheti marini o estuarini; le specie indicate sono *Neanthes arenaceodentata* (allevabile) e *Neanthes virens* (solo saggio a 10 d). *Neanthes virens* è conosciuta anche come *Nereis virens*. Possono però essere utilizzate anche: *Capitella capitata*, *Ophryotrocha diadema*, *Glycera dibranchiata*, *Nephtys incisa*, *Abarenicola pacifica*, *Ctenodrilus serratus*, *Dinophilus gyrociliatus*. ASTM (2000a) considera *Neanthes arenaceodentata*, *Capitella capitata*, *Ophryotrocha diadema*, *Dinophilus gyrociliatus*.

Di tali specie, sono presenti nei mari italiani (European Register of Marine Species (ERMS): *Capitella capitata* e *Dinophilus gyrociliatus*, mentre *Ophryotrocha* sp., *O. mediterranea*, *O. puerilis*, *O. labronica* sono state solo segnalate. *Neanthes arenaceodentata* da noi non è presente, ma c'è *N. succinea*. *Hediste diversicolor* è assai diffusa negli ambienti estuarini italiani.

H. diversicolor è sicuramente specie indicatrice di ambienti di transizione, dove colonizza prevalentemente substrati fangosi e ricchi di sostanza organica, è peraltro stata trovata sia in ambienti subtidali sia intertidali dove è stata oggetto di studi come indicatore di bioaccumulo e bioconcentrazione di metalli pesanti (Volpi Ghirardini *et al.*, 1999; Mugnai *et al.* 2001; Mugnai *et al.*, 2007; Frangipane *et al.*, 2005). La letteratura (Scaps, 2002) mette in evidenza un'ampia conoscenza sull'ecologia e la biologia di questa specie e lo spiccato adattamento che essa presenta a fluttuazioni di salinità, di ossigeno e ad elevate concentrazioni di solfuri nei sedimenti.

Moreira *et al.* (2005), per gli ambienti di estuario, propongono un interessante saggio a breve termine subletale con *Hediste diversicolor* che prevede una esposizione *in situ* per 48 ore e la misura della diminuzione di alimentazione nell'ora successiva.

Dinophilus gyrociliatus è segnalato in Italia ed esiste un protocollo standardizzato (ASTM E 1562 – 00), ma Nipper *et al.* (2002) segnalano difficoltà nel ritrovare, al termine del saggio in fase solida, gli organismi esposti.

Jha *et al.* (1996) hanno messo a punto un saggio di genotossicità usando gli stadi embrionali e larvali della specie *Platynereis dumerilii* (segnalato in Grecia ma presente anche in Italia).

Il saggio di mortalità a 10 giorni con *Arenicola marina* è stato utilizzato in Spagna per la caratterizzazione di materiali di dragaggio (Casado-Martinez *et al.*, 2007).

Sulla base di questa review, vengono proposti per i policheti saggi con *H. diversicolor* per due endpoint, la mortalità (ASTM, 2007; Mayor *et al.*, 2008) e la genotossicità. In particolare la perdita di integrità strutturale del DNA può essere valutata tramite due test eseguiti sulle cellule celomocitiche di *H. diversicolor*: il comet assay (Machella *et al.*, 2006), e la frequenza dei micronuclei (Venier *et al.*, 1997), sulla base delle procedure sviluppate per *M. galloprovincialis*.

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica può essere valutata come da Tabella 3.20.

Tab. 3.20. Valenze scientifiche dei saggi con *Hediste diversicolor*.

	Durata	Sep	RSeco	DG	RES	Totale
<i>Hediste diversicolor</i> (mortalità)	10 gg	2	2	2	1	7
<i>Hediste diversicolor</i> (genotossicità)	10 gg	1	2	2	4	9

Tab. 3.21. Valenze pratiche dei saggi con *Hediste diversicolor*.

	Durata	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Hediste diversi color</i> (mortalità)	10 gg	5	2	5	4	3	19
<i>Hediste diversicolor</i> (genotossicità)	10 gg	5	1	2	2	1	11

3.9 - Pesci

L'indicazione di utilizzare i pesci nelle procedure ecotossicologiche per la valutazione della qualità delle acque è chiaramente espressa nelle attuali normative comunitarie (Water Framework Directive 2000/60/CE) e nazionali (D.D. 23/12/2002; D.L.vo 152/2006). Esse riportano di misurare la tossicità acquatica attraverso saggi di tossicità acuta e cronica effettuati su una batteria che comprenda organismi appartenenti a 3 differenti livelli trofici: alghe e/o macrofite; *Dafnia* per le acque dolci o organismi rappresentativi la acque marine; pesci. Inoltre i pesci sono anche presi in considerazione dalla complessa normativa UE relativa alla registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che l'Italia ha recepito dal 1° giugno 2007. Nella parte C di tale normativa (metodi per la determinazione dell'ecotossicità) sono riportati i metodi di tossicità acuta su stadi embrionali e larvali con sacco vitellino, e saggi di bioconcentrazione sui pesci.

In tutte queste norme i pesci sono assunti come rappresentanti di un livello apicale della piramide trofica (consumatori secondari) e come unici rappresentanti dei vertebrati. Pertanto la loro presenza nelle batterie di saggi permette di fornire una risposta completa di tutto il comparto biotico acquatico e tutelare la salute umana in quanto costituiscono l'anello di collegamento diretto nella catena alimentare dell'uomo.

Sebbene i saggi possano essere condotti su molte specie ittiche, quelle consigliate dall'OECD per saggi standard a livello internazionale sono esclusivamente d'acqua dolce. Per valutare la tossicità di acque marine e salmastre, USEPA ha individuato due specie eurialine alloctone (*Menidia berillina* e *Cyprinodon variegatus*), mentre OSPAR prevede l'utilizzo del rombo *Scophthalmus maximus*.

In Italia, alcune di queste specie sono state saggiate con successo ai fini dell'esecuzione di saggi di tossicità a breve e lungo termine. Il limite principale di tali applicazioni è rappresentato dal fatto che si tratta, essenzialmente, di specie dulciacquicole (*Oncorhynchus mykiss*) o specie marine non autoctone (*Cyprinodon variegatus*).

Allo scopo di individuare specie endemiche del Mar Mediterraneo negli ultimi anni sono state condotte indagini sulla spigola *Dicentrarchus labrax* (Roncarati *et al.*, 2001; Gelli *et al.*, 2003a, 2003b; Savorelli *et al.*, 2003; Gelli *et al.*, 2004; Gelli *et al.*, 2005a, 2005b; Mariani *et al.*, 2005; 2006; 2007) e sull'orata *Sparus aurata* (Masini *et al.*, 2007; Mariani e Savorelli, 2005), per le quali esistono impianti di riproduzione diffusi sull'intero territorio nazionale ed in grado di fornire stadi larvali e giovanili per gran parte dell'anno. L'assenza di protocolli UNI o ISO su tali specie mediterranee ha sinora comportato la progressiva messa a punto di metodiche specifiche a partire dall'adattamento di protocolli approvati per altre specie (OECD n. 204, 1984; OECD n. 203, 1992) ed un limitato utilizzo dei pesci nelle batterie.

Le specie autoctone prese in esame dal Gruppo di Lavoro ad *hoc* Pesci sono la spigola (*Dicentrarchus labrax* L.), l'orata (*Sparus aurata* L.), ed il rombo chiodato (*Scophthalmus maximus*). Per

quest'ultima specie esistono numerosi studi e protocolli standardizzati (OSPAR, 2005) e viene diffusamente impiegata come specie-test in molti paesi europei, presso i quali esistono allevamenti specifici. Pertanto è stata presa in considerazione per promuoverne l'utilizzo anche nel nostro paese e trattandosi di un organismo bentonico, il rombo potrebbe rivestire un certo interesse per l'esecuzione di saggi su sedimento (saggio tipo D).

In conclusione le specie mediterranee a cui attualmente riferire i saggi nelle batterie sono le due maggiormente diffuse e fruibili: *Dicentrarchus labrax* (spigola) e *Sparus aurata* (orata), sulle quali sono state condotte un maggior numero di applicazioni in abito nazionale. In dettaglio, si indica di includerle nei saggi di tipo **H**, e saggi raccomandati per gli obiettivi **a-a₁**, **b** e **d-d₂** (itticoltura), mentre gli altri obiettivi sono consigliati o indicati per approfondimenti. L'obiettivo **e** è perseguibile eseguendo saggi con *Scophthalmus maximus* nei saggi tipo **E**, trattandosi dell'unica specie autoctona bentonica al momento idonea.

Sulla base della review precedente, vengono proposti per l'inclusione nelle batterie, per saggi di tipo H (con acqua sovranatante o interstiziale, organismi non bentonici, senza fase solida):

1. il saggio con *Sparus aurata* o *Dicentrarchus labrax* a 4-14 gg con larve - giovanili, endpoint accrescimento, secondo il protocollo OECD 204, 1984;
2. il saggio con *Sparus aurata* a 48-96 h con larve - giovanili, endpoint mortalità (Masini *et al.*, 2007; Mariani e Savorelli, 2005);
3. il saggio con *Dicentrarchus labrax* a 48-96 h con giovanili, endpoint mortalità (Cicero *et al.*, 2004; Mariani e Savorelli, 2005; Mariani *et al.*, 2006);
4. il saggio con *Dicentrarchus labrax* a 48-96 h con larve, endpoint mortalità (Cicero *et al.*, 2004; Mariani *et al.*, 2004; Mariani *et al.*, 2007);
5. il saggio con *Dicentrarchus labrax* a 3-6-9 gg con giovanili, endpoint genotossicità (Gravato e Santos, 2003).

Inoltre, per saggi di tipo E (con acqua sovranatante o interstiziale e organismi bentonici, senza fase solida), il saggio con *Scophthalmus maximus* a 48-96 h con giovanili, endpoint mortalità (OSPAR, 2005). In funzione dell'ambiente di studio RS_{eco} , assume il valore di 1 per acque di transizione, 4 per acque marine costiere

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, le valenze scientifiche e pratiche per i pesci sono riportate nelle tabelle 3.22 e 3.23, rispettivamente.

Tab. 3.22. Valenze scientifiche dei saggi con le specie ittiche proposte.

	Durata	Sep	RSeco	DG	RES	Totale
<i>Sparus aurata</i>	4-14 gg	3	2	2	2	9
<i>Sparus aurata</i>	48-96 h	1	2	2	1	6
<i>Dicentrarchus labrax</i>	4-14 gg	3	4	2	2	11
<i>Dicentrarchus labrax</i> (giovanili)	48-96 h	1	4	2	1	8
<i>Dicentrarchus labrax</i> (larve)	48-96 h	2	4	2	1	9
<i>Dicentrarchus labrax</i> (giovanili)	3-6-9 gg	1	4	2	4	11
<i>Scophthalmus maximus</i>	4-14 gg	3	2	2	2	9

Tab. 3.23. Valenze pratiche dei saggi con le specie ittiche proposte.

	Durata	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Sparus aurata</i>	4-14 gg	3	4	4	4	1	16
<i>Sparus aurata</i>	48-96 h	3	1	5	4	1	14
<i>Dicentrarchus labrax</i>	4-14 gg	3	4	4	4	1	16
<i>Dicentrarchus labrax</i> (giovani)	48-96 h	3	1	5	4	1	14
<i>Dicentrarchus labrax</i> (larve)	48-96 h	3	2	5	4	1	15
<i>Dicentrarchus labrax</i> (giovani)	3-6-9 gg	3	1	2	1	1	8
<i>Scophthalmus maximus</i>	48-96 h	3	3	5	4	1	16

3.10 - Conclusioni

Sulla base di quanto illustrato nei precedenti Capitolo, i saggi attualmente proponibili sono riassunti in tabella 3.24.

Risulta quindi evidente che, mentre esiste una ampia scelta per i saggi di tipo **C** e **H**, solo il saggio con *Corophium orientale* a 10 giorni e, limitatamente agli ambienti di transizione, quello con *Hediste diversicolor*, sono proponibili per i saggi di tipo **A** (con sedimento intero ed organismi bentonici). Chiaramente, qualsiasi batteria che includa un saggio di tipo A sembrerebbe dunque automaticamente penalizzata dalla lunghezza di questi saggi. Inoltre, potrebbero sussistere problemi di reperibilità per *C. orientale*; pertanto, vista l'affinità con *C. volutator*, si suggerisce di verificare la possibilità di allestire allevamenti di *C. orientale*, secondo quanto proposto da Peters e Ahlf (2005).

Per il saggio di tipo **B** (sedimento intero e organismi non bentonici) sono proponibili solo due saggi: quello con *Vibrio fischeri* e quello con *Amphibalanus amphitrite*.

Tab. 3.24 – Sintesi dei saggi proponibili (quando la valenza riporta un doppio valore, si rimanda al testo ed alla specifica tabella di valutazione per il saggio indicato).

Tipo	Organismo	Durata test	Endpoint	Obiettivo	Valenza scientifica	Valenza pratica
A	<i>Corophium orientale</i>	10 gg	Mortalità	a, e	11,5/8,5	14
	<i>Corophium orientale</i>	28 gg	Mortalità	a, e	11,5/8,5	13
	<i>Hediste diversicolor</i>	10 gg	Mortalità	a, b, e ₁ , e ₃	7	19
	<i>Hediste diversicolor</i>	10 gg	Genotossicità	a, b, e ₁ , e ₃	9	11
B	<i>Vibrio fischeri</i>	5, 15, 30 min	Bioluminescenza	a, b, d, e ₁	10,5	21,5
	<i>Amphibalanus amphitrite</i>	24/48 h	Immobilizzazione	a, b, d, e	10/9	17
C	<i>Vibrio fischeri</i>	5, 15, 30 min	Biolumin.	e ₂ , e ₃	10,5	21,5
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	72 h	Crescita		11	18
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	72 h	Crescita		10	15
	<i>Brachionus plicatilis</i>	(24) 48 h	Mortalità	b, d ₁ , d ₂ , e ₁	9	17
	<i>Acartia tonsa</i>	24/48 h	Mortalità	a, b, d, e	10/7	16
	<i>Acartia tonsa</i>	7 gg	Sviluppo	a, b, d, e	12/9	13
	<i>Artemia</i>	24 h	Mortalità	a, b, e	6	20
	<i>Artemia</i>	14 gg	Mortalità	a, b, e	8	17

	<i>Tigriopus fulvus</i>	96 h	Mortalità	a, b, e	8/5	16
	<i>Tigriopus fulvus</i>	96 h	Mute	a, b, e	9/6	17
	<i>Crassostrea gigas</i>	24 h	Embriotoss.	a, b, e	10	12
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	48 h	Embriotoss.	a	11	13
	<i>Paracentrotus lividus</i>	1 h	Fecondazione	a, b, e	11	12
	<i>Paracentrotus lividus</i>	72 h	Embriotoss.	a, b, e	10	9
D	Nessun saggio identificato					
E	<i>Scopthalmus maximus</i>	48-96 h	Mortalità	e ₁ , e ₃	7/10	16
	<i>Corophium orientale</i>	96 h	Mortalità	e ₁ , e ₃	11,5/8,5	
F	<i>Vibrio fischeri</i>	5, 15, 30 min	Biolumin.		10,5	21,5
G	Nessun saggio identificato					
H	<i>Vibrio fischeri</i>	5, 15, 30 min	Biolumin.		10,5	21,5
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	72 h	Crescita		11	18
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	72 h	Crescita		10	15
	<i>Brachionus plicatilis</i>	(24) 48 h	Mortalità	b, d ₁ , d ₂ , e ₁	9	17
	<i>Acartia tonsa</i>	24/48 h	Mortalità	a, b, d, e	10	16
	<i>Acartia tonsa</i>	7 gg	Sviluppo	a, b, d, e	12	13
	<i>Artemia franciscana</i>	24 h	Mortalità	a, b, e	6	20
	<i>Artemia franciscana</i>	14 gg	Mortalità	a, b, e	8	17
	<i>Tigriopus fulvus</i>	96 h	Mortalità		8	16
	<i>Tigriopus fulvus</i>	96 h	Mute		9	17
	<i>Amphibalanus amphitrite</i>	24/48 h	Immobilizz.	a, b, d, e	10	17
	<i>Crassostrea gigas</i>	24 h	Embriotoss.	a, b, e	10	12
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	48 h	Embriotoss.	a	11	13
	<i>Paracentrotus lividus</i>	1 h	Fecondazione	a, b, e	11	12
	<i>Paracentrotus lividus</i>	72 h	Embriotoss.	a, b, e	10	9
	<i>Sparus aurata</i>	4-14 gg	Accrescimento	a, a1, b, d, d2	9	16
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	4-14 gg	Accrescimento	a, a1, b, d, d2	11	16
	<i>Sparus aurata</i>	48-96 h	Mortalità	a, a1, b, d, d2	6	14
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	48-96 h	Mortalità	a, a1, b, d, d2	9	15
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	3-6-9 gg	Genotossicità	a, a1, b, d, d2	11	8

CAPITOLO 4: COMPOSIZIONE E VALUTAZIONE DELLE BATTERIE

Sulla base dei fattori di ponderazione attribuiti ai singoli saggi ecotossicologici basati su organismi appartenenti a diversi livelli trofici (Capitolo 3), è stato possibile applicare il metodo descritto nel Capitolo 2 per valutare obiettivamente la valenza scientifica e pratica delle batterie che teoricamente possono essere costituite per uno studio dei sedimenti delle acque di transizione e marine costiere.

Nel seguito, verranno quindi ipotizzate e confrontate diverse tipologie di batterie, ciascuna delle quali composte da un minimo di 3 saggi ecotossicologici, per ciascuno delle applicazioni possibili, identificate nel Capitolo 1.

Le combinazioni illustrate rappresentano solo alcune di quelle possibili, scelte in modo tale da massimizzare la varietà di organismi ed endpoint. Quando, per lo stesso tipo di saggio, esistono delle alternative, generalmente viene preferito il saggio con il punteggio più elevato di valenza ecologica e/o pratica.

4.1 - Dragaggi

Le batterie teoricamente proponibili in funzione della rilevanza di ciascun saggio, degli ambienti (esclusi ovviamente gli ambienti **A1** e **B1**, substrati duri) e degli obiettivi, potrebbero essere le seguenti.

Per ambienti **B2** (sabbia - ghiaia), **B3, 4** (acque costiere, substrato fangoso o sedimenti misti) e obiettivo **e₁** (effetti sul sito dragato):

- saggio Tipo **A** (con sedimento intero e organismi bentonici);
- saggio Tipo **B** (con sedimento intero e organismi non bentonici);
- saggio Tipo **H** (con acqua sovrantante o interstiziale e organismi non bentonici).

Per gli obiettivi **e₁**, effetti sul sito dragato, **e₂** e **e₃**, smaltimento rispettivamente a terra e in mare aperto di sedimento dragato da ambienti **B2, B3, B4**, sono da prevedere anche saggi di Tipo **C**, con e-lutriati (o estratti) da sedimento intero e organismi non bentonici.

Per gli ambienti di transizione **A2, 3, 4** si applicano le stesse batterie dei corrispondenti ambienti **B**, con l'accorgimento di preferire organismi in grado di tollerare le variazioni di salinità.

4.1.1 Batterie proposte

In definitiva per ambienti costieri e di transizione e lo specifico obiettivo dei dragaggi vengono proposte le batterie da 1 a 17.

Batteria N. 1			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Amphibalanus amphitrite</i> a 24/48 h	immobilità	PrMU 2245: 2010
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006 (mod.)
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Valenza ecologica	57,3 %		
Valenza pratica	75,5 %		
Valenza scientifico – pratica	66,4 %		

Batteria N. 2			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006 (mod.)
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Valenza ecologica	51,6 %		
Valenza pratica	78,6 %		
Valenza scientifico – pratica	65,1 %		

Batteria N. 3			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006 (mod.)
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Brachionus plicatilis</i> a 48 h	mortalità	ASTM E 1440: 1991 rev. 1998
Valenza ecologica	56,5 %		
Valenza pratica	76,3 %		
Valenza scientifico – pratica	66,4 %		

Batteria N. 4			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Hediste diversicolor</i> a 10 giorni	mortalità	Mugnai <i>et al.</i> , 2007
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Amphibalanus amphitrite</i> a 24/48 h	immobilità	PrMU 2245: 2010
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006 (mod.)
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Valenza ecologica	52,7 %		
Valenza pratica	76,3 %		
Valenza scientifico – pratica	64,5 %		

Batteria N. 5			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Hediste diversicolor</i> a 10 giorni	genotossicità	Machella <i>et al.</i> , 2006; Venier <i>et al.</i> , 1997
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Amphibalanus amphitrite</i> a 24/48 h	immobilità	PrMU 2245: 2010
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006 (mod.)
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Valenza ecologica	55,2 %		
Valenza pratica	70,1 %		
Valenza scientifico – pratica	62,7 %		

Nessuno dei saggi proposti in alternativa per i saggi di tipo **C** migliora la valenza delle batterie.

Per gli ambienti marini costieri, la batteria N. 3 potrebbe eventualmente essere modificata come nella batteria n. 6.

Batteria N. 6			
Ambienti marini costieri			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Brachionus plicatilis</i> a 48 h	mortalità	ASTM E 1440: 1991 rev. 1998
Valenza ecologica	57,5 %		
Valenza pratica	79,3 %		
Valenza scientifico – pratica	68,2 %		

Gli anfipodi non sono adatti per substrati sabbiosi, quindi per i saggi di tipo **A** in Ambienti **B2** (sabbia - ghiaia) potrebbero dover essere sostituiti da un saggio con policheti.

Batteria N. 7			
Ambienti marini costieri			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Hediste diversicolor</i> a 10 giorni	mortalità	Mugnai <i>et al.</i> , 2007
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Amphibalanus amphitrite</i> a 24/48 h	immobilità	PrMU 2245: 2010
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Valenza ecologica	53,6 %		
Valenza pratica	79,0 %		
Valenza scientifico – pratica	66,3 %		

Batteria N. 8			
Ambienti marini costieri			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Hediste diversicolor</i> a 10 giorni	genotossicità	Machella <i>et al.</i> , 2006; Venier <i>et al.</i> , 1997
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Amphibalanus amphitrite</i> a 24/48 h	immobilità	PrMU 2245: 2010
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Valenza ecologica	56,1 %		
Valenza pratica	72,8 %		
Valenza scientifico – pratica	64,34 %		

Per eventuali approfondimenti, potrebbero poi essere aggiunti saggi specifici

Batteria N. 9			
Ambienti marini costieri			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Brachionus plicatilis</i> a 48 h	mortalità	ASTM E 1440: 1991 rev. 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Paracentrotus lividus</i> a 1 h	fecondazione	Lera <i>et al.</i> , 2006
Valenza ecologica	57,2 %		
Valenza pratica	73,9 %		
Valenza scientifico – pratica	65,6 %		

Batteria N. 10			
Ambienti marini costieri			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Brachionus plicatilis</i> a 48 h	mortalità	ASTM E 1440: 1991 rev. 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dicentrarchus labrax</i> a 3-6-9 gg	genotossicità	Gravato e Santos, 2003
Valenza ecologica	57,2 %		
Valenza pratica	71,1 %		
Valenza scientifico – pratica	64,1 %		

Batteria N. 11			
Ambienti marini costieri			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Brachionus plicatilis</i> a 48 h	mortalità	ASTM E 1440: 1991 rev. 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Paracentrotus lividus</i> a 1 h	fecondazione	Lera <i>et al.</i> , 2006
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dicentrarchus labrax</i> a 3-6-9 gg,	genotossicità	Gravato e Santos, 2003
Valenza ecologica	57,3 %		
Valenza pratica	68,2 %		
Valenza scientifico – pratica	62,7 %		

Batteria N. 12			
Ambienti marini costieri			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Hediste diversicolor</i> a 10 giorni	mortalità	Mugnai <i>et al.</i> , 2007
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Brachionus plicatilis</i> a 48 h	mortalità	ASTM E 1440: 1991 rev. 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Paracentrotus lividus</i> a 1 h	fecondazione	Lera <i>et al.</i> , 2006
Valenza ecologica	53,5 %		
Valenza pratica	74,6 %		
Valenza scientifico – pratica	64,1 %		

Batteria N. 13			
Ambienti marini costieri			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Hediste diversicolor</i> a 10 giorni	mortalità	Mugnai <i>et al.</i> , 2007
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Brachionus plicatilis</i> a 48 h	mortalità	ASTM E 1440: 1991 rev. 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dicentrarchus labrax</i> a 3-6-9 gg.	genotossicità	Gravato e Santos, 2003
Valenza ecologica	53,5 %		
Valenza pratica	71,8 %		
Valenza scientifico – pratica	62,7 %		

Batteria N. 14			
Ambienti marini costieri			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Hediste diversicolor</i> a 10 giorni	mortalità	Mugnai <i>et al.</i> , 2007
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Brachionus plicatilis</i> a 48 h	mortalità	ASTM E 1440: 1991 rev. 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Paracentrotus lividus</i> a 1 h	fecondazione	Lera <i>et al.</i> , 2006
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dicentrarchus labrax</i> a 3-6-9 gg,	genotossicità	Gravato <i>et al.</i> , 2003
Valenza ecologica	54,2 %		
Valenza pratica	68,8 %		
Valenza scientifico – pratica	61,5 %		

Batteria N. 15			
Ambienti marini costieri			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Hediste diversicolor</i> a 10 giorni	genotossicità	Machella <i>et al.</i> , 2006; Venier <i>et al.</i> , 1997
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Phaeodactylum tricorutum</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Brachionus plicatilis</i> a 48 h	mortalità	ASTM E 1440: 1991 rev. 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Paracentrotus lividus</i> a 1 h	fecondazione	Lera <i>et al.</i> , 2006
Valenza ecologica	55,5 %		
Valenza pratica	69,6 %		
Valenza scientifico – pratica	62,6 %		

Batteria N. 16			
Ambienti marini costieri			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Hediste diversicolor</i> a 10 giorni	genotossicità	Machella <i>et al.</i> , 2006; Venier <i>et al.</i> , 1997
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Phaeodactylum tricorutum</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Brachionus plicatilis</i> a 48 h	mortalità	ASTM E 1440: 1991 rev. 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dicentrarchus labrax</i> a 3-6-9 gg,	genotossicità	Gravato e Santos, 2003
Valenza ecologica	55,5 %		
Valenza pratica	66,8 %		
Valenza scientifico – pratica	61,2 %		

Batteria N. 17			
Ambienti marini costieri			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Hediste diversicolor</i> a 10 giorni	genotossicità	Machella <i>et al.</i> , 2006; Venier <i>et al.</i> , 1997
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Phaeodactylum tricorutum</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Brachionus plicatilis</i> a 48 h	mortalità	ASTM E 1440: 1991 rev. 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Paracentrotus lividus</i> a 1 h	fecondazione	Lera <i>et al.</i> , 2006
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dicentrarchus labrax</i> a 3-6-9 gg.	genotossicità	Gravato e Santos, 2003
Valenza ecologica	55,9 %		
Valenza pratica	64,6 %		
Valenza scientifico – pratica	60,2 %		

4.2 - Effluenti e ambienti recettori

Per acque salmastre (**A1, 2, 3, 4**) o salate (recettore **B1, 2, 3, 4** o scarichi salati), la batteria dovrebbe prevedere:

- saggi di Tipo **H**, acqua sovrantante;
- saggi di Tipo **A** con sedimento del recettore e organismi bentonici
- saggi di Tipo **B** con sedimento del recettore e organismi non bentonici

Ovviamente, le batterie per acque salmastre possono differire da quelle per acque salate perché gli organismi devono poter tollerare ampie variazioni nella salinità.

Altri saggi, raccomandati per approfondimenti, sono quelli:

- di tipo **H**, con acqua interstiziale del recettore e organismi non bentonici, senza fase solida.
- di tipo **C** con elutriati (o estratti) da sedimento intero dell'immissario (o solidi sospesi dello scarico) e organismi bentonici o non bentonici, per ipotizzare l'effetto di un rilascio di tossici dopo immissione del materiale solido sospeso nel recettore.

4.2.1 – Batterie proposte

Batterie minimali con soli tre saggi per ambienti di transizione potrebbero essere quelle da 18 a 20.

Batteria N. 18			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006 (mod.)
Valenza ecologica	59,0 %		
Valenza pratica	76,8 %		
Valenza scientifico – pratica	67,9 %		

Batteria N. 19			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Hediste diversicolor</i> a 10 giorni	mortalità	Mugnai <i>et al.</i> , 2007
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006 (mod.)
Valenza ecologica	51,9 %		
Valenza pratica	78,0 %		
Valenza scientifico – pratica	65,0 %		

Batteria N. 20			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Hediste diversicolor</i> a 10 giorni	genotossicità	Machella <i>et al.</i> , 2006; Venier <i>et al.</i> , 1997
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006 (mod.)
Valenza ecologica	55,8 %		
Valenza pratica	72,0 %		
Valenza scientifico – pratica	63,9 %		

Per ambienti marini costieri, le stesse batterie possono essere modificate sostituendo l'alga (batterie n. 21 – 23).

Batteria N. 21			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Phaeodactylum tricornerum</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Valenza ecologica	68,0 %		
Valenza pratica	80,4 %		
Valenza scientifico – pratica	74,2 %		

Batteria N. 22			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Hediste diversicolor</i> a 10 giorni	mortalità	Mugnai <i>et al.</i> , 2007
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Phaeodactylum tricor- nutum</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Valenza ecologica	53,2 %		
Valenza pratica	81,6 %		
Valenza scientifico – pratica	67,4 %		

Batteria N. 23			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Hediste diversicolor</i> a 10 giorni	genotossicità	Machella <i>et al.</i> , 2006; Venier <i>et al.</i> , 1997
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Phaeodactylum tricor- nutum</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Valenza ecologica	57,1 %		
Valenza pratica	75,6 %		
Valenza scientifico – pratica	66,3 %		

Invece, batterie un po' più complesse prevederebbero l'aggiunta di 1/2 saggi (batterie 24-31).

Batteria N. 24			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006 (mod.)
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Acartia tonsia</i> a 7 gg	sviluppo	PrMU 2366, 2010
Valenza ecologica	57,3 %		
Valenza pratica	71,9 %		
Valenza scientifico – pratica	64,6 %		

Batteria N. 25			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006 (mod.)
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Crassostrea gigas</i> a 24 h	embriotossità	ASTM (2004)
Valenza ecologica	54,8 %		
Valenza pratica	70,1 %		
Valenza scientifico – pratica	62,5 %		

Batteria N. 26			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006 (mod.)
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Brachionus plicatilis</i> A 48 h	mortalità	ASTM E 1440: 1991 rev. 1998
Valenza ecologica	54,0 %		
Valenza pratica	74,6 %		
Valenza scientifico – pratica	64,3 %		

Batteria N. 27			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006 (mod.)
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Paracentrotus lividus</i> A 1 h	fecondazione	Lera <i>et al.</i> , 2006
Valenza ecologica	55,6 %		
Valenza pratica	70,1 %		
Valenza scientifico – pratica	62,9 %		

Batteria N. 28			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006 (mod.)
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Sparus aurata</i> a 4-14 gg	accrescimento	OECD 204: 1984
Valenza ecologica	58,1 %		
Valenza pratica	76,3 %		
Valenza scientifico – pratica	67,2 %		

Batteria N. 29			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Sparus aurata</i> a 4-14 gg	accrescimento	OECD 204: 1984
Valenza ecologica	54,8 %		
Valenza pratica	73,7 %		
Valenza scientifico – pratica	64,2 %		

Batteria N. 30			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006 (mod.)
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Acartia tonsia</i> a 7 gg	sviluppo	PrMU 2366, 2010
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Crassostrea gigas</i> a 24 h	embriotossità	ASTM (2004)
Valenza ecologica	55,9 %		
Valenza pratica	67,5 %		
Valenza scientifico – pratica	61,7 %		

Batteria N. 31			
Ambienti di transizione			
Saggio	Specie	Endpoint	Protocollo
Tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici)	<i>Corophium orientale</i> a 10 giorni	mortalità	ISO 16712: 2005
Tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> a 72 h	crescita	UNI EN ISO 10253: 2006 (mod.)
Tipo H (con acqua interstiziale e organismi non bentonici)	<i>Sparus aurata</i> a 4-14 gg	accrescimento	OECD 204: 1984
Tipo C (con elutriati da sedimento intero e organismi non bentonici)	<i>Crassostrea gigas</i> a 24 h	embriotossità	ASTM (2004)
Valenza ecologica	56,5 %		
Valenza pratica	71,1 %		
Valenza scientifico – pratica	63,8 %		

Per le batterie da 24 a 31, è possibile sostituire il saggio di tipo **A** con *Corophium orientale* con quello con *Hediste diversicolor* (mortalità o genotossicità).

Per ambienti marini costieri, le batterie da 24 a 31 prevedono la sostituzione della *Dunaliella tertiolecta* con *Phaeodactylum tricorutum* (con conseguenti modeste variazioni delle valenze, poiché il fattore SP, standardizzazione del protocollo, aumenta da 1 a 4).

4.3 - Monitoraggio ambientale

In ambienti con substrato duro (**A1** e **B1**) ovviamente è prioritario il comparto **I** (acqua) e sono richiesti saggi di Tipo **H** (con acqua sovrantante, organismi non bentonici).

Per gli ambienti con substrati non duri **A2, 3, 4** e **B2, 3, 4** (sabbiosi, fangosi e misti), ovviamente sono prioritari i comparti **I** (acqua) e **IV** (sedimento). Raccomandato per approfondimenti il comparto **II** (acqua interstiziale). Sono quindi necessari saggi di tipo **H, A, B**.

Considerando che la maggior parte degli studi di routine dovranno essere effettuati per questo obiettivo e che quindi le batterie proponibili dovrebbero minimizzare il numero di saggi previsti, nel monitoraggio ambientale in generale sono quindi prioritarie le batterie 18 – 19 - 20 (transizione) e 21 – 22 - 23 (acque marine costiere), che prevedono solo 3 saggi ciascuna e si differenziano per il saggio di tipo **A** (*Corophium orientale* o *Hediste diversicolor*) e per la specie di alga utilizzata nel saggio di tipo **H**. Le loro varianti, esaminate per gli effluenti ed ambienti recettori, consentirebbero poi eventuali ulteriori approfondimenti.

4.4 - Conclusioni

Sono state identificate alcune batterie possibili, differenziate per ambienti e obiettivi, che comprendono saggi prioritari e test raccomandati per approfondimenti.

Complessivamente, le batterie che sembrano rappresentare un ragionevole compromesso tra scientificità e praticità sono le 3 – 4 – 5 per gli ambienti di transizione e le 6 – 7 - 8 per le acque marine costiere, che prevedono 4 saggi con 4 organismi diversi, 3 endpoint e 3 livelli trofici. Uno solo dei saggi (con *Corophium orientale* o con *Hediste diversicolor*) prevede una durata superiore ai 3 giorni.

Sono state inoltre identificate numerose altre batterie, specifiche per ambienti ed obiettivi, che dovrebbero rispondere ad eventuali esigenze di approfondimento.

Ovviamente, per scopi particolari, sono però utilizzabili, in aggiunta o sostituzione di alcuni dei saggi qui proposti, anche quelli discussi nel Capitolo 3 (organismi).

A questo proposito va sottolineato che, tra i saggi menzionati nel Capitolo 3, alcuni sono in via di standardizzazione. È quindi prevedibile che, in futuro, alcuni di questi possano rimpiazzare o affiancare i saggi attualmente inseriti nelle batterie, se in tal modo dovesse significativamente migliorare la valenza scientifica e/o pratica delle batterie proposte.

CAPITOLO 5: SCALE DI TOSSICITÀ E INDICI INTEGRATI

Nel presente Capitolo viene esplorata la possibilità di stabilire una scala di tossicità da applicare ai saggi ecotossicologici che compongono una batteria, indipendentemente dal loro numero e tipo, formulando, se possibile, un indice sintetico che cumuli i giudizi indipendentemente espressi sulla base dei singoli saggi di ecotossicità che compongono una batteria.

Innanzitutto, va ricordato che il Decreto Legislativo 152 del 3 aprile 2006, predisposto dal Ministro dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e recante *Norme in materia ambientale*, nell'Allegato 5 (*Limiti di emissione degli scarichi idrici*) alla parte Terza, *Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e di gestione delle risorse idriche*, dispone che per la valutazione dello stato ecologico sono obbligatori i saggi di tossicità acuta e che "in caso di esecuzione di più test di tossicità si consideri il caso peggiore". Il rilevamento di tossicità non è sanzionabile, ma comporta l'obbligo di approfondimento dell'indagine, di ricerca delle cause e della loro rimozione.

La classificazione degli elementi biologici, della qualità idromorfologica e della qualità fisico-chimica è basata su una descrizione qualitativa. Lo stato chimico è definito in base alla media aritmetica annuale delle concentrazioni delle sostanze pericolose, confrontate con apposite tabelle di valori limite. La valutazione complessiva dello stato ecologico delle acque superficiali è basata sul più basso dei valori riscontrati durante il monitoraggio biologico e fisico-chimico e si esprime su una scala cromatica (5 classi).

L'approccio ha due ovvie limitazioni: la prima, la soggettività delle classificazioni, basate su un criterio narrativo; la seconda, la scelta automatica del caso peggiore, che è estremamente conservativa e non consente nemmeno un giudizio esperto basato sul "weight of evidence" (ponderazione basata sull'importanza relativa delle componenti che concorrono alla formulazione del giudizio complessivo).

Sarebbe invece auspicabile sviluppare un indice che consenta di integrare le informazioni ottenute con i singoli saggi, tenendo conto del tipo di tossicità rilevata, e che permetta di mediare tra risultati a volte anche contraddittori.

Senza entrare nel merito della combinazione dei tre tipi di giudizi (biologico, idromorfologico e fisico-chimico), nel seguito si discute invece una proposta di scale ed indici, limitatamente ai saggi di tossicità.

5.1 - Scale

Nel Rapporto RTI CTN_AIM 4./2001 *Elementi per la caratterizzazione fisicochimica biologica ed ecotossicologica dei parametri addizionali (D.Lgs. 152/99) nella matrice acquosa, nel sedimento e nel biota*, si richiama l'espressione della tossicità come EC50 e come TI (Indice di Tossicità), espresso come $100/EC50 = U.T.$ (Unità Tossiche).

Il Dutch Institute for Inland Water and Waste Water Treatment, nell'elaborazione della TEM methodology ("Totale Effluent Milieuhygiene" o "Whole Effluent Environmental Risk"), ha previsto che vengano distinti due tipi di unità tossiche:

1. TU_a, unità tossica acuta, che per uno scarico è $TU_a = 100/LC50$
2. TU_c, unità tossica cronica, $TU_c = 100/NOEC$

Il Rapporto RTI CTN_AIM 4./2001 propone di stabilire una scala di tossicità basata sull'EC50 (concentrazione efficace per il 50 % degli organismi esposti) per identificare 5 classi (perché il D.Lgs

152/99, il D.Lgs 258/00 ed il D.Lgs 152/2006 prevedono la divisione dei corpi idrici in cinque classi di qualità ambientale).

A titolo di esempio viene poi indicata la scala di tossicità utilizzata dai Laboratori dell'ARPAL con *Daphnia magna* (Tab. 5.1). Non viene indicato, tuttavia, come combinare i risultati di più test.

Le linee guida ARPAL (2004) CTN – AIM *Monitoraggio dei sedimenti e delle biocenosi marine. Raccolta, adeguamento ed integrazione delle informazioni* riportano scale simili dell'EC50 per effluenti, acque interstiziali o sedimenti. Ammette però anche formulazione di un “giudizio relativo”, per confronto con un campione di riferimento. Se viene utilizzata una batteria di test, è previsto un giudizio “pesato” ed integrato: ma non viene fornita alcuna esemplificazione.

Tab. 5.1 – Scala di tossicità utilizzata dai Laboratori dell'ARPAL con *Daphnia magna*.

Immobilizzazione % del campione tal quale	EC50	U.T.	Giudizio di tossicità
< 20%		0	Assenza di tossicità acuta
≥20<50		<1	Debolmente tossico
≥ 50%	100-10	1-10	Tossico
>50%	<10-1	11-100	Molto tossico
>50%	<1	>100	Estremamente tossico

Ahlf e Heise (2005) hanno utilizzato per sedimenti (di acqua dolce) una batteria di 5 test, usando come endpoint la percentuale di inibizione rispetto al controllo, e propongono la seguente classificazione:

- **Classe 1:** nessun test presenta una risposta;
- **Classe 2:** almeno 1 test presenta una bassa risposta, nessun test presenta una risposta moderata o superiore;
- **Classe 3:** almeno 1 test presenta una risposta moderata, nessun test presenta una risposta più elevata;
- **Classe 4:** 1 test presenta una risposta elevata, oppure 3 test presentano una risposta almeno moderata;
- **Classe 5:** almeno 2 test presentano una risposta elevata, oppure 4 o più test presentano almeno una moderata tossicità.

Per ciascun test viene fissata (arbitrariamente) la percentuale di inibizione per risposta bassa o nulla; moderata; forte. Le percentuali così stabilite possono essere anche molto diverse, per test ed organismi differenti, perché riflettono la diversa sensibilità e rilevanza dei diversi test (giudizio esperto).

La differenza è invece probabilmente più contenuta, per lo stesso test ed organismo, anche se applicata da diversi Autori in ambienti differenti. Nel caso dei test con anfipodi, ad esempio, Stronkhorst *et al.* (2003) indicano che la letteratura indica consistentemente che, per classificare il sedimento come “tossico”, la percentuale di mortalità, normalizzata rispetto al controllo negativo, deve essere maggiore del 20 – 24 %.

L'indice Potential Ecotoxic Effects Probe (PEEP), per gli effluenti del St. Lawrence River Basin (Costan *et al.*, 1992), prevede che i risultati dei test vengano espressi come Threshold Effect Concentrations (TEC), Concentrazioni Soglia di Effetto, cioè come media geometrica tra la concentrazione

più bassa in una serie di diluizioni dello scarico alla quale si osservano effetti avversi sugli organismi (Lowest Observed Effects Concentration, LOEC) e la concentrazione più alta dello scarico che non produce effetto (NOEC).

Esempio:

NOEC = diluizione 12,5 % dello scarico,

LOEC = 25 %; TEC = $(25 \times 12,5)^{1/2} = 17,7 \%$

La TEC dovrebbe stimare quando si inizia ad avere tossicità.

Le TEC vengono trasformate in unità tossiche TU = 100/TEC e addizionate con la formula:

$$P = \log_{10} \left[1 + n \left(\frac{\sum_{i=1}^N T_i}{N} \right) Q \right]$$

dove:

P = valore dell'indice PEEP

n = numero degli endpoint nei test che esibiscono risposta tossica

N = numero massimo possibile di risposte tossiche = endpoint

T_i = Unità tossiche di un dato endpoint

Q = portata dello scarico in m³/h.

Nell'applicazione originale, gli scarichi erano sottoposti a 4 test, con un totale di 6 endpoint (2 test con doppio endpoint), e ad altri 3 test, con 4 endpoint, dopo "biodegradazione" (incubazione per 5 giorni dopo inoculo batterico) del campione. N è quindi pari a 10 (endpoint totali). La formula somma le TU per ciascun endpoint e divide per N per avere una "tossicità media" dello scarico. Questa tossicità media è moltiplicata per n per tener conto dell'ampiezza della risposta tossica e per la portata per calcolare il carico orario delle unità tossiche scaricate nel fiume. Si aggiunge 1 per poter effettuare la trasformazione logaritmica e si ottiene un valore solitamente compreso tra 0 e 10.

L'indice ovviamente può sovra- o sottostimare la tossicità acuta e cronica, letale o subletale, la genotossicità, ecc., in funzione delle combinazioni di endpoint dei test utilizzati (Environment Canada, 1993). In alternativa, si potrebbe calcolare una media ponderata delle T_i, invece di una media aritmetica, o ancora meglio sostituire alle TU un punteggio (da 0 a 10), basato sul giudizio esperto che esprime forza e significato della tossicità.

Inoltre, la TEC richiede che sia calcolabile almeno la LOEC, su basi statistiche, e quindi è applicabile se il test prevede delle repliche alle varie diluizioni. In alternativa si possono utilizzare unità tossiche più convenzionali, basate su EC50. Vindimian *et al.* (1999), per una variante del PEEP, hanno preferito utilizzare gli EC10, più vicini alla NOEC.

Infine, Environment Canada (1993) non è d'accordo sulla trasformazione logaritmica, perché distorce le differenze tra i valori degli indici (passando ai logaritmi, si ha la differenza di 1 tra log 100 e log 1000, ma si ha differenza di 1 anche tra log 1000 e log 10000). Propone quindi un indice modificato:

$$P_1 = \left[(5 \sum TU_a) + \frac{(\sum TU_c)}{(5N_1 + N_2)} \right] Q$$

dove TU_a e TU_c sono le unità tossiche per endpoint acuti e cronici, N_1 e N_2 sono i numeri di endpoint acuti e cronici, e Q è la portata.

Il fattore di ponderazione per tossicità acuta e cronica è arbitrario, e qui viene utilizzato 5 perché la soglia degli effetti cronici solitamente inizia ad una concentrazione del tossico pari ad 1/5 della soglia di tossicità acuta (USEPA, 1991). Probabilmente sarebbero giustificati anche fattori più elevati.

Nell'indice proposto da Vindimian *et al.* (1999), i fattori di ponderazione vengono ricavati da una Analisi dei Componenti Principali per un set di dati relativi a una batteria di 6 test, con 9 endpoint, per scarichi di vario tipo.

Una seconda variazione dell'indice PEEP (Environment Canada, 1993) incorpora l'opinione esperta:

$$P_2 = \left[\frac{\sum TU_i}{N} \right] F_q$$

in questo caso TU_i sono i punteggi per ciascun endpoint, su una scala da 1 a 10; F_q è a sua volta un punteggio per la portata che dipende dal rapporto di diluizione, dalla lunghezza della zona di mescolamento e dalla sensibilità della regione. Questo indice non può essere calcolato dai tecnici che effettuano i test di tossicità, ma è migliore come indice sito specifico.

Bombardier e Bermingham (1999) si sono ispirati al PEEP per sviluppare SED-TOX, un indice specificatamente studiato per i sedimenti che tiene conto del livello trofico degli organismi utilizzati nei test di tossicità e delle vie di esposizione ai tossici (acqua o fase solida). Infatti, prende in considerazione 4 fasi, acqua interstiziale, estratti organici, sedimento umido e sedimento intero, ma può includere anche gli elutriati. Gli organismi dei test comprendono batteri, alghe, macrofite, pesci e invertebrati bentonici, epibentonici o pelagici.

Il calcolo prevede una conversione dei dati in Unità Tossiche (TU_{dw}) sul peso secco di sedimento e quindi del fattore di incremento tossico (*toxicity incremental factor* TIF):

$$TIF = TU_{dw} / DL$$

dove DL è il limite di rilevabilità.

Questi fattori servono per dare una classifica, secondo la scala:

- TIF = 0 non tossico;
- $1 < TIF < 10$ marginalmente tossico;
- $11 < TIF < 99$ moderatamente tossico;
- $TIF > 100$ altamente tossico.

Successivamente, i valori TIF di ciascun endpoint vengono ponderati per la fase, il numero di endpoint ed un fattore di sensibilità delle fasi (pari a 1 per tutte, tranne 0,1 per gli estratti), e divisi per la ridondanza (si considerano ridondanti i test sulla stessa combinazione di fasi). L'impronta tossica viene poi calcolata moltiplicando per il numero di risposte tossiche. Le classi di rischio per la risposta tossica sono: 0, nessun pericolo; 1-9, pericolo marginale; 10-99, pericolo moderato; > 99 pericolo elevato.

L'indice SED-TOX viene calcolato aggiungendo 1 e trasformando in logaritmo; i valori ottenuti indicano:

- $0 < SED-TOX < 1$ – tossicità marginale;
- $1 < SED-TOX < 2$ – tossicità moderata;
- $SED-TOX > 2$ – tossicità elevata.

La trasformazione in Unità Tossiche (e poi in TIF) è di chiara derivazione dall'uso di batterie sugli scarichi, con test su varie diluizioni e calcolo di ECx; al contrario, per i sedimenti molti test non prevedono diluizioni sequenziali, ma una prova diretta (acqua o sedimento tal quale) di confronto con un controllo.

L'indice prevede una complicata trasformazione in unità tossiche sul peso secco, resa necessaria solo dall'uso di "sedimento umido" e "sedimento intero", cioè due matrici che differiscono per la percentuale di acqua.

La pratica di utilizzare sedimento umido non ha motivazioni teoriche o scientifiche, ma è nata semplicemente per "recuperare" il campione di sedimento rimanente dopo l'estrazione dell'acqua interstiziale. In realtà, se interessa studiare il percorso di esposizione via acqua interstiziale, sarebbe opportuno utilizzare un saggio su questa matrice. Al contrario, se interessa il sedimento intero, sarà questa la matrice di elezione per il saggio. L'utilizzo di una matrice solida, già manipolata, dalla quale è stata estratta l'acqua interstiziale e che solitamente dovrebbe essere mescolata, o per lo meno messa a contatto con altra acqua, per l'esposizione di organismi acquatici, potrebbe ipoteticamente essere interessante solo nel caso di fanghi di depurazione che, dopo disidratazione per filtro-pressione, potrebbero essere smaltiti su campo e quindi reidratarsi con le acque piovane. Ma i per sedimenti acquatici una simile eventualità sembra estremamente improbabile.

Hartwell (1997) descrive un metodo per calcolare una scala di rischio tossicologico per una batteria di saggi di tossicità su acqua e sedimenti. Per calcolare il punteggio per un sito (o un campione), si usa un modello dove severità dell'effetto, grado della risposta, variabilità del test, consistenza tra test e numero di endpoint misurati, sono così combinati:

Punteggio del sito =

$$\frac{\sum [(severità)(\% risposta)(CV)] + \{consistenza\}}{\sqrt{N}}$$

Dove:

La *Severità della risposta* (severità) dipende dall'effetto misurato dall'endpoint. Hartwell (1997) usa mortalità = 3, ridotta fecondità = 2 e ridotta crescita = 1. Si possono usare anche altri endpoint, scegliendo il fattore più adatto per ciascuno.

Il *Grado della risposta (% risposta)*. È in percentuale rispetto al valore medio del controllo, indipendentemente dalla significatività statistica (es., 5 % mortalità, 45 % riduzione della crescita, ecc.). Si parte dal presupposto che anche impatti di basso livello possono avere significativi effetti a livello di popolazione se estesi su vaste aree per lunghi periodi.

Per test quali crescita o riproduzione, si calcola:

$$\% \text{ risposta} = 100 [(controllo - campione)/controllo]$$

Per la mortalità:

$$\% \text{ risposta} = 100 [(morti campione - morti controllo)/numero iniziale esposti]$$

Ai valori negativi si assegna un valore di 0.

La *Variabilità(CV)*. è il coefficiente di variazione CV (della % di risposta, perché ci sia consistenza dimensionale tra endpoint diversi) tra le repliche del campione, calcolata come 100 x (deviazione standard/media), ed esprime la variabilità specifica del test per quel campione, ma comprende anche la variabilità sperimentale del momento.

La Severità, la risposta e la variabilità sono caratteristiche del test per lo specifico campione.

La Consistenza e il numero di endpoint sono invece attributi sito-specifici.

La *consistenza* esprime il grado di accordo tra i vari endpoint: è alta se tutti i test concordano, ed è quindi alta anche la fiducia di poter identificare una situazione di rischio; la consistenza però diminuisce se i risultati sono contraddittori o conflittuali, e quindi diminuisce anche la fiducia di identificare correttamente il grado di rischio. Dopo alcune simulazioni, è stata prescelta la formula :

$$\text{Consistenza} = \left[\left(\frac{N}{2} \right) - X \right]^3$$

dove N è il numero totale di endpoint e X il numero di endpoint statisticamente non significativi ($P \geq 0,05$).

Quando i test tendono a essere non significativi, la funzione è negativa; se metà sono significativi e metà no, è pari a zero. Se più della metà sono significativi, la funzione è positiva. Poiché la consistenza è un parametro additivo, la sua funzione è quella di diminuire il punteggio di rischio se molti endpoint sono non significativi, ma di aumentarlo se più della metà sono significativi. Inoltre, nel modello la consistenza è divisa per \sqrt{N} : l'influenza sul punteggio di rischio deve essere maggiore con pochi endpoint (perché è maggiore l'incertezza), che con un numero maggiore di endpoint (maggiore fiducia).

La scala del rischio è ovviamente variabile in funzione del numero di endpoint e della loro severità. L'indice tiene anche conto di possibili dati mancanti: ad esempio, se nel confronto tra stazioni qualcuna di queste ha uno o due dati in meno (2 endpoint che per qualche motivo non sono stati misurati), il confronto con le stazioni con più dati non ha una grande distorsione (bias).

Per avere un punteggio semplice della tossicità si può usare la formula:

$$\text{Punteggio tossicità} = \frac{\{ \{ (\text{severità})(\% \text{ risposta}) \} \}}{\sqrt{N}}$$

Il punteggio di rischio e di tossicità possono essere calcolati separatamente per test con acqua, con sedimenti, e combinando assieme entrambi.

Nella letteratura scientifica è infine possibile trovare anche indici aggregati basati sulla "fuzzy set theory" (Liou *et al.*, 2003).

5.2 – Indice proposto

Viste le finalità eminentemente pratiche di questo documento, si è ritenuto sufficiente procedere ad una rielaborazione dell'approccio di Hartwell (1997), resa necessaria per superare certe limitazioni: ad esempio, per la % risposta Hartwell (1997) assegna un valore pari a zero ai valori negativi. Questa convenzione in realtà sottovaluta una eventuale informazione sulla biostimolazione (risposta del campione superiore che nel controllo negativo) che, nel caso del saggio algale, è una indicazione di potenziale eutrofizzante e, più in generale, il fenomeno ormetico, cioè una risposta superiore a quella del controllo negativo, può indicare condizioni di stress degli organismi come primo effetto dell'esposizione a contaminanti.

Quindi, nell'indice qui sviluppato, chiaramente derivato da quello di Hartwell (1997), la % risposta del campione dovrebbe preferibilmente essere espressa come percentuale rispetto alla risposta del controllo negativo:

$$\% \text{ risposta} = \left| 100 \left[\frac{(\text{controllo} - \text{campione})}{\text{controllo}} \right] \right|$$

In questo modo anche la biostimolazione produce valori positivi (viene ignorato il segno). Per la severità si propone però un fattore pari alla metà di quello dell'endpoint considerato, perché la biostimolazione viene ritenuta meno pericolosa della tossicità manifesta. Utilizzando i valori indicati da Hartwell (1997) per la severità, nel caso il saggio indichi una biostimolazione il fattore diventa cioè: 3/2 per mortalità, 2/2 per fecondità, 1/2 per crescita.

Hartwell (1997) ha poi elaborato questo indice come sito-specifico, applicandolo cioè alla media dei campioni per un dato sito. Si ritiene invece preferibile elaborare un indice per ciascun campione, ed eventualmente combinare a posteriori l'indice dei vari campioni per avere una indicazione sito-specifica, ad esempio ponderando i singoli indici – campione per l'area rappresentata dai singoli campioni di un sito, se la densità di campionamento è differente (più fitta nella zona di presunta contaminazione massima, più rada nelle zone circostanti).

Il calcolo dell'indice separato per ciascun campione consente inoltre di realizzare mappe di tossicità per un dato sito, invece di esprimere la tossicità complessiva con un solo indice sintetico.

Un altro elemento debole dell'indice di Hartwell (1997) è l'uso del CV per la variabilità. In pratica serve ad esprimere il caso peggiore, perché il punteggio complessivo è più elevato per CV grandi, cioè per test molto variabili (e quindi non molto affidabili). Il rischio diventa così inversamente proporzionale a CV, con il limite che per CV = 0 (repliche tutte uguali) il punteggio è dato solo dalla consistenza. Inoltre, non tiene conto della variabilità del controllo, che riflette solo la variabilità sperimentale del momento, e può essere differente se i diversi campioni vengono saggiati in tempi successivi.

Nell'indice qui sviluppato la correzione della % risposta è pertanto basata sul confronto statistico campione – controllo mediante test t per varianze disuguali (che tiene conto cioè anche della variabilità per quello specifico campione e del controllo in quel momento) ed usando un coefficiente correttivo statistico CCS del tipo:

- campione = controllo, differenza non significativa ($P \geq 0,05$), cioè nessun effetto CCS = 0,05 (indicato come NS). Anche se il test statistico non rileva una differenza, nel 5 % dei casi tale differenza potrebbe esistere;
- campione > controllo, differenza significativa ($P \leq 0,05$), cioè biostimolazione CCS = 0,95 (indicato come *B);
- campione > controllo, differenza altamente significativa ($P \leq 0,01$), cioè elevata biostimolazione CCS = 0,99 (indicato come B**);
- campione < controllo, differenza significativa ($P \leq 0,05$), cioè tossicità/inibizione CCS = 0,95 (indicato come *T);
- campione < controllo, differenza altamente significativa ($P \leq 0,01$), cioè elevata tossicità/inibizione CCS = 0,99 (indicato come T**).

In sostanza, se il test non è significativo, contribuisce al punteggio in misura molto limitata, perché CCS = 0,05; se è significativo, amplifica la severità in modo proporzionale al tipo di effetto (biostimolazione o tossicità) e all'ampiezza dello scostamento dal controllo (differenza significativa o altamente significativa).

Va però ricordato che, secondo Thursby *et al.* (1997), l'uso del confronto statistico acritico, che sostituisce il giudizio esperto, espone al rischio di:

- sottovalutare una differenza importante, perché i dati presentano una variabilità insolitamente elevata, ed il test statistico non riesce a rilevare una differenza statisticamente significativa (falsi negativi);

- identificare come significativa una differenza veramente modesta, solo perchè c'è un accordo particolarmente buono tra le repliche (falsi positivi).

Thursby *et al.* (1997) propongono allora di utilizzare la differenza minima significativa (minimum significant difference MSD). Utilizzando una lunga serie di dati, per ogni coppia di controllo – campione è possibile calcolare la differenza MSD, espressa in percentuale del controllo, sulla base delle varianze e del numero di dati:

$$MSD = t_{critico} \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

dove $t_{critico}$ è il valore di t alla probabilità 0,05 per gli appropriati gradi di libertà.

Se la differenza tra controllo e campione è pari o superiore a MSD, si considera statisticamente significativa.

Ovviamente, le varie combinazioni controllo – campione hanno MSD diverse, ma su un numero sufficientemente elevato di prove, è possibile calcolare una soglia (threshold value TV), ad esempio il 90° percentile, ed utilizzarla come criterio di taglio. La soglia identifica dunque la “significatività rilevabile”: mentre la significatività statistica è associata ad una specifica applicazione del test di tossicità (si riferisce cioè ad una coppia campione – controllo), la significatività rilevabile è una proprietà del metodo utilizzato (come la riproducibilità intralaboratorio). In concreto, se il 90° percentile indica, ad esempio, che la significatività rilevabile è TV = 100 – 90°percentile MSD = 80 %, un campione risulterà statisticamente inferiore al controllo se la risposta percentuale sarà minore o uguale all'80 % (significatività rilevabile) del controllo (threshold limit TL = TV x controllo).

L'approccio ha il punto debole nella scelta del percentile (75°, 80°, 90°, ...) da usare come soglia (che prevede il calcolo della curva di potenza) ed è comunque possibile solo se vengono utilizzati molti campioni, oppure per laboratori che hanno lunghe serie di dati storici per un test condotto sistematicamente nelle stesse condizioni.

Ritenendo comunque vivamente pericolosa (e quindi sconsigliabile) l'adozione di soglie basate su MSD pubblicate da altri, l'indice qui proposto segue l'approccio di Phillips *et al.* (2001), e non quello di Thursby *et al.* (1997).

Comunque sia, una volta stabilito il criterio statistico per confrontare campione e controllo, il punteggio sarebbe così calcolato:

$$\text{Punteggio del campione} = \frac{(\{(severità)(\%risposta)(CV)\}) + \{consistenza\}}{\sqrt{N}}$$

Per la severità, Hartwell (1997) prende in considerazione solo 3 casi: mortalità, fecondità e crescita. Si ritiene invece necessario modulare la ponderazione sulla base di un numero superiore di endpoint, ritenuti significativi ed ampiamente utilizzati nei saggi ecotossicologici più recenti. Vengono pertanto proposti i fattori di ponderazione di cui alla tabella 5.2.

Tab. 5.2 –Fattori di ponderazione degli end-point.

Peso	End-point
1	Comportamento
2	Mutagenicità e genotossicità
3	Sviluppo (schiusa uova, fecondazione, metamorfosi, fissazione larve, ecc.)
4	Crescita (taglia, peso, divisione cellulare, ecc.)
4,5	Bioluminescenza
5	Mortalità - immobilità

Si ritiene poi necessario introdurre anche un correttivo per i comparti. Infatti, ai fini dell'interpretazione dei risultati di una batteria, le diverse matrici che possono essere utilizzate per i saggi hanno una diversa rilevanza. Per questo motivo, la severità va moltiplicata per i fattori della matrice di tabella 5.3:

Tab. 5.3 –Fattori di ponderazione della matrice.

Peso	Matrice
1	Estratto
2	Elutriato
3	Acqua interstiziale o sedimento disidratato
4	Sedimento tal quale
5	Acqua della colonna o effluente

Questa impostazione riflette la “rilevanza ecologica” delle diverse matrici, tenendo conto della maggiore o minore manipolazione dei campioni.

Non si è invece ritenuto necessario introdurre una ponderazione per il tipo di organismo, perché si assume *a priori* che il saggio con un determinato organismo sia stato introdotto nella batteria dopo aver valutata la congruità con la matrice (acqua, acqua interstiziale, sedimento intero, elutriati, estratti). Inoltre, le differenze tra tipi di organismi (batteri, vegetali, invertebrati) ed endpoint sono implicitamente contenute nel fattore severità.

Complessivamente il calcolo diventa:

$$\text{Punteggio del campione} = \frac{(\{(\text{severità})(\text{CCS})(\text{matrice})(\% \text{risposta})\}}{\sqrt{N}} + \{ \text{consistenza} \})$$

E per la tossicità:

$$\text{Punteggio tossicità} = \frac{\{[(\text{severità})(\text{CSS})(\text{matrice})(\% \text{risposta})]\}}{\sqrt{N}}$$

Il confronto di questi due punteggi permette così di interpretare la tossicità in termini di rischio: se il campione presenta un effetto tossico e i diversi endpoint sono tra loro consistenti, il rischio è maggiore rispetto al caso con uguale punteggio, ma con endpoint tra loro discordanti.

Purtroppo, il punteggio così calcolato è un numero non intuitivamente riferibile ad una scala di riferimento, perchè varia in funzione di numero e tipo di endpoint. Quindi, permette un confronto tra campioni diversi sottoposti alla stessa batteria, o dello stesso sito nel tempo (confronto spaziale o temporale), ma non consente di confrontare campioni saggiati con batterie diverse.

Si propone di allora di calcolare, per ciascun endpoint, anche un punteggio parziale di rischio:

$$\text{PPR}_e = \% \text{risposta} \times \text{severità} \times \text{matrice} \times \text{CSS}$$

ed il massimo PPR_{\max} tra tutti gli endpoint della batteria utilizzata.

Quindi, per ciascun endpoint si ottiene la percentuale, relativa all'endpoint che dà la % risposta massima per la combinazione massima ($\text{severità} \times \text{matrice} \times \text{CSS}$) $_{\max}$ della batteria considerata:

$$\% \text{PPR}_e = \% \text{risposta}_{\max, \text{CSS}_{\max}} \times \text{PPR}_e / \text{PPR}_{\max}$$

La percentuale della risposta è così espressa in una scala da 0 (nessun effetto significativo) a 100.

Il massimo corrisponde alla tossicità altamente significativa ($\text{CSS} = 0,99$) per un test di rilevanza massima ($\text{severità} = 5$) su sedimento intero ($\text{matrice} = 4$) che ha dato una risposta 100 %.

Se nessun test con tossicità altamente significativa, rilevanza massima, su sedimento intero dà una risposta = 100 %, la $\% \text{risposta}_{\max, \text{CSS}_{\max}}$ sarà < 100 % e precisamente pari alla % risposta massima osservata per test in queste condizioni (se la batteria ne comprende più di uno).

Se nessun test realizza la combinazione massima teorica di ($\text{severità} \times \text{matrice} \times \text{CSS}$), verrà utilizzata come $\% \text{risposta}_{\max, \text{CSS}_{\max}}$ la % risposta più elevata tra i test nella condizione ($\text{severità} \times \text{matrice} \times \text{CSS}$) $_{\max}$ per la batteria considerata.

Il punteggio di tossicità (PT) si calcola come $(\sum \% \text{PPR}_e) / \sqrt{N}$, ed il punteggio di rischio totale (PRT) come $[(\sum \% \text{PPR}_e) + \text{consistenza}] / \sqrt{N}$.

In questo modo la media delle % PPR_e di tutti gli endpoint esprime una tossicità percentuale % PT, indipendente da numero e tipo di endpoint. Indicando anche la % PPR_e minima e massima, si ha una stima della variabilità complessiva tra tutti gli endpoint.

Anche il punteggio di rischio totale PRT, cioè il punteggio per la tossicità PT corretto per la consistenza, può essere trasformato in punteggio di rischio percentuale % PR con la proporzione:

$$\% \text{PR} = \% \text{PT} \times \text{PRT} / \text{PT}$$

Quindi, il confronto tra %PT e %PR indica l'importanza della consistenza e quanto aumenta il rischio. %PR ha il significato di una percentuale di tossicità corretta per la consistenza (a parità di tossicità, il rischio aumenta se gli endpoint sono tra loro consistenti).

L'indice così calcolato può essere personalizzato, semplicemente modificando i valori numerici di severità (per saggi qui non considerati, ad esempio differenziando i test cronici su tempi diversi o su più generazioni, o per una diversa importanza rispetto a quella indicata), matrice e coefficiente correttivo statistico, oppure introducendo ulteriori correttivi.

Infine, è possibile indicare la rilevanza complessiva, in percentuale, della batteria utilizzata come:

$$\text{Rilevanza complessiva \%} = 100 \times (\text{Media}(\text{Severità} \times \text{Matrice})) / (\text{Severità}_{\max} \times \text{Matrice}_{\max})$$

La Media (Severità x Matrice) si riferisce alla media delle combinazioni severità x matrice degli endpoint effettivamente impiegati, mentre (Severità_{max} x Matrice_{max}) è la combinazione teorica più significativa tra quelle identificate, cioè, in assenza di modifiche ai coefficienti qui indicati, a quella corrispondente a un saggio di mortalità, fattore 5, sul comparto sedimento intero, fattore 4.

La decisione finale sulla significatività del dato di tossicità, cioè la traduzione dell'indice in una scala, costituisce la parte più soggettiva di questa proposta. Non essendo stato trovato in bibliografia un metodo statistico, è possibile utilizzare un "giudizio esperto" di questo tipo:

- $\% PT \leq 5 \%$ - tossicità assente/trascurabile (ovviamente, riferita alla batteria utilizzata: poiché nessuna batteria può garantire che non si manifesti un effetto tossico di qualche tipo in un tempo infinito, non sarebbe corretto definire quel campione come "non tossico" in assoluto)
- $5 \% < \% PT < 20 \%$ e consistenza ≤ 0 – tossicità moderata;
- $5 \% < \% PT < 20 \%$ e consistenza > 0 – tossicità elevata;
- $20 \% < \% PT < 50 \%$ – tossicità molto elevata;
- $\% PT > 50 \%$ – tossicità estremamente elevata;

E di conseguenza:

- $\% PR \leq 5 \%$ - rischio assente/trascurabile;
- $5 \% < \% PR < 10 \%$, rischio moderato;
- $10 \% < \% PR < 20 \%$, rischio elevato;
- $20 \% < \% PR < 50 \%$ – rischio molto elevato;
- $\% PR > 50 \%$ – rischio estremamente elevato

(a differenza dalla tossicità, il rischio tiene già conto della consistenza).

Queste scale potrebbero essere considerate ancora troppo conservative, ma si basano sul presupposto che probabilmente le batterie utilizzate prevedono solo pochi endpoint. Viene comunque stabilito che il numero minimo di endpoint da includere in una batteria per l'utilizzo dell'indice sia almeno pari a 3.

Poiché la descrizione dei calcoli così effettuati è relativamente complicata, sarà resa disponibile una specifica applicazione che consentirà di effettuare l'elaborazione, fornendo al tempo stesso una rappresentazione grafica del risultato finale.

Quale esempio applicativo, si consideri una batteria (del tutto teorica) composta da 6 test con 8 endpoint:

1. *Daphnia magna* DM, mortalità M e riproduzione R, su acqua sovranatante AS
2. Alga AL, crescita C, su acqua sovranatante AS
3. Anfipodi ANF, mortalità M e comportamento CO, su sedimento intero S
4. *Vibrio fischeri* VF, bioluminescenza B, su acqua interstiziale AI
5. *Ceriodaphnia dubia* CD, mortalità M, su eluati E
6. Ames, Mutagenicità MU, su estratti EST

Per tutti gli endpoint occorre disporre dei seguenti dati:

- numero repliche;
- valore medio e deviazione standard del controllo;
- numero repliche, valore medio e deviazione standard del campione (se si usa la MSD, basta la media del controllo e del campione).

Su queste basi, viene calcolata la % risposta e la significatività statistica della differenza, utilizzando un t test per varianze disuguali o la differenza minima significativa, se indicata (Tab. 5.4a). Sulla base dei fattori per significatività, matrice e coefficiente correttivo statistico, si ottiene il punteggio parziale di rischio e la percentuale parziale di tossicità. Se la % risposta del campione è superiore al controllo, cioè indica biostimolazione, nel calcolo di PPR e %PT si usa la metà del fattore di severità (Tabella 5.4b).

Tab. 5.4a – Esempio di calcolo del rischio ecotossicologico: dati di partenza.

Test	Endpoint	Matrice	90° MSD	n repliche ctrl	Media ctrl	Dev.st. ctrl	n repliche campione	Risposta campione	Dev.st. campione
D.M	M	AS	20		9			7	
DM	S	AI		4	58	7	4	23	12
AL	C	E		3	75	5	3	145	25
ANF	M	S		4	67	10	4	30	15
ANF	CO	EST		4	59	15	4	18	35
VF	B	S		2	112	5	2	165	10
CD	M	S		4	72	15	4	35	15
Ames	MU	AI		4	78	15	4	40	10

Tab. 5.4b – Esempio di calcolo del rischio ecotossicologico: punteggio parziale di rischio e rischio %.

% risposta campione	Confronto campione - controllo	Severità	Matrice	Severità x matrice	Coefficiente correttivo statistico	Correzione totale	Punteggio parziale rischio	Punteggio parziale rischio %
22,2	*T	5	5	25	0,95	23,75	528	10,73
60,3	T**	3	3	9	0,99	8,91	538	10,93
93,3	*B	4	2	8	0,95	7,6	355	7,21
55,2	T**	5	4	20	0,99	19,8	1093	22,22
69,5	*T	1	1	1	0,95	0,95	66	1,34
47,3	*B	4,5	4	18	0,95	17,1	405	8,22
51,4	T**	5	4	20	0,99	19,8	1018	20,68
48,7	T**	2	3	6	0,99	5,94	289	5,88

A questo punto si ha il punteggio di tossicità, pari a 56,2, come somma dei %PPP_e parziali diviso la radice quadrata del numero degli endpoint; con 0 endpoint non significativi, poiché la consistenza è pari a 64, il punteggio totale di pericolo sale a 78,9. Ma questi due numeri indicano solo che il rischio è superiore a quanto indicato semplicemente dalla tossicità, senza un riferimento che permette di sapere se una tossicità di questa entità è più o meno grave. Usando la media delle %PPP_e parziali, la percentuale di tossicità %PT complessiva è pari a 19,9 % (su una scala da 0 a 100), con %PPP_e minima di 0,78 % e massima del 55,2 %. Tenendo conto della consistenza, il rischio, su un massimo teorico del 100 %, è pari al 27,9 %, per una batteria di endpoint che ha una rilevanza complessiva del 48,8 %.

Graficamente, si può esprimere così (fig. 5.1): la % risposta rispetto al controllo negativo indica se c'è biostimolazione o inibizione per l'endpoint considerato; il % punteggio parziale di rischio mette a confronto i diversi endpoint, corretti per i fattori severità, comparto e statistica; la % tossicità e il % rischio differiscono in funzione della consistenza (che, in percentuale, varia da 100 %, tutti i test concordi, al -100 %, tutti non significativi, passando per lo 0 %, quando metà degli endpoint sono NS). Infine, viene indicata la rilevanza complessiva della batteria utilizzata, in percentuale della rilevanza massima per una batteria con test di severità massima e comparto più sensibile.

Il pericolo è superiore alla tossicità, perchè c'è consistenza massima.

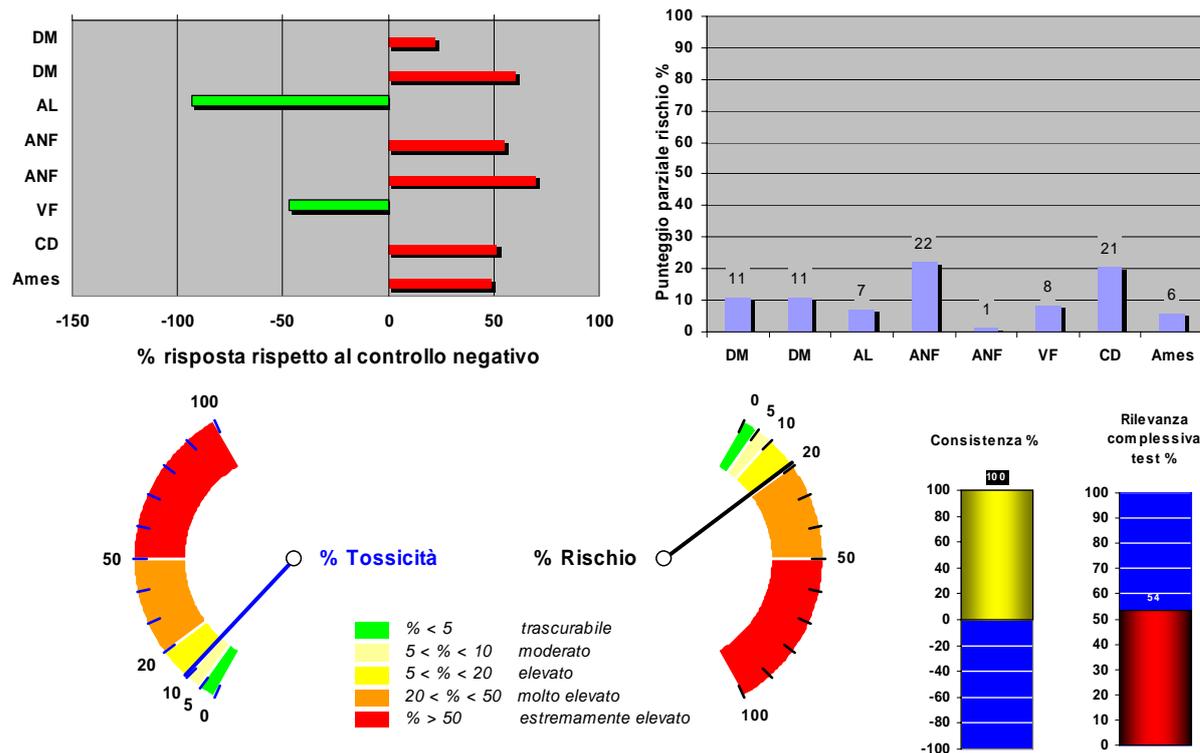


Figura 5.1. Possibile rappresentazioni grafiche della valutazione del rischio ecotossicologico secondo.

5.3 Conclusioni

L'indice sintetico elaborato nel presente capitolo consente di integrare i risultati ottenuti con una batteria di saggi ecotossicologici.

In particolare, tale indice può essere applicato a qualsiasi batteria, indipendentemente dal numero e tipo di endpoint considerati, e permette di calcolare in modo obiettivo tossicità e potenziale rischio di un campione, espressi in una scala arbitraria ma che corrisponde ad un "giudizio esperto" condiviso dai partecipanti al gruppo *ad hoc*.

Ovviamente, questo indice va inteso solo come uno strumento di lavoro e non pretende di sostituirsi alla valutazione critica espressa dall'utilizzatore.

E' auspicabile che ciascun gruppo di lavoro utilizzi questo strumento con i propri dati reali, per verificare e/o variare il peso dei fattori di ponderazione proposti. Nel caso si rendesse necessaria una loro revisione, le prossime edizioni di questo documento riporteranno le variazioni concordate, motivandone le ragioni.

CAPITOLO 6: SAGGI *IN SITU* IN AMBIENTE MARINO

6.1 – Introduzione

L'utilizzo di saggi di laboratorio per valutare la qualità ambientale è stato spesso criticato in quanto le condizioni controllate di esecuzione del test generalmente non rispecchiano le reali condizioni dell'ambiente allo studio (Cairns, 1983) e la manipolazione dei campioni, nelle varie fasi precedenti l'esecuzione dei test, possono comportare una alterazione della biodisponibilità dei tossici.

Per questo sono stati proposti metodi alternativi di valutazione della qualità ambientale che prevedono una esposizione *in situ* di differenti organismi, che risultano così sottoposti alle reali condizioni ambientali. Questo approccio è stato seguito in particolare per ambienti di acqua dolce, ma si contano anche alcuni esempi di applicazione per acque marine e di estuario.

Lo strumento più completo è rappresentato dal cosiddetto “mesocosmo” (Odum, 1984; SETAC-Europe, 1991); isolando opportunamente una porzione dell'ambiente allo studio è infatti possibile effettuare direttamente sul posto studi di dinamica di popolazione, test di tossicità, ricerche sul bioaccumulo e sulla patologia. Poiché il corretto impiego di questa tecnica impone che il mesocosmo includa i sedimenti (SETAC-Europe, 1991), anche la chimica di questo comparto può dunque essere tenuta in considerazione.

Purtroppo, questa tecnica è estremamente complessa (e costosa), limitandone fortemente l'applicazione; inoltre, proprio per le difficoltà inerenti al suo impiego, raramente è possibile compiere gli esperimenti con un numero adeguato di repliche.

In questa sede non verranno quindi esaminati gli studi effettuati con meso- e macrocosmi, cioè quelli nei quali enclosures di dimensioni medio-grandi racchiudono elevati volumi di acqua (ed eventualmente sedimenti) dell'ambiente da studiare, perché difficilmente si prestano ad applicazioni di routine.

Verranno invece sinteticamente descritte alcune tecniche che meriterebbero di essere approfondite. In sintesi, questi test si propongono di studiare l'esposizione ad acque e/o sedimenti contaminati direttamente nell'ambiente da controllare.

Generalmente è necessario realizzare opportuni contenitori, con aperture coperte da una rete, che possano contenere gli organismi test desiderati ed eventualmente essere posizionate a contatto dei sedimenti. La presenza di una rete ottiene lo scopo di trattenerne gli organismi all'interno del contenitore, senza però impedire il flusso bidirezionale di soluti (e particelle di dimensioni inferiori alle maglie della rete). Per organismi di piccole dimensioni, che richiedono quindi reti a maglie molto fitte o filtri, la libera circolazione dell'acqua deve essere verificata, ad esempio utilizzando coloranti e determinando il tempo necessario alla sua diffusione.

Nel seguito verranno esaminate solo le applicazioni in ambiente marino o di estuario, ma alcuni accorgimenti tecnici sviluppati per test *in situ* in ambienti di acqua dolce (Burton *et al.*, 2005) potrebbero facilmente essere adattati per l'impiego con organismi marini. Ad esempio, Pereira *et al.* (1999) hanno descritto camere per l'esposizione di *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* o zooplankton indigeno di acqua dolce.

6.2 Alghe

Una tra le prime applicazioni dei test *in situ* è sicuramente stata la determinazione della produzione primaria fitoplanctonica, tramite la misura dell'ossigeno con il metodo della bottiglia chiara e scura, che permette cioè il confronto tra produzione di ossigeno con la fotosintesi (esposizione *in situ* alla luce naturale) e consumo di ossigeno dovuto alla respirazione (esposizione al buio). Probabilmente que-

sta tecnica, con gli opportuni adattamenti, ad esempio l'uso di un inoculo come si usa nel test algale di laboratorio, potrebbe tornare ad essere applicata, con interessanti risultati, come test di tossicità.

Una modifica, che prevede l'uso di camere bentiche chiare e scure, è stata recentemente utilizzata per misurare fotosintesi e respirazione a livello dei sedimenti (Rasheed *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005).

Dalsgard e Krause-Jensen (2006) hanno proposto un biosaggio sulla crescita del fitoplancton indigeno che prevede la misura per fluorescenza della clorofilla a. L'acqua del sito viene filtrata a 50 μm , per rimuovere gli erbivori di maggiori dimensioni, e versata in sacchi da dialisi da 600 mL e composti da una membrana di cellulosa rigenerata con un livello di taglio del peso molecolare di 6-8 kDa. La membrana tubulare, che appiattita ha un diametro di 10 cm, viene tagliata in sezioni di 30 cm e chiusa ad entrambe le estremità con filo metallico ricoperto in plastica, ottenendo dei cilindri del diametro di circa 6,4 cm e lunghi 20 cm. Le camere da dialisi così ottenute vengono sistemate in borse di nylon con maglie di 1,5 mm ed attaccate ad una boa. Dopo incubazione (da 3 a 6 giorni), si procede alla misura fluorimetrica della clorofilla a, dopo filtrazione su filtri GF/F ed estrazione con etanolo. Il risultato viene confrontato con la misura della clorofilla a sul campione d'acqua di partenza.

Come derivazione di metodi sviluppati per alghe di acqua dolce, Moreira dos Santos *et al.* (2002) hanno proposto un biosaggio *in situ* basato sull'esposizione della microalga *Phaeodactylum tricornutum* immobilizzata in un gel. Inizialmente, viene preparata una soluzione (1,25 % peso/volume) di alginato di sodio ed una di cloruro di sodio (3,5 % peso/volume). Dopo mescolamento delle due soluzioni, si procede all'inoculo dell'alga, in modo tale da ottenere la densità cellulare voluta. Quindi, tramite una siringa, gocce della sospensione vengono lasciate cadere, da un'altezza di circa 15 cm, in una soluzione (1,5 % p/v) di CaCl_2 in acqua di mare filtrata a 0,45 μm . Mantenendo la soluzione in agitazione per almeno 30 minuti, le "perle" così formate, di diametro compreso tra 2,5 mm e 3,5 mm, si induriscono. Si procede poi al loro ripetuto lavaggio con acqua di mare filtrata. Le perle possono essere conservate, in acqua di mare filtrata, al buio ed a 4 °C, fino a 2 settimane.

Per il biosaggio *in situ* si utilizzano apposite camere, preparate a partire da una piastra con 24 micropozzetti; il fondo dei micropozzetti viene sostituito con una rete di nylon con maglie da 50 μm (la dimensione è stata scelta per consentire il passaggio dell'acqua, ma non degli organismi); nel coperchio della piastra ed in una spugna delle stesse dimensioni vengono praticati fori delle dimensioni dei micropozzetti; su una faccia della spugna viene incollata (utilizzando colla bianca termica atossica) una rete di nylon da 50 μm , sull'altra faccia della spugna il coperchio perforato. In questo modo, il coperchio assicura rigidità alla piastra, mentre la spugna assicura la chiusura. La piastra così modificata dovrà poi essere inserita in una camera esterna, un contenitore ricavato da una bottiglia rettangolare di polietilene tereftalato da 5 L. La bottiglia è tagliata in 2 sezioni, in modo tale che la base abbia un'altezza di circa 8 cm e contenga sufficiente acqua da permettere l'immersione della piastra micropozzetto. Le 4 pareti della parte superiore della bottiglia vengono tagliate e sostituite con una rete di nylon con maglie da 200 μm (per prevenire problemi di fouling). Le camere così preparate vengono immerse in acqua per 24 ore prima dell'uso.

Per l'esposizione, le perle di alghe vengono trasportate sul posto in beaker di polietilene da 50 mL ed immerse nel mezzo utilizzato per la conservazione. 2 o 3 perle vengono inserite in ogni micropozzetto (e 3 repliche da 3 perle ciascuna vengono simultaneamente preservate in soluzione di Lugol, per la stima della densità iniziale). Il coperchio (modificato) viene inserito sulla piastra e fissato con due fascette di plastica, quindi la piastra viene inserita nella camera esterna, il cui fondo è già riempito con acqua locale filtrata a 200 μm , o con acqua di mare sintetica (controllo). Con una siringa, vengono rimosse le bolle d'aria dai micropozzetti. Un filo di nylon, legato al coperchio della piastra, viene fatto passare attraverso il collo della camera esterna. La parte superiore della camera esterna viene poi fissata a quella inferiore con nastro trasparente e l'intera camera viene immersa in acqua locale, filtrata a 200 μm (o acqua di mare sintetica, per il controllo), fino a completo riempimento. Utilizzando il filo di nylon, la piastra interna viene posizionata in modo tale che risulti allineata con la rete da 200 μm della camera esterna e bloccata in posizione con il tappo della camera esterna che si serra sul filo di nylon. A questo punto l'attrezzo è pronto per la deposizione, a collo in giù, sulla superficie dell'acqua, dove galleggia (per garantire la massima penetrazione della luce) e viene assicurato con una fune. L'esposizione dura 72 ore ed al termine le perle di alginato vengono recuperate, fissate in Lugol e trasportate in laboratorio. Le cellule immobilizzate vengono recuperate in 30 minuti sciogliendo le perle

in citrato trisodico (3 % p/v) e contate al microscopio in camera di Neubauer a 400 X. Successivamente (Moreira *et al.*, 2006a), la stabilità delle perle di alginato è stata migliorata sostituendo il CaCl₂ con SrCl₂ (4 % p/v). Le alghe immobilizzate in un gel di alginato sono protette dagli stress meccanici, ma nutrienti e metaboliti possono diffondere liberamente attraverso il gel e le cellule mantengono la loro vitalità. È possibile utilizzare anche altre specie algali, indigene o non, ma *P. tricornutum* offre il vantaggio di essere facilmente coltivabile, ampiamente utilizzato in biosaggi e tollerante ad ampie fluttuazioni di salinità, così da poter essere utilizzato anche in ambienti di estuario.

La stessa tecnica è stata anche utilizzata per saggi all'interfaccia acqua-sedimento (Moreira *et al.*, 2006b). In questo caso, la camera per l'esposizione delle perle è composta da 2 piastre acriliche (14 cm x 4 cm), ciascuna con 4 fori (diametro 2 cm, spessore 0,3 cm) e con una faccia coperta da una rete (11 cm x 3 cm) di nylon da 64 µm. Agli angoli di ciascuna piastra vengono inoltre praticati fori da 0,3 cm. La cavità che ospita le perle viene ottenuta unendo le due piastre, con la rete all'esterno, e fissandole con fascette di plastica attraverso i fori angolari. La camera viene inserita in un contenitore esterno, realizzato da un tubo aperto di PVC (lunghezza 25 cm, spessore delle pareti 0,5 cm, diametro interno 4 cm). La forma cilindrica del contenitore esterno è stata prescelta per evitare che particelle in sedimentazione coprano la superficie superiore del contenitore. Per l'esposizione, le aperture dei tubi vengono chiuse con rete di nylon (200 µm), oppure con plastica trasparente (camere chiuse), fissata con un anello di PVC trasparente (lunghezza 1 cm, spessore 0,5 cm, diametro interno 5 cm). Una cesta di metallo plastificato (38 cm x 10 cm x 25 cm) ospita le camere, aperte o chiuse per consentire l'aggiunta di nutrienti. Una seconda cesta, senza camere, viene posizionata capovolta sul sedimento e su di questa viene adagiata la cesta con le camere, che ai 4 angoli ha pesi da 2 kg per assicurare che non si sposti dopo la deposizione.

Brandini *et al.* (2001) hanno utilizzato il metodo della colonizzazione di vetrini per microscopia per studiare la produzione *in situ* di diatomee perifitiche. Secondo questo metodo, gruppi di 12 vetrini da 1 x 5 cm, prelevati in acido, vengono montati su 3 piastre in plexiglas (4 vetrini per piastra), attaccate con una fune ad una boa opportunamente ancorata, ed esposte alla profondità voluta nel sito da studiare. Le piastre vengono mantenute orizzontali, con entrambe le facce dei vetrini esposti per la colonizzazione. Dopo 7 giorni, i vetrini vengono raccolti e rimpiazzati con nuovi vetrini. 5 dei vetrini raccolti vengono utilizzati per esperimenti di fotosintesi, altri 5 per la determinazione della clorofilla, mentre sui rimanenti 2 viene determinata la fotosintesi *in situ* con il metodo dell'ossigeno (incubazione alla luce e al buio). Dopo l'incubazione, i vetrini vengono trasferiti in laboratorio per l'analisi della composizione in specie e dell'accumulo di clorofilla.

6.3 Macrofite

Dalsgard e Krause-Jensen (2006) hanno sviluppato un saggio *in situ* che utilizza *Ulva* sp. Dischi circolari del tessuto della macroalga vengono ricavati utilizzando un tubo affilato. 5 dischi vengono posizionati all'interno della camera di crescita, costituita da un tubo acrilico trasparente (diametro 10 cm, lunghezza 20 cm), chiuso ad entrambe le estremità con una rete di nylon con maglie da 1,5 mm. 4 camere vengono fissate su una lastra acrilica e sospese ad una boa, per l'esposizione della durata di 3-6 giorni. L'area dei dischi di *Ulva* viene calcolata, prima e dopo l'esposizione, dalla media del diametro misurato in due direzioni perpendicolari l'una all'altra, e fornisce una stima della biomassa. I dischi vengono poi congelati per le successive analisi chimiche.

Macinnis-Ng e Ralph (2003) hanno progettato delle camere che permettono di racchiudere *in situ* foglie di macrofite, per esperimenti sulla fotosintesi, con successive analisi di laboratorio per la misura di clorofilla e pigmenti fotosintetici. La disponibilità di fluorimetri subacquei ha reso inoltre possibile la misura diretta *in situ* della fotosintesi di macrofite, senza racchiudere le piante in camere: la tecnica è stata applicata su *Posidonia australis*, *Amphibolis antarctica* e *Halophila ovalis* (Ralph *et al.*, 1998), e su *Thalassia testudinum* (Durako e Kunzelman, 2002).

6.4 Policheti

Moreira *et al.* (2005) hanno realizzato test di tossicità subletale a breve termine *in situ* con *Hediste diversicolor*, utilizzando per l'esposizione camere costituite da un tubo acrilico trasparente (20 cm

lunghezza, 0,5 cm spessore, 5 cm diametro interno), con due finestre rettangolari (4 cm x 10 cm) opposte e coperte da una rete di nylon da 200 μm . L'estremità inferiore del tubo, per circa 1 cm, viene smussato (angolo di 30°) per facilitare la penetrazione nel sedimento. Per l'esposizione, durante la bassa marea il tubo viene inserito per circa 14 cm, fino a 1 cm al di sopra delle finestre. Dopo deposizione di 3 policheti sulla superficie del sedimento, l'estremità superiore del tubo è chiusa da una rete di nylon da 200 μm (15 cm x 15 cm), fissata con un elastico. Dopo 48 ore, durante la bassa marea, i tubi vengono recuperati, chiudendo l'estremità inferiore con un tappo per prevenire la fuoriuscita del sedimento, e trasportati in laboratorio, dove gli organismi sopravvissuti vengono trasferiti in acquari per successivi esperimenti sull'alimentazione.

6.5 Anfipodi

De Witt *et al.* (1999) hanno effettuato test di tossicità *in situ* con l'anfipode *Chaetocorophium* cf. *lucasi*, esponendolo al sedimento in tubi di PVC (diametro 10 cm, altezza 10 cm), nel quale sono state ricavate 2 finestre (8 cm x 10 cm) sulle quali sono state incollate, con colla epossidica, delle reti in plastica (0,44 μm mesh). La stessa rete è fissata anche al fondo. 24 ore prima dell'inizio del test, il tubo è deposto in depressioni del sedimento, profonde 2 cm; un collare cilindrico di plastica, del diametro di 25 cm, viene quindi posizionato attorno al tubo di PVC ed infossato per 2 cm. Viene quindi riempito con acqua di mare fino a circa 5 cm, formando una specie di acquario attorno al tubo. All'inizio del test, nel tubo di PVC vengono inseriti gli anfipodi e l'estremità superiore del tubo è chiusa con la rete di plastica, fissata con un elastico. Dopo che l'apparato è sommerso dall'alta marea, il collare di plastica viene rimosso e si effettua l'esposizione per 10 giorni.

Nei test a 10 giorni di Kater *et al.* (2001) è stato utilizzato *Corophium volutator*. Per l'esposizione *in situ* è stato utilizzato un telaio in alluminio che ospita 5 camere, ciascuna delle quali consiste di un tubo in PVC (altezza 10 cm, diametro 11 cm). Una rete, con maglie da 1 mm, alta 20 cm, è fissata al tubo ad una estremità, e ad un disco di PVC del diametro di 16 cm all'altra estremità. Il disco di PVC ha un foro, per permettere l'introduzione degli anfipodi. Le camere vengono fissate al telaio, e siringhe riempite con acqua di mare e con 20 individui di *Corophium* vengono inserite nel foro della piastra superiore di ciascuna camera. I sommozzatori provvedono poi a posizionare il telaio sul sedimento. Poiché i tubi di PVC delle camere non hanno fondo, vengono immersi nel sedimento, lasciando però al disopra dell'interfaccia acqua-sedimento la parte in rete. Gli anfipodi vengono infine immessi nelle camere. Dopo 10 giorni di esposizione, il telaio viene recuperato, evitando di perdere il sedimento da ciascun tubo. Il sedimento viene quindi setacciato a 500 μm per il conteggio degli anfipodi sopravvissuti.

Anderson *et al.* (2004) hanno invece effettuato test di tossicità *in situ* a 10 giorni con l'anfipode *Eohaustorius estuarius*. La camera di esposizione è costituita da un tubo di policarbonato (diametro interno 7,7 cm, altezza 34 cm), su due facce del quale sono state ritagliate delle aperture a forma di goccia, poi coperte con un setaccio di Nitex (500 μm mesh). L'estremità superiore del tubo è chiusa da un tappo di polietilene al quale è applicata una siringa da 20 mL. Prima della deposizione, la siringa è riempita con 15 mL di acqua, contenente gli anfipodi. Il tubo viene quindi inserito nel sedimento per 16 cm e, tramite il pistone (modificato) della siringa, si apre la siringa stessa all'estremità inferiore, entro il tubo, rilasciando gli anfipodi.

6.6 Molluschi

L'impiego di molluschi (mussel-watch; Widdows *et al.*, 1981), soprattutto di mitili e ostriche, è largamente documentato in bibliografia da più di 30 anni e prevede l'uso di popolazioni indigene od il trapianto di individui, ospitati in reti o gabbie, nelle acque delle zone da controllare. È possibile utilizzare individui adulti (Salazar e Salazar, 1995), oppure stadi giovanili (Warrin *et al.*, 1995).

L'uso di molluschi come bioindicatori comporta però dei problemi, per effetto di fattori biotici, quali età, dimensioni, sesso, attività alimentare e stadio riproduttivo, ed abiotici, come livello di carbonio organico, temperatura, pH, ossigeno disciolto e uptake dei tossici (Boening, 1999).

Secondo Boening (1999), il biomonitoraggio dovrebbe prevedere l'impiego di molluschi filtratori (filter-feeder) e detritivori (deposit feeder). È possibile utilizzare una variante del mussel-watch anche

per studiare il bioaccumulo a livello dei sedimenti, inserendo i molluschi nel sedimento stesso, avendo cura di non impedire la loro naturale strategia alimentare. Esempi di questo tipo di applicazione sono riportati da Pellerin *et al.* (1993) e Hamza-Chaffai *et al.* (2000), che hanno impiegato molluschi della specie *Ruditapes decussatus*, largamente distribuiti nel Mediterraneo, come biomarker di esposizione *in situ* utilizzando il sistema del trapianto di 120 individui in gabbie di plastica (100 x 50 x 5 cm) con reti a maglie di 1 cm² coperte da sedimento.

Petersen *et al.* (1997) hanno studiato l'accrescimento *in situ* di *Mytilus edulis*, trapiantato in borse a rete dopo che si è fissato, tramite il bisso, alla rete stessa durante il mantenimento in laboratorio; per uno studio analogo, utilizzando però l'ascidia *Clona intestinalis*, gli individui venivano invece incollati con una colla al cianoacrilato su pannelli di PVC.

Ringwood *et al.* (1999) hanno effettuato test *in situ* con *Crassostrea virginica* contenuta in borse di polietilene, fissate ad un vassoio di plastica mantenuto parallelo al fondo, a circa 0,5 m di distanza, per prevenire il seppellimento.

Ringwood e Keppler (2002) hanno esposto per 7 giorni *Mercenaria mercenaria* in contenitori di PVC (diametro 8 cm, altezza 3,5 cm) chiusi da una rete di polipropilene con maglie da 1mm e racchiusi in una borsa con maglie da 0,5 cm.

Per una diversa applicazione, che prevede la misura di una risposta diretta all'esposizione a tossici, Kramer *et al.* (1989) hanno realizzato un apparecchio che registra automaticamente la frequenza di apertura e chiusura delle valve, utilizzata quale indice dello stress cui è sottoposto il mollusco.

Geffard *et al.* (2001) hanno adattato il saggio embrio-larvale con *Crassostrea gigas* e *Mitylus galloprovincialis* (specie eurialine, adatte per salinità ≥ 20 ‰) all'utilizzo *in situ* esponendo le uova fecondate per 24 – 96 ore (in funzione della specie e della stagione) in camere costruite a partire da bottiglie in polietilene a bassa densità, tagliando il fondo e sostituendolo con una rete di poliammide con maglie da 30 μ m, utilizzando colla termica atossica. Per permettere la circolazione dell'acqua, anche la bocca della bottiglia veniva analogamente coperta con rete, fissata con un anello di tenuta ed un tappo a vite aperto. Le camere vengono immerse in acqua di mare filtrata e ciascuna viene seminata con 60.000 uova fecondate. Dopo trasporto, completamente immerse nell'acqua di mare filtrata, fino alla stazione di misura, vengono immerse ad 1 metro di profondità per l'esposizione, al termine della quale le camere vengono recuperate e trasferite in laboratorio, dove le larve vengono filtrate attraverso un retino in acciaio inox da 32 μ m, fissate in formaldeide ed esaminate per valutare le anomalie di sviluppo.

Webb e Keough (2002) hanno confrontato l'accumulo di metalli da parte di molluschi e, per diffusione, mediante film di un opportuno gel.

Una dettagliata guida sulla conduzione di studi *in situ* con molluschi bivalvi è stata infine pubblicata da ASTM (2002). Questa guida raccomanda l'uso di gabbie con comparti individuali, che consentono cioè di tenere separati gli organismi esposti. Questo accorgimento assicura una uniformità di condizioni di esposizione per ciascun mollusco, minimizza le interazioni tra organismi, facilita l'individuazione di ciascun soggetto (evitando l'uso di sistemi di marcatura) e la randomizzazione della distribuzione all'interno delle gabbie, e permette il rilevamento di dati individuali, aumentando il potere statistico dei test.

La guida riporta inoltre una dettagliata bibliografia sull'uso di gabbie per i trapianti di 38 specie di bivalvi marini e 38 di acqua dolce.

6.7 Echinodermi

Alcuni studi di letteratura hanno previsto l'esecuzione contemporanea del saggio di embriotossicità con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* in laboratorio, su campioni d'acqua o con elutriati di sedimento prelevati in campo, e prove *in situ*, nelle medesime stazioni di prelievo. Il saggio consiste nell'esposizione di uova fecondate alla matrice da testare e, dopo 72 ore, viene valutato il numero di embrioni che raggiunge correttamente lo stadio di pluteo a 4 braccia.

In particolare Beiras *et al.* (2001) hanno applicato il saggio con embrioni *in situ*, seminando le uova fertilizzate in camere da 50 mL, con il fondo coperto da una rete da 20 μ m e riempite con l'acqua

del sito da investigare, deposte sulla superficie del sedimento a 2 m di profondità. Dopo 72 ore di esposizione, le larve vengono recuperate, fissate con formaldeide ed esaminate al microscopio.

Salamanca *et al.* (2009) hanno adattato il saggio di embriotossicità con *Paracentrotus lividus* alla valutazione in situ della qualità ambientale di acque portuali. Gli autori hanno utilizzato camere da 100 ml, disposte in file di 8, all'interno delle quali solo 4 camere presentavano circolazione d'acqua al loro interno. Le uova fecondate sono state inserite all'interno delle camere ed esposte alla colonna d'acqua a 3 m di profondità. Dopo un'esposizione di 72 ore a temperature comprese tra 17 e 19 °C è stata valutata in laboratorio la percentuale di plutei normoformati.

Morrone (2011) ha condotto uno studio, nell'ambito di una tesi di laurea presso i laboratori I-SPRA a Livorno, con l'obiettivo di verificare la fattibilità dell'esecuzione del saggio di embriotossicità con *P. lividus* per acque marino-costiere nelle condizioni *in situ*. Le uova fecondate sono state esposte alla colonna d'acqua mediante una "sonda biologica" appositamente realizzata. Questa è costituita da un supporto rigido in PVC sul quale sono posizionate 3 camere di esposizione. Ogni singola camera è di forma cilindrica, del volume di 50 ml e realizzata in polipropilene. In corrispondenza dell'estremità superiore è dotata di un'apertura alla quale è applicata una rete con maglia di 55 µm. Al centro della sonda è stato applicato un peso di 300 gr. La sonda così realizzata è stata posizionata a 1 m di profondità. Il periodo d'esposizione è stimato in base ad alcune prove di laboratorio a diversa temperatura e varia da 72 a 120 ore, a seconda del valore della temperatura rilevato in mare. Al termine dell'esposizione gli embrioni vengono bloccati con Lugol direttamente in campo e successivamente contati in laboratorio. Da questo studio è emerso che sia la specie che il tipo di saggio risultano logisticamente idonei all'applicazione *in situ*, in quanto *P. lividus* ha fornito risposte differenziate in base all'area nella quale è stato condotto lo studio.

6.8 Pesci

È forse il settore che più ha sviluppato, in ambiente marino, la metodologia dei test *in situ*. Infatti, poiché l'allevamento, a scopi commerciali, di pesci in gabbie è largamente praticato (Lyndon, 1999), la bibliografia sull'acquacoltura riporta numerosissimi studi sulla fisiologia, parassitologia e bioaccumulo di contaminanti di pesci allevati in gabbie flottanti. Per citare solo un recente esempio, Roberts *et al.* (2006) hanno condotto studi di bioaccumulo e biomarker su salmonidi della specie *Oncorhynchus kisutch* esposti *in situ* utilizzando gabbie con rete rigida in nylon.

Le specie ittiche eurialine *Dicentrarchus labrax* (branzino o spigola) e *Sparus aurata* (orata) potrebbero rappresentare un valido strumento per l'esecuzione di prove *in situ*, grazie anche al facile reperimento di stadi giovanili di taglie idonee.

Si segnala uno studio preliminare su *D. labrax* svolto nel 2002 nell'ambito della collaborazione scientifica tra ARPA ER – Ferrara, ICRAM e Università di Camerino (Gelli *et al.* 2002a). La metodologia applicata, che prevede l'esposizione *in situ* di giovanili per una durata di 28 giorni, era stata messa a punto dai medesimi Autori per pesci d'acqua dolce (Gelli *et al.*, 2002b).

6.9 Biosensori

I biosensori sono strumenti di analisi che incorporano un materiale biologico, o un materiale derivato, associato od integrato con un trasduttore fisicochimico di tipo ottico, elettrochimico, termometrico, piezoelettrico o magnetico. I recettori possono essere enzimi, organelli, microorganismi, tessuti, anticorpi, recettori cellulari, acidi nucleici o molecole biomimetiche (Kröger *et al.*, 2002).

I biosensori possono misurare un parametro biologico, un'analisi di interesse oppure "parametri somma", in quanto rilevano intere classi di composti e non solo un singolo prodotto chimico. Infatti, sono stati proposti biosensori di tossicità (Farre *et al.*, 2001), carcinogenicità, mutagenicità, citotossicità (Castillo *et al.*, 2001), genotossicità (Billington *et al.*, 1998; Polyak *et al.*, 2000; 2001), distruttori endocrini e tossine algali (Kröger *et al.*, 2002).

Questi sistemi sono prevalentemente sviluppati per l'impiego in laboratorio, ma in qualche caso possono essere utilizzati "in linea" (Gerhardt *et al.*, 2006), ad esempio per il controllo degli scarichi; probabilmente, quindi, potrebbero essere "ingegnerizzati" per un uso sul campo.

Rimane, tuttavia, una "rilevanza ecologica" piuttosto modesta, perché essi implicano il trasferimento dei dati rilevati da un sistema biologico semplificato, spesso basato su organismi semplici come batteri e lieviti, alla realtà ambientale.

Tuttavia, danno generalmente una risposta in tempi molto ridotti, rispetto ai saggi ecotossicologici tradizionali, e quindi potrebbero trovare un'applicazione per analisi di routine speditive, magari preliminari ad un approfondimento con test di tipo tradizionale.

6.10 Unità di colonizzazione

Possiamo far rientrare tra i metodi *in situ* anche le indagini sulla struttura della comunità bentonica, componente decisamente desiderabile per ogni studio che intenda rilevare e descrivere eventuali alterazioni indotte dalla contaminazione dei sedimenti.

Tralasciando i metodi classici di campionamento della flora e fauna residente, un approccio che ritengo meriti attenzione è l'uso di substrati di colonizzazione flottanti, per simulare ad esempio aggregati di macroalghe (Atilla *et al.*, 2003), oppure deposte sul fondo.

L'idea non è certamente nuova (McCormick *et al.*, 1988), anche se non è mai stata ampiamente applicata in ambienti marini (mentre è relativamente più frequente in ambienti di acqua dolce).

Sostanzialmente, si usano campionatori, di opportuno disegno, da deporre nell'ambiente allo studio e recuperare, dopo un tempo prestabilito. Si procede quindi al riconoscimento ed al conteggio degli organismi intrappolati nella camera di colonizzazione. Ovviamente, possono essere recuperati solamente gli organismi "mobili" (attivi o passivi), ma per confronto con la comunità teoricamente prevista sarebbe possibile sviluppare una sorta di indice biotico..

Secondo Mirto e Danovaro (2004), rispetto ai metodi tradizionali di campionamento, l'uso dei substrati artificiali presenta i seguenti vantaggi:

1. minor costi di campionamento;
2. minor tempo di trattamento dei campioni;
3. indipendenza dalle proprietà del substrato naturale.

Inoltre, Atilla e Fleeger (2000) ritengono che l'uso dei substrati artificiali sia particolarmente utile per quelli "duri", dove è generalmente difficile raccogliere campioni della meiofauna.

Naturalmente, perché l'impiego delle unità di colonizzazione dia risultati rappresentativi, è necessario che le unità stesse abbiano una appropriata architettura, una composizione, cioè un tipo di materiale costruttivo, adeguato, e vengano esposte per un periodo sufficientemente lungo da coprire il tempo di colonizzazione della fauna (o flora) di interesse (Atilla e Fleeger, 2000; Atilla *et al.*, 2003).

In effetti, diversi studi hanno portato a sviluppare unità di colonizzazione e metodi differenti per protozoi (Xu *et al.*, 2002), foraminiferi (Kitazato, 1995), batteri (Yasumoto-Hirose *et al.*, 2006), macrofitobenthos (Falace e Bressan, 2002), molluschi (Helson e Gardner, 2004).

Un modello standardizzato di camera di colonizzazione è stato proposto con la Norma ISO 9391 (1993).

6.11 Conclusioni

In definitiva, i test di tossicità *in situ* si propongono come buoni candidati per consentire di arrivare ad una realistica interpretazione delle condizioni di contaminazione di un dato ecosistema, in particolare perché consentono di integrare nel tempo (per il periodo coperto dall'esposizione *in situ*) gli effetti della presenza di eventuali tossici e delle loro interazioni con altri fattori ambientali di stress, che in molti casi tendono a potenziare gli effetti dannosi e/o indesiderati.

Naturalmente, per poter risalire alle relazioni di causa ed effetto, è però necessario completare lo studio con le opportune analisi chimiche e biologiche, oltre che con test di tossicità in laboratorio. Quest'ultimi, per verificare se i risultati ottenuti in campo differiscono significativamente da quelli ottenuti in laboratorio, dovranno essere eseguiti in contemporanea rispetto alle prove *in situ*. In particolare occorre allestire un test di laboratorio con le stesse matrici ambientali campionate in occasione della messa in campo delle camere d'esposizione.

Tuttavia, sembrerebbe logico iniziare tale studio con i test di tossicità *in situ*, e passare alle altre fasi solo se e quando i risultati dello screening preliminare ne indichino la necessità, fino ad arrivare ai complessi schemi di identificazione dei tossici presenti.

Inoltre, per avere risultati realistici e correttamente interpretabili, è necessario tenere in considerazione alcuni importanti fattori. Innanzitutto è consigliabile inserire nel disegno di campionamento più siti di riferimento e un adeguato numero di repliche. Sarà così possibile avere un'informazione più attendibile, considerato anche la variabilità dei fattori ambientali. E' inoltre importante avere un sito di controllo in mare e testare i materiali durante prove preliminari, in modo da verificare un possibile disturbo dovuto alla metodologia. E' infine utile poter avere un ulteriore controllo che permetta di verificare la possibile presenza di un artefatto dovuto al trasporto degli organismi (Burton *et al.* 2005).

Purtroppo non sono disponibili protocolli standardizzati (ad eccezione della guida ASTM 2002, relativa a molluschi bivalvi), e quindi non sembra al momento proponibile l'inclusione di test *in situ* in una batteria di saggi ecotossicologici.

La principale limitazione è costituita dalla necessità di lavorare a profondità limitate, accessibili da una imbarcazione o tramite operatori subacquei; attualmente questa difficoltà può essere superata solo utilizzando costosi e complessi sistemi telecomandati o sommergibili appositamente attrezzati.

Un altro problema è costituito dal rischio che vandali, o semplici curiosi, danneggino o asportino i dispositivi: per esperienza personale, posso assicurare che questo caso, purtroppo, si verifica abbastanza di frequente, se sono collocati in posizioni visibili dal visitatore occasionale, se sono ancorati a boe, o se al posizionamento assistono degli spettatori.

La diffusione di questo tipo di ricerche è comunque auspicabile, per arrivare a definire tecniche standardizzate di esposizione *in situ*, possibilmente per gli stessi organismi individuati per le batterie di test ecotossicologici; in tal modo, sarebbe infatti possibile effettuare confronti fra test di laboratorio ed *in situ*.

Va ricordato infine che sono in via di sviluppo numerose tecniche che consentono la determinazione *in situ* anche dei parametri fisici e chimici dei sedimenti (Viollier *et al.* 2003); tali tecniche, opportunamente abbinate ai saggi ecotossicologici *in situ*, permetterebbero una interpretazione delle condizioni esistenti esente dai possibili artefatti dovuti a campionamento, trasporto e conservazione dei campioni.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS MS, STAUBER JL. (2004). Development of a whole-sediment toxicity test using a benthic marine microalga. *Environ Toxicol. Chem.* **23**: 1957-1968.
- AHLF W, HEISE S. (2005). Sediment Toxicity Assessment. Rationale for effect classes. *J. Soils Sed.*, **5**: 16-20.
- AMES, B.N., F.D. LEE AND W.E. DURSTON (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**:782-786.
- AMIARD-TRIQUET C., C. BALLAN-DUFRANÇAIS, C. CROUZET, P. GARRIGUES, E. HIS, J.F. NARBONNE AND P. PAVILLON (1998). Fate and effects of micropollutants in the Gironde Estuary, France: a multidisciplinary approach. *Hydrobiologia*, **373/374**: 259-279.
- ANDERSEN P. 1996. *Design and implementation of some harmful algal monitoring systems*. Paris, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, Technical Series No. 44: .
- ANDERSON B.S., J.W. HUNT, B.M. PHILLIPS, P.A. NICELY, R.S. TJEERDEMA AND M. MARTIN (2004). A comparison of *In Situ* and Laboratory Toxicity Tests with the Estuarine Amphipod *Eohaustorius estuarius*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **46**: 52-60.
- ANDERSON B.S., J.W. HUNT, B.M. PHILLIPS, P.A. NICELY, R.S. TJEERDEMA AND M. MARTIN (2004). A comparison of *In Situ* and Laboratory Toxicity Tests with the Estuarine Amphipod *Eohaustorius estuarius*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **46**: 52-60.
- ANGELINI C, M.G. ALUIGI, M. SGRO, S. TROMBINO, H. THIELECKE AND C. FALUGI (2005). Cell signalling during sea urchin development: a model for assessing toxicity of environmental contaminants. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, **39**: 45-70.
- ANNICCHIARICO C., F. BIANCOLINO, N. CARDELLICCHIO, A. DI LEO, S. GIANDOMENICO AND E. PRATO (2006). Predicting toxicity in marine sediments in Taranto Gulf (Ionian Sea, Southern Italy) using sediment quality guidelines and a battery of bioassay. *Ecotoxicology*, **16**: 239-246.
- ANPA (2000). Elementi di identificazione delle acque di transizione. RTI CTN_AIM 6./2000.
- ANPA (2001). Elementi per la caratterizzazione fisicochimica biologica ed ecotossicologica dei parametri addizionali (D.Lgs. 152/99) nella matrice acquosa, nel sedimento e nel biota. RTI CTN_AIM 4./2001.
- ANZECC (2000). Water quality guidelines for fresh and marine waters. Australian and New Zealand Environment and Conservation Council, Australian Government Publishing Service, Canberra.
- APAT-IRSA-CNR (2003). Metodi analitici per le acque. Manuali e Linee guida, 29/2003, **3**: Metodo 8060: 1043-1049.
- ARA K, K. NOJIMA AND J. HIROMI (2002). Acute toxicity of Bunker A and C refined oils to the marine harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus mori*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **69** (1):104-10.
- ARGANO R., F. FERRARA, L. GUGLIELMO, S. RAGGIO E S. RUFFO (1995). Check list delle specie dalla fauna italiana. *Crustacea Malacostraca II (Tanaidacea, Isopoda, Amphipoda, Euphausiacea)*. Ed. Calderoni Bologna, **30**: 13-52.
- ARIZZI NOVELLI A, C. LOSSO, P.F. GHETTI AND A. VOLPI GHIRARDINI (2003)a. Toxicity of heavy metals using sperm cell and embryo toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): Comparison with exposure concentrations in the Lagoon of Venice, Italy. *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**: 1295-1301.
- ARIZZI NOVELLI A., M. PICONE, C. LOSSO, AND A. VOLPI GHIRARDINI (2003)b. Ammonia as confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk). *Toxicol. and Environ. Chem.*, **85(4-6)**:183-191.
- ARIZZI NOVELLI A., A. VOLPI GHIRARDINI, S. GIULIANI, C. FALUGI E G. PAGANO (2002a). Valutazione della tossicità di acque e sedimenti costieri su gameti e embrioni di specie autoctone di ricci di mare utilizzando metodiche differenziate. *Biol. Mar. Medit.*, **8(2)**:41-59.

ARIZZI NOVELLI A., E. ARGESE, D. TAGLIAPIETRA, C. BETTIOL AND A. VOLPI GHIRARDINI (2002b). Toxicity of tributyltin and triphenyltin toward the early life stages of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) *Env. Toxicol. Chem.*, **21**(4): 859-864.

ARIZZI NOVELLI A., C. LOSSO, G. LIBRALATO, D. TAGLIAPIETRA, C. PANTANI AND A. VOLPI GHIRARDINI (2006). Is the 1:4 elutriation ratio affordable? Ecotoxicological comparison of four different sediment: water proportions. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **65**: 306 –313
ARIZZI NOVELLI A., C. LOSSO, C. FALUGI, S. GIULIANI, L. KOZINKOVA, S. LERA, T. LEONI, S. MANZO, C. MAZZIOTTI, D. PELLEGRINI, M. PICONE E A. VOLPI GHIRARDINI (2007). Il test di fecondazione con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* (lmk). *Biol. Mar. Medit.*, **14**(1): 38-42.

ARPAL (2004). CTN – AIM Monitoraggio dei sedimenti e delle biocenosi marine. Raccolta, adeguamento ed integrazione delle informazioni.

ARPAT (1998). Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico. ARPAT - CEDIF, Serie Ricerche e Formazione, Quaderno n. 8. Firenze:191 pp.

ASTM (1993). Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity test with marine and estuarine amphipods. In: *Annual book of American society for Testing and Materials* (ASTM) Standard, Water and Environmental Technology. Vol. 11.04, Philadelphia, PA. ASTM E1367-92.: 1138-1163.

ASTM (1994). Standard Guide for Designing Biological Tests With Sediments. ASTM E1525.: 22 pp.

ASTM (1995). Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests With Echinoid Embryos. ASTM E1563: 20 pp.

ASTM (1999). Standard Guide for Conducting 10-Day Static Sediment Toxicity Tests With Marine and Estuarine Amphipods. ASTM E1367: 27 pp.

ASTM (2000a). Standard Guide for Conducting Acute, Chronic, and Life-Cycle Aquatic Toxicity Tests with Polychaetous Annelids. ASTM E-1562: 21 pp.

ASTM (2000b). Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests With Marine and Estuarine Polychaetous Annelids. ASTM E1611: 26 pp.

ASTM. (2000b). Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates. ASTM E1688: 54 pp.

ASTM (2002a). Standard Guide for Conducting In-situ Field Bioassays With Caged Bivalves. ASTM E 2122: 30 pp.

ASTM (2002). Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing. ASTM E1391: 22 pp.

ASTM (2004). Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos. In: *Annual Book of ASTM Standards*, 11(05). Philadelphia, PA, E 1563-04: 1029-1046.

ASTM (2004). Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. ASTM E-724 98(2004): 21 pp.

ASTM (2007). Standard guide for conducting sediment toxicity test with Polychaetous. ASTM E 1611-0025.

ATILLA N. AND J. FLEEGER (2000). Meiofaunal Colonization of Artificial Substrates in an Estuarine Embayment. *Mar. Ecol.*, **21**: 69-83.

ATILLA N., M.A. WETZEL AND J.W. FLEEGER (2003). Abundance and colonization potential of artificial hard substrate-associated meiofauna. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **287**: 273-287.

BACCI E., M. BUCCI, G. SBRILLI, L. BRILLI, F. GAMBASSI AND C. GAGGI (1994). Marine bacteria as indicators of water quality. *Chemosphere*, 28(6): 1165-1170.

BACCI E., M. BUCCI, G. SBRILLI, L. BRILLI, F. GAMBASSI, C. GAGGI E M. CRUSCANTI (1994). La "Apparent Bacterial Concentration" (ABC): verso un criterio di qualità per le acque marine. S.I.T.E./ATTI 16. *Atti del Sesto Congresso Nazionale della Società Italiana di Ecologia*. Venezia: 26 29 settembre 1994.

BALDI C., F. GAMBASSI, M. GIORDANO, A. GRILLI, R. PIETRINI, G. SBRILLI, M. BUCCI E G. ARMANI (1993). Integrazione tra saggi di tossicità (test algale e Microtox™) ed analisi fisico-chimiche nelle indagini sui reflui industriali. *Rivista Italiana d'Igiene*, n.1-2 gennaio-aprile 1993.

- BAO V.W.W. AND K.M.Y. LEUNG (2006). Acute toxicity of zinc pyrithione alone and in combination with copper on the harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda). *SETAC Europe 16th Annual Meeting* 7-11 May 2006, The Hague, The Netherlands.
- BARKA S., J.F. PAVILLON AND J.C. AMIARD (2001). Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, **128**: 479-493.
- BARNETT C.J. AND J.E. KONTOGIANNIS (1975). The effect of crude oil fractions on the survival of a tide-pool copepod, *Tigriopus californicus*. *Environ. Pollut.*, **8**: 45-54.
- BASSET A., L. SABETTA, A. FONNESU, D. MOUILLOT, T. DOCHI, P. VIAROLI, G. GIORDANI, S. REIZOPOULOU, M. ABBIATI AND G.C. CARRADA (2006). Typology in Mediterranean transitional waters: new challenges and perspectives. *Aquatic Conservation*, **16**: 441 – 455.
- BAT L., A. GÜNDOĞDU, M. AKBULUT, M. ÇULHA AND H.H. SATILMIŞ (2001). Toxicity of Zinc and Lead to the Polychaeta *Hediste diversicolor* (Müller). *Turkish Journal of Marine Sciences*, **7**: 71-84.
- BEIRAS R. AND E. HIS (1995). Toxicity of fresh and freeze-dried hydrocarbon-polluted sediments to *Crassostrea gigas* embryos. *Mar. Pollut. Bull.*, **30**: 47-49.
- BEIRAS R., E. HIS AND M.N.L. SEAMAN (1998). Effects of storage temperature and duration on toxicity of sediments assessed by *Crassostrea gigas* oyster embryo bioassay. *Environ. Toxicol. Chem.*, **17**(10): 2100-2105.
- BEIRAS R., E. VÁSQUEZ, J. BELLAS, J.I. LORENZO, N. FERNÁNDEZ, G. MACHO, J.C. MARIÑO AND L. CASAS (2001). Sea-urchin Embryo Biassay for *in situ* Evaluation of the Biological Quality of Coastal Water. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.*, **52**: 29-32.
- BELLAN-SANTINI D. (1982). Family Ampeliscidae. In: S. Ruffo (Ed.). *The Amphipoda of the Mediterranean*. *Mem. Inst. Océanogr. Monaco*, **13**: 19-69.
- BESSELINK H.T., C. SCHIPPER, H. KLAMER, P. LEONARDS, H. VERHAAR, E. FELZEL, A.J. MURK, J. THAIN, K. HOSOE, G. SCHOETERS, J. LEGLER, B. BROUWER (2004). Intra- and interlaboratory calibration of the DR CALUX bioassay for the analysis of dioxins and dioxin-like chemicals in sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**: 2781-2789.
- BIGONGIARI N., S. GIULIANI, D. PELLEGRINI AND P. MESCHINI (1998). Studio preliminare per l'utilizzo dell'anfipode mediterraneo *Coropium orientale* nei saggi biologici su sedimenti marini. *Acqua & Aria*, **1/98**: 63-66.
- BIGONGIARI N., T. BRAIDA AND A. PASTERIS (2004a). Saggio biologico con l'anfipode *Coropium orientale*: metodiche ed esempi di applicazione ai sedimenti marini. *Biol. Mar. Medit.* **8** (2): 60-71.
- BIGONGIARI N., T. BRAIDA, F. CARRETTI AND D. PELLEGRINI (2004b). Influence of temperature on the mortality and sensitivity of *Coropium orientale*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **72**(5): 881-887.
- BILLINGTON N., M.G. BARKER, C.E. MICHEL, A.W. KNIGHT, W.-D. HEUER, N.J. GODDARD, P.R. FIELDEN AND R.M. WALMSEY (1998). Development of a green fluorescent protein reporter for a yeast genotoxicity sensor. *Biosensors & Bioelectronics*, **13**: 831-838.
- BITTON G., M. CAMPBELL, B. KOOPMAN (1992). MetPAD – A bioassay kit for the specific determination of heavy-metal toxicity in sediments from hazardous waste sites. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.*, **7**: 323-328.
- BOENING D.W (1999). An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metal pollution in marine waters. *Env. Monit. Assess.*, **55**: 459-470.
- BOMBARDIER M, BERMINGHAM N. (1999). The SED-TOX index: Toxicity – directed management tool to assess and rank sediments based on their hazard. Concept and application. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18** (4): 685–698.
- BONA F., A. MAFFIOTTI E L. VOLTERRA (1997). *Analisi e recupero dei sedimenti marini*. Pitagora Editrice Bologna.
- BRANDINI F.P., E.T. DA SILVA, F.P. PELLIZZARI, A.L.O. FONSECA AND L.F. FERNANDES (2001). Production and biomass accumulation of periphytic diatom growing on glass slides during a 1-year cycle in a subtropical estuarine environment (Bay of Paranaguá, southern Brazil). *Mar. Biol.*, **138**: 163-171.
- BRESSAN M., M.G. MARIN AND R. BRUNETTI (1991). Effects of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on skeletal development of sea urchin embryos (*Paracentrotus lividus* LMK). *Water Res.*, **25**: 613-616.

- BRIX K.V., R.D. CARDWELL AND W.J. ADAMS (2003). Chronic toxicity of arsenic to the Great Salt Lake brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **54**: 169-175.
- BRIX K.V., D.K. DEFOREST, R.D. CARDWELL AND W.J. ADAMS (2004). Derivation of a chronic site-specific water quality standard for selenium in the Great Salt Lake, Utah, USA. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**: 606-612.
- BURTON A.G., JR. AND J.F. NORDSTROM (2004). An *in situ* toxicity identification evaluation method. Part I: laboratory validation. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**: 2844-2850.
- BURTON A.G., JR. AND J.F. NORDSTROM (2004). An *in situ* toxicity identification evaluation method. Part II: field validation. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**: 2851-2855.
- BURTON G.A. JR., M.S. GREENBERG, C.D. ROWLAND, C.A. IRVINE, D.R. LAVOIE, J.A. BROOKER, L. MOORE, D.F.N. RAYMER AND R.A. MCWILLIAM (2005). In situ exposure using caged organisms: a multi-compartment approach to detect aquatic toxicity and bioaccumulation. *Environ. Pollut.*, **134**: 133-144.
- BUTLER R., P.M. CHAPMAN, P. VAN DEN HURK, B. RODDIE AND J.E. THAIN (1992). A comparison of north american and west european oyster embryo-larval toxicity tests on North Sea sediment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **91**: 245-251.
- BYRNE P.A. AND J. O'HALLORAN (1999). Aspects of Assaying Sediment Toxicity in Irish Estuarine Ecosystems. *Mar. Poll. Bull.*, **39(1-12)**: 97-105.
- BYRNE P.A. AND J. O'HALLORAN (2000). Acute and Sublethal Toxicity of Estuarine Sediments to the Manila Clam, *Tapes semidecussatus*. *Environ. Toxicol.*, **15(5)**: 456-468.
- BYRNE P.A. AND J. O'HALLORAN (2001). The role of bivalve molluscs as tools in estuarine sediment toxicity testing: a review. *Hydrobiologia*, **465**: 209-217.
- CAIRNS J. JR (1983). Are single-species toxicity tests alone adequate for estimating environmental hazard? *Hydrobiologia*, **100**: 47-57.
- CALOW P. (Ed.) (1993). *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Sciences.
- CARLI A. E M. A. FIORI (1977). Sviluppo larvale del *Tigriopus fulvus* Fischer. *Atti IX Congr. Soc. Ital. Biol. Mar.*: 181-190.
- CARLI A., D. CHIAPPERINI, T. VALENTE AND S. VIGNOLA (1984). Chemical characteristics of rockpools in the Spanish Mediterranean coast and evaluation of fatty acids in populations of *Tigriopus* sp. (Harpacticoida). *CRUSTACEANA, Internationa Journal of Crustacean Research*, supplement 7: 110-121.
- CARLI A., F. COLACELO E T. VALENTE (1983). Variazioni stagionali degli acidi grassi in popolamenti di *Tigriopus fulvus* delle pozze di scogliera della Costa Ligure (Copepoda, Harpacticoda). *Atti Soc. Ital. Sci. Nat. Museo Civ. Nat. Milano*, **124(1-2)**: 11-20.
- CARLI A., G.L. MARIOTTINI AND L. PANE (1989). Reproduction of the rockpools harpacticoid copepod *Tigriopus fulvus* (Fischer 1860), suitable for aquaculture. *XII Congrès international d'Aquariologie*: 295-300.
- CARLI A., G.L. MARIOTTINI AND L. PANE (1995). Influence of nutrition on fecundity and survival in *Tigriopus fulvus* Fischer (Copepoda: Harpacticoda). *Aquaculture*, **134**: 113-119.
- CARLI A., L. PANE, L. CASARETO, S. BERTONE AND C. PRUZZO (1993). Occurrence of *Vibrio alginolyticus* in Ligurian Coast Rock Pools (Tyrrhenian Sea, Italy) and Its Association with the Copepod *Tigriopus fulvus* (Fischer 1860). *Appl. Environ. Microbiol.*, **59(6)**: 1960-1962.
- CARLI A., V. BALESTRA, L. PANE E T. VALENTE (1989). Rapporto di composizione percentuale degli acidi grassi nel *Tigriopus fulvus* delle pozze di scogliera della Costa Ligure (Copepoda Harpacticoda). *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **65(5)**: 421-427.
- CARR R.S., M. NIPPER, W.J. ADAMS, W.J. BERRY, G.A. BURTON, JR., K. HO, D. MACDONALD, R. SCROGGINS, P.V. WINGER (2001a). Summary of the SETAC Workshop on Porewater Toxicity Testing: Biological, Chemical, and Ecological Considerations with a Review of Methods and Applications, and Recommendations for Future Areas of Research; 18-22 March 2000; Pensacola, FL. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). Pensacola, FL. 38 p.

- CARR R.S., M. NIPPER, J. BIEDENBACH AND R. HOOTEN (2001b). Survey Data Report in Support of the Sediment Ecological Risk Assessment at the Calcasieu Estuary, Louisiana: Sediment Porewater Toxicity Tests and Dissolved Organic Carbon Analysis of Pore Water
- CARR R.S., M. NIPPER, J.M. BIEDENBACH, R.L. HOOTEN, K. MILLER AND S. SAEPOF (2001c). Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) Studies at Marine Sites Suspected of Ordnance Contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 41: 298-307.
- CARR S.R. (2001d). Toxicity Testing of Sediments from BEST/EMAP Western Coastal Monitoring Study. USGS Biomonitoring of Environmental Status and Trends Program. US Geological Survey: 11 pp.
- CARR R.S. AND M. NIPPER (2003). Historical overview of porewater toxicity testing. In: R.S. Carr, M. Nipper (eds.). *Porewater Toxicity Testing: Biological, Chemical, and Ecological Considerations*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry Press, Pensacola, FL: 1-10.
- CARR R.S., M. NIPPER AND GG. BOUCHOT (2004). Final Report on Toxicity Testing of Sediments from the Sian Ka'an Biosphere Reserve, Quintana Roo, Mexico.
- CASADO-MARTINEZ M.C., N. FERNANDEZ, J.M. FORJIA, T.A. DEL VALLS (2007). Liquid versus solid phase bioassays for dredged material toxicity assessment. *Environment International*, 33: 456-462.
- CASTILLO M., M.C. ALONSO, J. RIU, M. REINKE, G. KLÖTER, H. DIZER, B. FISCHER, P.D. HANSEN AND D. BARCELÓ (2001). Identification of cytotoxic compounds in European wastewaters during a field experiments. *Anal. Chim. Acta*, 426: 265-277.
- CATAUDELLA S. E G.C. CANADA (2000). - Un mare di risorse. *Ed Consorzio Uniprom Roma – SFOP 2080/93*.
- CAVALETTO M., A. GHEZZI, B. BURLANDO, V. EVANGELISTI, N. CERATTO AND A. VIARENGO (2002). Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. & Pharmacol. CBP*, 131(4): 447-455.
- CAVALLO R.A., M.I. ACQUAVIVA, F. BIANCOLINO, M. NARRACCI, L. STABILI AND E. PRATO. 2005. Bioassays utilization for toxicity assessment of sediments. *Biologia Marina Mediterranea*, 12(1): 248-252.
- CAVALLO R.A., M.I. ACQUAVIVA, E. PRATO, F. BIANCOLINO AND M. NARRACCI (2005). *Vibrio fischeri*, *Corophium insidiosum* and *Gammarus aequicauda* utilization for toxicity assessment of sediments along Ionian coast (Taranto Italy). 40° EMBS 21-25/08 Wien. *Book of Abstract*: 99-100.
- CESARI P. (1994). I molluschi della laguna di Venezia. Arsenale Ed., Verona: 189 pp.
- CHAPMAN P.M. AND F. WANG (2001). Assessing sediment contamination in estuaries. *Environ. Contam. Toxicol.*, 20: 3-22.
- CHAPMAN P.M., R.C. SWARTZ, B. RODDIE, H.L. PHELPS, P. VAN DEN HURK AND R. BUTLER (1992). An international comparison of sediment toxicity tests in the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91: 253-264.
- CHELAZZI G., G. SERRA AND G. BUCCIARELLI (1996). Zonal recovery after experimental displacement in two sea urchins co-occurring in the Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 212: 1-7.
- CHOONG A.M.F., S.L.M. TEO, J.L. LEOW, H.L. KOH AND P.C.L. HO (2006). A preliminary ecotoxicity study of pharmaceuticals in the marine environment. *J. Toxicol. Environ. Health (Part A)*, 69(21): 1959-1970.
- CIARELLI S. (1994). Guideline for conducting 10-day static sediment toxicity tests using marine or estuarine amphipods. Report from the Tidal Water Division, Middelburg, The Netherlands. *Report RIKZ-94.031*.
- CICERO A.M., F. SAVORELLI, F. GELLI, D. PALAZZI, L. PREGNOLATO, A. RONCARATI AND G. CASAZZA (2001). Use of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae, obtained from controlled reproduction, as biological indicator in acute toxicity tests. *Proc. 6th International Conference of the Aquatic Ecosystem Health and Management Society (AEHMS) "Aquatic Ecosystems Health: Barometer of Integrity and Sustainable Development"*, 4-7 novembre 2001, Amsterdam (The Netherlands): 77.
- CICERO A.M., L. MARIANI, F. SAVORELLI, A. RONCARATI, F. GELLI, D. PALAZZI E I. PREGNOLATO (2004). Prove preliminari di riproducibilità intralaboratorio nella conduzione di saggi ecotossicologici con *Dicentrarchus labrax* (L.). *Biol. Mar. Medit.*, 11(2): 496-498.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS (2001). TITLE 40, PROTECTION OF ENVIRONMENT, CHAPTER I-ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Volume 28, PART 797--ENVIRONMENTAL EFFECTS TESTING GUIDELINES, Subpart B-Aquatic Guidelines, Sec. 797.1330 Daphnid chronic toxicity test. Revised as of July 1, 2001 from the U.S. Government Printing Office via GPO Access.

COHEN J.B., B.A. RATTNER AND N.H. GOLDEN (2003). Use of Retrospective Data to Assess Ecotoxicological Monitoring Needs for Terrestrial Vertebrates Residing in Atlantic Coast Estuaries. *Ecotoxicology*, **12**: 365-375.

COMASCHI A., F. ACRI, F. BIANCHI, M. BRESSAN AND E. CAMATTI (2000). Temporal changes of species belonging to *Acartia* genus (Copepoda: Calanoida) in the Northern Basin of the Venice Lagoon. *Bollettino del Museo Civico di Storia Naturale Venezia*, **50**: 189-193.

CONTI D., S. BALZAMO, M. BELLI, V. BELLARIA, F. GELLI, L. PREGNOLATO, F. SAVORELLI E L. PANTALEONI (2005). Determinazione della concentrazione di non-effetto (NOEC) a 9 giorni e test del micro-nucleo per valutazioni di genotossicità su *Dicentrarchus labrax*. *Atti del 2° Convegno Nazionale di Ecotossicologia*, Torino, 12-13 maggio 2005: 178-182.

CORRÀ C., G. D'AMICO, V. PIAZZA, G. GRECO, F. GARAVENTA, M. FAIMALI AND L. PANE (2006). Preliminary standardization of a chronic toxicity assay for oil dispersants using *Balanus amphitrite* larvae. *SETAC Europe 16th Annual Meeting, Controversies and Solutions in Environmental Sciences*, 7 - 11 May 2006. The Hague, The Netherlands.

COSTAN G, BERRNINGHAM N, BLAKE C, FERARD JF (1992). Potential Ecotoxic Effects Probe (PEEP): a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. Unpublished manuscript. Centre Saint-Laurent, Environment -Canada Montréal, Québec.

COTOU E., A. GREMARE, F. CHARLES, I. HATZIANESTIS AND E. SKLIVAGOU (2005). Potential toxicity of resuspended particulate matter and sediments: Environmental samples from the Bay of Banyuls-sur-Mer and Thermaikos Gulf. *Continental Shelf Res.*, **25**: 2521-2532.

CRIFE G.M (2006). Contaminated sediment testing with the bivalve *Mulinia lateralis*: culture refinement for organism availability. *Environ. Toxicol. Chem.*, **25**: 1332-1336.

CRUSCANTI M., G. SBRILLI, E. BACCI, M. BUCCI E C. GAGGI (1997). I batteri luminescenti: variazioni stagionali ed effetti di uno scarico termico sull'abbondanza e composizione in specie in acque costiere temperate. *Biologi Italiani*, n.11 Dicembre 1997.

D.D. 23/12/2002. Definizione delle procedure per il riconoscimento di idoneità dei prodotti disperdenti ed assorbenti da impiegare in mare per la bonifica dalla contaminazione da idrocarburi petroliferi. In: *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*, n° 35 del 12/02/2003.

DALSGARD T. AND D. JRAUSE-JENSEN (2006). Monitoring nutrient release from fish farms with macroalgal and phytoplankton bioassays. *Aquaculture*, **256**: 302-320.

DAN WALL V., J. LONDON, J.E. WARREN, R. GOSSETT, M.D. WENHOLZ AND S.J. KLAINE (1998). Development of a continuous-flow renewal system for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.*, **17**: 1159-1164.

DAUVIN J.C. (1988a). Biologie, dynamique, et production de populations de crustacés amphipods de la Manche occidentale. 1. *Ampelisca tenuicornis* (Liljeborg). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **118**: 55-84.

DAUVIN J.C. (1988b). Biologie, dynamique, et production de populations de crustacés amphipods de la Manche occidentale. 2. *Ampelisca brevicornis* (Costa). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **119**: 213-233.

DAUVIN J.C. (1988c). Biologie, dynamique, et production de populations de crustacés amphipods de la Manche occidentale. 3. *Ampelisca typica* (Bate). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **121**: 1-22.

DAUVIN, J.C. 1988d. Life cycle, dynamics and productivity of Crustacea-Amphipoda from the western English Channel. 4. *Ampelisca armoricana* (Bellan-Santini et Dauvin). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **123**: 235-252.

DAUVIN J.C. (1988e). Life cycle, dynamics and productivity of Crustacea-Amphipoda from the western English Channel. 5. *Ampelisca sarsi* (Chevreux). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **128**: 31-56.

DAUVIN J.C. AND D. BELLAN-SANTINI (1990). An overview of the amphipod genus *Haploops* (Ampeliscidae). *J. Mar. Biol. Ass. UK*, **70**: 887-903.

- DAVOREN M., S. NÍ SHÚILLEABHÁIN, J. O'HALLORAN, M.G.J. HARTL, D. SHEEHAN, N.M. O'BRIEN, F.N.A.M. VAN PELT, C. MOTHERSILL. 2005. A Test Battery Approach for the Ecotoxicological Evaluation of Estuarine Sediments. *Ecotoxicology*, 14: 741-755.
- DE WITT T.H., R.C. SWARTZ AND J.O. LAMBERSON (1989). Measuring acute toxicity of estuarine sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, **8**: 1035-1048.
- DE WITT, T.H., C.W. HICKEY, D.J. MORRISEY, M.G. NIPPER, D.S. ROPER, R.B. WILLIAMSON, L. VAN DAM AND E.K. WILLIAMS (1999). Do amphipods have the same concentration-response to contaminated sediment in situ as in vitro ? *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**: 1026-1037.
- DESAI D.V., A.C. ANIL AND K. VENKAT (2006). Reproduction in *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia: Thoracica): influence of temperature and food concentration. *Marine Biology*, **149**: 1431-1441.
- DI CAPUA E., M. GIACCO, L. GORI, E. MASSETI E G. SBRILLI (2001). Determinazione della tossicità dei sedimenti portuali con *D. tertiolecta* e *V. fischeri*. *Biologi Italiani*, Anno XXXI, n.9 Ottobre 2001.
- DINNEL P.A., G. PAGANO AND P.S. OSHIDA (1988). A sea urchin test system for marine environmental monitoring. In: R.D. Burke, P.V. Mladenov and R.L. Parsley (Eds.). *Echinoderm Biology, Proceedings of the Sixth International Echinoderm Conference*, Balkema, Rotterdam: 611-619.
- DIRECTIVE 2000/60/EC. Directive of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *OJ*, L 327 (22.12.2000):1-72.
- DOERDING P.H. (1982). Reduction of the sea star predation by the burrowing response of the hard clam *Mercentaria mercenaria* (Mollusco: Bivalvia). *Estuaries*, **5**: 310-315.
- DOLCETTI L., L. DALLA ZUANNA AND P. VENIER (2002). DNA adducts in mussels and fish exposed to bulky genotoxic compounds. *Mar. Environ. Res.*, **54(3-5)**: 481-486.
- DUCROT V., P. USSEGLIO-POLATERA, A.R.R. PÉRY, J. MOUTHON, M. LAFONT, M.-C. ROGER, J. GARRIC AND J.F. FÉRARD (2005). Using aquatic macroinvertebrates species traits to build test batteries for sediment toxicity assessment: Accounting for the diversity of potential biological responses to toxicants. *Env. Toxicol. Chem.*, **24(9)**: 2306-2315.
- DURAKO M.J. AND J.I. KUNZELMAN (2002). Photosynthetic characteristics of *Thalassia testudinum* measured in situ by pulse-amplitude modulated (PAM) fluorimetry: methodological and scale-based considerations. *Aquat. Bot.*, **73**: 173-185.
- ECETOC (1993). Aquatic Toxicity Data Evaluation. ECETOC: 64 pp.
- EEA (2003). Testing of indicators for the marine and coastal environment in Europe. Part 3: Present state and development of indicators for eutrophication, hazardous substances, oil and ecological quality, European Environment Agency Technical Report 86.
- EISLER R. (1979). Behavioural responses of marine poikilotherms to pollutants. *Phil. Trans. Royal Society London B*, **286**: 507-521.
- EKLUND B. (2005). Development of a growth inhibition test with the marine and brackish water red alga *Ceramium tenuicorne*. *Mar. Pollut. Bull.*, **50**: 921-930.
- EKLUND, B. AND L. KAUTSKY (2003). Review on toxicity testing with marine macroalgae and the need for method standardization exemplified with copper and phenol. *Mar. Pollut. Bull.*, **46**: 171 – 181.
- EN ISO 10253 (2006). Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*. CEN: 12 pp.
- ENVIRONMENT CANADA (1992). Biological test method: Acute test for sediment toxicity using marine or estuarine amphipods. Report SPE 1/RM/26. Ottawa, ON.
- ENVIRONMENT CANADA (1993a). Genotoxicity using the *Escherichia coli* PQ37 bacterium (SOS Chromotest). Montreal, PQ.
- ENVIRONMENT CANADA (1993). Evaluation of the PEEP index and recommended toxicity tests for the Fraser River Basin. DOE FRAP 1993-09: 59 pp.
- ENVIRONMENT CANADA (1994). Guidance document on collection and preparation of sediments for physicochemical characterization and biological tests, Report EPS 1/RM/29, Ottawa, ON.

- ENVIRONMENTAL BIO-DETECTION PRODUCTS (1995). ToxiChromo-Pady—Instructions for Use, Ver 3.1. Brampton, ON, Canada.
- FABBROCINI A., A. GUARINO, T. SCIROCCO, M. FRANCHI AND R. D'ADAMO (2005). Integrated bio-monitoring assessment of the Lesina lagoon (Southern Adriatic coast, Italy): Preliminary results. *Chemistry & Ecology*, **21(6)**: 479-489.
- FABIANI C. AND G. CASAZZA (2002). Needs of ecotoxicological methods in Italian and European Union legislations in the field of water policy. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **38(2)**:149-153.
- FAIMALI M., M. MODENA, C. FALUGI, L. GALLUS, S. OLIVERI, M. FRANZONI, M. PERUZZO, E. GIACCO, V. PIAZZA, F. GARAVENTA, F. MAGILLO, G. GRECO AND C. CORRÀ (2006a). Comparison and complementarity of different tests for environmental monitoring. *Marine Environmental Research*, **62**: S384-S385 Suppl. S, 2006.
- FAIMALI M., F. GARAVENTA, E. CHELOSSI, V. PIAZZA, O.D. SARACINO, F. RUBINO, G.L. MARIOTTINI AND L. PANE (2006b). A new photodegradable molecule as a low impact ballast water biocide: efficacy screening on marine organisms from different trophic levels. *Marine Biology*, **149**: 7-16.
- FAIMALI M., F. GARAVENTA, V. PIAZZA, F. MAGILLO, G. GRECO, C. CORRÀ, E. GIACCO, L. GALLUS AND C. FALUGI (2006c). Swimming speed alteration of larvae of *Balanus amphitrite* as behavioural end-point for laboratory toxicological bioassays. *Marine Biology*, **149**: 87-96.
- FAIMALI M., F. GARAVENTA, V. PIAZZA, G. GRECO, C. CORRÀ AND G. D'AMICO (2008). Mortality, settlement inhibition and swimming speed alteration of larvae of *Balanus amphitrite* as acute, chronic and behavioural end-point for laboratory toxicological bioassays. *Biol. Mar. Med.* (In press).
- FALACE A. AND G. BRESSAN (2002). Evaluation of the influence of inclination of substrate panels on seasonal changes in a macrophytobenthic community. *ICES Jour. Mar. Sci.*, **59**: S116-S121.
- FARABEGOLI A., I. FERRARI, C. MANZONI E A. PUGNETTI (1989). Prima segnalazione nel Mare Adriatico del copepode calanoide *Acartia tonsa* Dana. *Nova Thalassia*: **10**, 207-208.
- FARAPONOVA O., D. DE PASCALE, F. ONORATI AND M.G. FINOIA (2005). *Tigriopus fulvus* (Copepoda, Harpacticoda) as a target species in biological assays. *Meiofauna Marina*, **14**: 91-95.
- FARAPONOVA O., M.A. TODARO, F. ONORATI E M.G. FINOIA (2003). Sensibilità sesso ed età specifica di *Tigriopus fulvus* (Copepoda, Harpacticoida) nei confronti di due metalli pesanti (Cadmio e Rame). *Bol. Mar. Medit.*, **10(2)**: 679-681.
- FARRÉ M. AND D. BARCELÓ (2001). Characterization of wastewater toxicity by means of a whole-cell bacterial biosensor, using *Pseudomonas putrida*, in conjunction with chemical analysis. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **371**: 467-473.
- FARRE M., O. PASINI, M.C. ALONSO, M. CASTILLO AND D. BARCELÓ (2001). Toxicity assessment of organic pollution in wastewaters using a bacterial biosensor. *Anal. Chim. Acta*, **426**: 155-165.
- FENGQI L (1996). Production and Application of Rotifers in Aquaculture. *Aquaculture Magazine*, **22(3)**:16-22.
- FENWICH G.D. (1984). Life-history tactics of brooding Crustacea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **84**: 247-264.
- FERRETTI J.A., D.F. CALESSO, J.M. LAZORCHAK AND C.O. DURHAM (2002). Evaluation of reduced sediment volume toxicity test procedures using the marine amphipod *Ampelisca abdita*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **21(11)**: 2372-2377.
- FICHET D., G. RADENAC AND P. MIRAMAND (1998). Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: Bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity. *Mar. Pollut. Bull.*, **36**: 509-518.
- FORBES, V.E., A. PLAMQVIST AND L. BACH (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.*, **25**: 272-280.
- FORD A.T. AND T.F. FERNANDES (2005). Better the devil you know? A precautionary approach to using amphipods and daphnids in endocrine disruptor studies. *Environ. Toxicol. Chem.*, **24**: 1019-1021.
- FORGET J., B. BELIAEFF AND G. BOCQUENE (2003). Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquat Toxicol.*, **62(3)**:195-204.

- FORGET, J., J.F. PAVILLON, M.R. MENASRIA AND G. BOCQUENE (1998). Mortality and LC50 values for several stages of the marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Muller) exposed to the metals arsenic and cadmium and the pesticides atrazine, carbofuran, dichlorvos, and malathion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **40(3)**: 239-44.
- FRANCESE M. AND D. TRALDI (2001). Impiego di cisti di *Brachionus plicatilis* per saggi ecotossicologici in ambiente marino. *Biol. Mar. Medit.*, **8(2)**: 103-109.
- FRANCESE M. AND D. TRALDI (2003). First ecological survey in the Miramare Marine Reserve (Gulf of Trieste, Italy). *Bollettino di Geofisica Teorica ed Applicata*, **44(1)**: 33-42.
- FRANGIPANE G., A. VOLPI GHIRARDINI, F. COLLAVINI, L. ZAGGIA, A. PESCE AND D. TAGLIAPIETRA (2005). Heavy metals in *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae) and salt marsh sediments from the Lagoon of Venice (Italy). *Chemistry and Ecology*, **21(6)**: 441-454.
- FRANKLIN N.M., J.L. STAUBER AND R.P. LIM (2004). Development of multispecies algal bioassays using flow cytometry. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**: 1452-1462.
- FRENZILLI G., M. NIGRO, V. SCARCELLI, S. GORBI, F. REGOLI (2001). DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. *Aquatic Toxicology*, **53(1)**: 19-32.
- GALLAGHER E. D. AND K. E. KEAY (1998). Organism-sediment-contaminant interactions in Boston Harbor. In: K. D. Stolzenbach and E. E. Adams (Eds.). *Contaminated Sediments in Boston Harbor*. MIT Sea Grant Publication **98(1)**: 89-132.
- GEFFARD O., A. GEFFARD, H. BUDZINSKI, C. CROUZET, R. MENASRIA, J. AMIARD AND C. AMIARD-TRIQUET (2005). Mobility and potential toxicity of sediment-bound metals in a tidal estuary. *Environ. Toxicol.*, **20(4)**: 407-17.
- GEFFARD O., E. HIS, H. BUDZINSKI, M. SEAMAN ET P. GARRIGUES (2001). Qualité biologique de l'eau de mer évaluée in situ par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie*, **324**: 1149-1155.
- GEFFARD O., H. BUDZINSKI AND E. HIS (2004). The effects of decanted sediments on embryogenesis in oysters (*Crassostrea gigas*). *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**: 1655-1661.
- GELLI F., C. NOVI, D. PALAZZI, L. PREGNOLATO, P. L. TRENTINI, A.M. CICERO, F. SAVORELLI, A. RONCARATI E P. MELOTTI (2001). Effetti di un tossico di riferimento (Sodio laurilsolfato) sulla schiusa di uova e sulla sopravvivenza di stadi larvali e giovanili di branzino (*Dicentrarchus labrax*). *Atti della Conferenza Internazionale di Acquacoltura*, 26-27 aprile 2001, Verona: 63.
- GELLI F., A.M. CICERO, P. MELOTTI, A. RONCARATI, L. PREGNOLATO, F. SAVORELLI, D. PALAZZI E G. CASAZZA (2002a). Valutazione del bioaccumulo di inquinanti nei tessuti di giovanili di *Dicentrarchus labrax* (L.) in saggi ecotossicologici a lungo termine, condotti in aree di transizione. *Atti del 3° Convegno Nazionale di Scienze del Mare (CoNISMa) "Ambienti estremi ed aree di transizione"*, Bari, 27-30 novembre 2002: 113.
- GELLI F., L. PREGNOLATO, D. PALAZZI, F. SAVORELLI E A. RONCARATI (2002b). Proposta di saggio di tossicità prolungato con differenti specie ittiche (*Alburnus alburnus alborella*, *Cyprinus carpio* e *Carassius auratus*). *Biol. Amb.*, **16(1)**: 52-56.
- GELLI F., A.M. CICERO, P. MELOTTI, A. RONCARATI, L. PREGNOLATO, F. SAVORELLI, D. PALAZZI AND G. CASAZZA (2002c). Proposta di metodo per la valutazione della qualità di acque marine, salmastre e di sedimenti: messa a punto di saggi biologici a 7 e 28 giorni con stadi larvali e giovanili di *Dicentrarchus labrax* (L.). *Atti del 3° Convegno Nazionale di Scienze del Mare (CoNISMa) "Ambienti estremi ed aree di transizione"*, Bari, 27-30 novembre 2002: 112.
- GELLI F., A.M. CICERO, P. MELOTTI, A. RONCARATI, L. PREGNOLATO, F. SAVORELLI, D. PALAZZI, L. MARIANI E G. CASAZZA (2003a). Impiego di stadi larvali e giovanili di *D. labrax* (L.) in saggi biologici: valutazione della qualità di acque marine, salmastre e di sedimenti attraverso test acuti. *Biol. Mar. Medit.* **10(2)**: 137-200.
- GELLI F., A.M. CICERO, P. MELOTTI, A. RONCARATI, L. PREGNOLATO, F. SAVORELLI, D. PALAZZI, L. MARIANI E G. CASAZZA (2003b). Monitoraggio di acque marino-costiere secondo il D. L.vo 152/99 (aggiornato dal D. L.vo 258/00): messa a punto di saggi biologici acuti, prolungati, cronici e di bioaccumulo con la specie ittica branzino (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Atti della XXI Giornata dell'Ambiente promossa dall'Accademia Nazionale dei Lincei*, Roma, 5 giugno 2003.

- GELLI F., A.M. CICERO, P. MELOTTI, A. RONCARATI, L. PREGNOLATO, F. SAVORELLI, D. PALAZZI AND G. CASAZZA (2004). A proposal of method to evaluate the quality of marine waters: optimization of 7 days bioassays using *Dicentrarchus labrax* (L.) juveniles. *Chemistry and Ecology*, **20**(supplement 1): 225-229.
- GELLI F., D. PALAZZI, L. PREGNOLATO, F. VENTURINI, F. SAVORELLI, S. MODUGNO, B. FLORIS, A. RONCARATI, D. CONTI E R. SPAGGIARI (2005a). Sostanze prioritarie: i pesci (*Dicentrarchus labrax*, *Cyprinus carpio*) quali organismi bersaglio in test ecotossicologici, di bioconcentrazione e in saggi finalizzati a valutazioni di genotossicità. *Atti del Congresso "Progetto Nazionale di Monitoraggio delle Acque Superficiali – Sintesi delle attività progettuali"*, Firenze, 27 aprile 2005: 19-26.
- GELLI F., F. SAVORELLI, B. FLORIS, A. RONCARATI, L. PREGNOLATO, P.L. TRENTINI, L. PANTALEONI, D. CONTI E V. BELLARIA (2005b). Impiego del branzino (*Dicentrarchus labrax*, L.) quale organismo bersaglio in test ecotossicologici e di bioconcentrazione. *Biol. Mar. Medit.*, **12**(1): 684-687.
- GERACI S. AND V. ROMAIRONO (1990). Allevamento di Larve di Cirripedi. *Nova Thalassia*, **11**: 329-335.
- GERHARDT A., M.K. INGRAM, I.J. KANG AND S. ULITZUR (2006). In situ on line toxicity biomonitoring in water: Recent developments. *Environ. Toxicol. Chem.*, **25**: 2263-2271.
- GIANGUZZA P., M. CHIANTORE, C. BONAVIRI, R. CATTANEO-VIETTI, I. VIELMINI AND S. RIGGIO (2006). The effects of recreational *Paracentrotus lividus* fishing on distribution patterns of sea urchins at Ustica Island MPA (Western Mediterranean, Italy). *Fish. Res.*, **81**: 37-44.
- GIESY J.P. AND R.A. HOKE (1989). Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection. *J. Great Lakes Res.*, **15**: 539-569.
- GIRLING A.E., A.M., RIDDLE, G.M., MITCHELL, P.K., CHOWN, D., TINSLEY, C., BUCKLER, I., JOHNSON AND R., BENSTEAD (2004). Estimating patterns of effluent concentrations in direct toxicity assessment studies. *Ecotoxicology*, **13**: 449-461.
- GIUDICE G. (1986). The sea urchin embryo, a developmental biology system. Springer Verlag, Berlin Heidelberg: 1-246.
- GORBI G., S. SEI, M. INVIDIA AND F. BETTONI (2006). Toxicity tests on egg/nauplius stages of *Acartia tonsa*: a new bioassay proposal. *Biol. Mar. Medit.*, **13**(1): 1081-1084.
- GRAILLET C., G. PAGANO AND J.P. GIRARD (1993). Stage-specific effects of teratogens on sea urchin embryogenesis. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **130**: 1-14.
- GRAVATO C. AND SANTOS M.A. (2003). *Dicentrarchus labrax* biotransformation and genotoxicity responses after exposure to a secondary treated industrial/urban effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **55**: 300-306.
- GRECO G., A. DI FINO, C. CORRÀ, F. GARAVENTA, M. PITTORE AND M. FAIMALI (2006a). Swimming speed alteration assay with *Balanus amphitrite* larvae in environmental samples (sediments elutriates) testing. *SETAC Europe 16th Annual Meeting, Controversies and Solutions in Environmental Sciences*, 7 - 11 May 2006. The Hague, The Netherlands.
- GRECO G., C. CORRÀ, F. GARAVENTA, E. CHELOSSI AND M. FAIMALI (2006b). Standardization of laboratory bioassays with *Balanus amphitrite* larvae for preliminary oil dispersants toxicological characterization. *Chemistry and Ecology*, **22**(1): 163-172.
- GROSJEAN P., C. SPIRLET, P. GOSSELIN, D. VAITILINGON AND M. JANGOUX (1998). Land-based closed-cycle echiniculture of *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinoidea: Echinodermata): a long-term experiment at a pilot scale. *J. Shellfish Research*, **17**(5): 1523-1531.
- GUERZONI S. E D. TAGLIAPIETRA (a cura di) (2006). Atlante della Laguna. Venezia tra terra e mare. Marsilio Editore, Venezia.
- GUETTAF M., G.A. SAN MARTIN AND P. FRANCOUR (2000). Interpopulation variability of the reproductive cycle of *Paracentrotus lividus* in the south western mediterranean. *J. Mar. Biol. Ass.*, **80**: 899-907.
- GUIDETTI P., A. TERLIZZI AND F. BOERO (2004). Effects of the edible sea urchin, *Paracentrotus lividus*, fishery along the apulian rocky coast (SE Italy, Mediterranean Sea). *Fish. Res.*, **66**: 287-297.
- GUIDETTI P., S. FRASCHETTI, A. TERLIZZI AND F. BOERO (2003). Distribution patterns of sea urchins and barrens in shallow Mediterranean rocky reefs impacted by the illegal fishery of the rock-boring mollusc *Lithophaga lithophaga*. *Mar. Biol.*, **143**: 1135.

- GUZZELLA L. (1996). Saggio di tossicità acuta con *Artemia* sp. *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA- CNR*, ISSN: 0392-1425: 1-6.
- GUZZELLA L. (1997). Saggio di tossicità acuta con *Artemia* sp. *Biologia Ambientale*, **1**: 4-9.
- HAMZA-CHAFFAI A., J.C. AMIARD, J. PELLERIN, J. LOUX AND B. BERTHET (2000). The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes desussatus* as a biomarker of in situ metal exposure. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, **127**: 185-197.
- HARTWELL SI (1997). Demonstration of a toxicological risk ranking method to correlate measures of ambient toxicity and fish community diversity. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**: 361-371.
- HASTINGS M.H. (1981). The life cycle and productivity of an intertidal population of the amphipod *Ampelisca brevicornis*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **12**: 665-677.
- HEBEL D.K., M.B. JONES AND M.H. DEPLEDGE (1997). Responses of crustaceans to contaminant exposure: a holistic approach. *Est. Coast. Shelf Sci.*, **44**: 177-184.
- HEISE S. AND W. AHLF (2005). A New Microbial Contact Assay for Marine Sediments. *J. Soils Sed.*, **5**: 9-15.
- HELSON J.G. AND J.P.A. GARDNER (2004). Contrasting patterns of mussel abundance at neighbouring sites: does recruitment limitation explain the absence of mussels on Cook Strait (New Zealand) shores ? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **312**: 285-298.
- HERBST T. AND M. NANDZA (2000). Inventory of Marine Biotest Methods for the Evaluation of Dredged Material and Sediments. Umweltbundesamt Research Report 298 25 753 UBA-FB 000046.
- HERNROTH L (1983). Marine pelagic rotifers and tintinnids; important trophic links in the spring plankton community of the Gullmar Fjord, Sweden. *J. Plankton Res.*, **5**: 835-846.
- HIS E., R. BEIRAS, M.N.L. SEAMAN, N.M. TRIEFF AND G. PAGANO (1996). Sublethal and lethal toxicity of aluminium industry effluent to early development stages of the *Crassostrea gigas* oyster. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, **30**: 335-339.
- HIS E., SEAMAN R.N.L. AND R. BEIRAS (1997a). A simplified bivalve larval bioassay method for seawater quality assessment. *Water Res.*, **31**: 351-355.
- HIS E., H. BUDZINSKI, O. GEFFARD ET R. BEIRAS (1997b). Action d'un sédiment pollué par les hydrocarbures sur la métamorphose de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *C R Acad Sci Paris, Sciences de la vie*, **320**: 797-803.
- HIS E., R. BEIRAS AND M. SEAMAN (1999a). The assessment of aquatic contamination: bioassays with bivalve larvae. *Advances in Marine Biology*, **37**: 1-178.
- HIS E., I. HEYVANG, O. GEFFARD AND X. DE MONTAUDOUIN (1999b). A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res.*, **33**: 1706-1718.
- HOEKZEMA C.C., A.J. MURK, B.J. VAN DE WAART, J.C.M. VAN DER HOEVEN AND D.F. DE ROODE (2006). Alternative approaches can greatly reduce the number of fish used for acute toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.*, **25**: 1322-1325.
- HOKE R.A. AND G.T. ANKLEY (2005). Application of frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* to ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, **24**: 2677-2690.
- HOLDWAY D.A (1996). The role of biomarkers in risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment*, **2**: 263-267.
- HOSE G.C., B.R. MURRAY, M.L. PARK, B.P. KELAHER AND W.F. FIGUEIRA (2006). A meta-analysis comparing the toxicity of sediments in the laboratory and *in situ*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **25**: 1148-1152.
- HUANG Y.-W., J.B. MATTHEWS, K.C. FERTUCK AND T.R. ZACHAREWSKI (2005). Use of *Xenopus laevis* as a model for investigating *in vitro* and *in vivo* endocrine disruption in amphibians. *Environ. Toxicol. Chem.*, **24**: 2002-2009
- ICES (1997). Report of the ICES Advisory Committee on the Marine Environment (1997). ICES Cooperative Research Report no. 222: 12-20.

- INVIDIA M., S. SEI AND G. GORBI (2004). Survival of the copepod *Acartia tonsa* following egg exposure to near anoxia and to sulfide at different pH values. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **276**: 187-196.
- IRSA-CNR (1978). Metodologia di saggio algale per lo studio della contaminazione delle acque marine. IRSA-CNR, Quaderni dell'Istituto di Ricerca sulle Acque n. 39 - IT ISSN 0390-6329. Milano.
- ISO (1993a). Water quality - Vocabulary - Part 3. AMENDMENT 1. ISO 6107-3: 22 pp.
- ISO (1993b). Water quality - Sampling in deep waters for macro-invertebrates - Guidance on the use of colonization, qualitative and quantitative samplers. ISO 9391: 13 pp.
- ISO (1999a). Water quality - Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish - Semi-static method. ISO 12890: 14 pp.
- ISO (1999b). Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). ISO 14669: 16 pp.
- ISO (2005). Water quality — Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods. ISO 16712.
- ISO (2004). Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO 8692: 15 pp.
- ISO (2006). Water quality: determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) – part 3: method using freeze-dried bacteria. Reference number: ISO/CD 11348-3.
- JHA A.N., T.H. HUTCHINSON, J.M. MACKAY, B.M. ELLIOTT AND D.R. DIXON (1996). Development of an *in vivo* genotoxicity assay using the marine worm *Platynereis dumerilii* (Polychaeta; nereidae). *Mutation Res.*, **359**: 141-150.
- JHA A.N., T.H. HUTCHINSON, J.M. MACKAY, B.M. ELLIOTT AND D.R. DIXON (2000a). Development of an *in vivo* genotoxicity assay using the marine worms *Platynereis dumerilii* (Polychaeta; Nereidae). *Mutation Res.*, **359**: 141-150.
- JHA A.N., V.V. CHEUNG, M.E. FOULKES, S.J. HILL AND M.H. DEPLEGGE (2000b). Detection of genotoxins in marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mutation Res.*, **464**: 213-228.
- JOHNSON B.T. AND E.R. LONG. (1998). Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems: A new tandem in vitro testing approach. *Environ. Toxicol. Chem.*, **17**: 1099-1106.
- JOHNSON I., M. HUTCHINGS, R. BESTEAD, J. THAIN AND P. WHITEHOUSE (2004). Bioassay Selection, Experimental Design and Quality Control/Assurance for use in Effluent Assessment and Control. *Ecotoxicology*, **13**: 437 – 447.
- KAIM-MALKA R.A (1970). Biologie et écologie de quelques *Ampelisca* (Crustacea- Amphipoda) de la région de Marseille. *Tethys*, **1**: 977-1022.
- KAMMANN U., J.C. RIGGERS, N. THEOBALD, H. STEINHART (2000). Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. *Mutation Res.*, **467**: 161-168.
- KASCHL A. AND A. CARBALLEIRA (1999). Behavioural responses of *Venerupis decussata* (Linnaeus, 1758) and *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) to copper-spiked marine sediments. *Boletín de Instituto Espanol de Oceanografía*, **15(1-4)**: 383-394.
- KATER B.J., J.F. POSTMA, M. DUBBELDAM AND J.T.H.J. PRINST (2001). Comparison of laboratory and in situ sediment bioassays using *Corophium volutator*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 1291-1295.
- KITAZATO H. 1995. Recolonization by deep-sea benthic foraminifera: possible substrate preferences. *Mar. Micropaleontol.*, **26**: 65-74.
- KLEIN G., E. RACHOR AND S.A. GERLACH (1975). Dynamics and productivity of two populations of the benthic tube-dwelling amphipod *Ampelisca brevicornis* (Costa) in Helgoland Bight. *Ophelia*, **14**: 139-159.
- KONAR, B. AND M.D. STEPHENSON (1995). Gradients of subsurface water toxicity to oyster larvae in bays and harbours in California and their relation to mussel watch bioaccumulation data. *Chemosphere*, **30(1)**: 165-172.

- KRAMER K.J., H.A. JENNER AND D. DE ZWART (1989). The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia*, **188/189**: 433-443.
- KRÖGER S., S. PILETSKY AND A.P.F. TURNER (2002). Biosensors for marine pollution research, monitoring and control. *Mar. Poll. Bull.*, **45**: 24-34.
- KUHN A., W.R. MUNNS, J. SERBST, P. EDWARDS, M.G. CANTWELL, T. GLEASON, M.C. PELLETIER AND W. BERRY (2002). Evaluating the ecological significance of laboratory response data to predict population-level effects for the estuarine amphipod *Ampelisca abdita*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **21(4)**: 865-874.
- KWAN K.K. (1993). Direct solid phase toxicity testing procedure. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, **8**:345–350.
- KWAN K.K. (1995). Direct sediment toxicity testing procedure using sediment chromotest kit. *Environ. Toxicol. Wat Qual.*, **9**: 193-196.
- KWOK K.W. AND K.M. LEUNG (2005). Toxicity of antifouling biocides to the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda): effects of temperature and salinity. *Mar. Pollut. Bull.*, **51(8-12)**: 830-837.
- LAM P.K.S., K.T. WO AND R.S.S. WU (2000). Effects of cadmium on the development and swimming behavior of barnacle larvae *Balanus amphitrite* Darwin. *Environ. Toxicol.*, **15(1)**: 8 – 13.
- LEE, Y.M. T.J. PARK, S.O. JUNG, J.S. SEO, H.G. PARK, A. HAGIWARA, Y.D. YOON AND J.S. LEE (2006). Cloning and characterization of glutathione S-transferase gene in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* and its expression after exposure to endocrine-disrupting chemicals. *Mar. Environ. Res.*, **62** Suppl: S219-223.
- LEGAULT R., C. BLAISE, S. TROTTIER AND P.A. WHITE (1996). Detecting genotoxic activity in industrial effluents using the SOS chromotest microplate assay. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, **11**:151–165.
- LERA S. AND D. PELLEGRINI (2006). Evaluation of the fertilization capability of *Paracentrotus lividus* sea urchin stored gametes by the exposure to different aqueous matrices. *Environ. Monit. Assess.*, **119**: 1-13.
- LERA S., S. MACCHIA AND D. PELLEGRINI (2006). Standardizing the methodology of sperm cell test with *Paracentrotus lividus*. *Environ. Monit. Assess.*, **122**: 101-109.
- LERA S., S. MACCHIA, L. DENTONE AND D. PELLEGRINI (2008). Variations in sensitivity of two populations of *Corophium orientale* (Crustacea: Amphipoda) towards cadmium and sodium laurylsulphate. *Environ. Monit. Assess.*, **136**: 121-127.
- LIBRALATO G. (2007). Validation of ecotoxicological methods for wastewater monitoring to be discharged to marine-coastal and transitional environments – advanced technologies for wastewater treatment (sbr and mbr) as case studies. Tesi di dottorato. Università Ca' Foscari di Venezia, Dipartimento di Scienze Ambientali.
- LIBRALATO G., A. VOLPI GHIRARDINI AND F. AVEZZÙ (2010). Toxicity removal efficiency of decentralised sequencing batch reactor and ultra-filtration membrane bioreactors. *Water Research*, in press, doi:10.1016/j.watres.2010.06.006
- LIBRALATO, G., F. AVEZZÙ AND A. VOLPI GHIRARDINI (2010). How toxic is toxic? A proposal for wastewater toxicity hazard assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, in press, doi:10.1016/j.ecoenv.2010.03.007
- LIU A-M, LO A-L, HU C-Y. 2003. Application of two-stage fuzzy set theory to river quality evaluation in Taiwan. *Water Res.*, **37**: 1406-1416.
- LONG E.R., C.B. HONG AND C.G. SEVERN (2001). Relationships between acute sediment toxicity in laboratory tests and abundance and diversity of benthic infauna in marine sediments: A review. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 46-60.
- LOSSO C. 2004. Valutazione dell'applicabilità all'ambiente lagunare e validazione di saggi tossicologici che utilizzano specie autoctone. Tesi di dottorato. Università Ca' Foscari di Venezia, Dipartimento di Scienze Ambientali.
- LOSSO C., A. ARIZZI NOVELLI, M. PICONE, A. VOLPI GHIRARDINI, P.F. GHETTI, D. RUDELLO AND P. UGO (2004). Sulphide as a confounding factor in toxicity tests with sea urchin *Paracentrotus lividus*: comparisons with chemical analysis data. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23(2)**:396-401.

- LOSSO C., A. ARIZZI NOVELLI, M. PICONE, D. MARCHETTO, G. PESSA, E. MOLINAROLI, P.F. GHETTI AND A. VOLPI GHIRARDINI (2004a). Evaluation of surficial sediment toxicity and sediment physico-chemical characteristics of representative sites in the Lagoon of Venice (Italy). *Journal of Marine Systems*, **51**: 281-292.
- LOSSO C., E. HIS, P.F. GHETTI AND A. VOLPI GHIRARDINI (2004b). Sensitivity of embryotoxicity test with *Mytilus galloprovincialis* (LMK) towards some compounds of environmental interest (copper and pesticides). *Environ. Technol.*, **25(7)**: 841-846.
- LOSSO C., A. ARIZZI NOVELLI, M. PICONE, P.F. GHETTI AND A. VOLPI GHIRARDINI (2006). Pore water as a matrix in toxicity bioassays with sea urchins and bivalves: extracting procedure choice in relation to toxicological response. Poster presented at SETAC Europe 16th Annual Meeting, The Hague, The Netherlands 7-11 May 2006.
- LOSSO C., M. PICONE, A. ARIZZI NOVELLI, E. DELANEY, P.F. GHETTI, A. VOLPI GHIRARDINI (2007a). Developing toxicity scores for embryotoxicity tests on elutriates with the sea urchin *Paracentrotus lividus*, the oyster *Crassostrea gigas* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Contam. Toxicol.*, **53**: 220-226.
- LOSSO C., A. ARIZZI NOVELLI, M. PICONE, D. MARCHETTO, C. PANTANI, P.F. GHETTI AND A. VOLPI GHIRARDINI (2007b). Potential role of sulphide and ammonia as confounding factors in elutriate toxicity bioassays with early life stages of sea urchins and bivalves. *Ecotoxic. Environ. Saf.*, **66**:252-257.
- LOSSO C., A. ARIZZI NOVELLI, M. PICONE, P.F. GHETTI AND A. VOLPI GHIRARDINI (2009). Porewater as a matrix in toxicity bioassays with sea urchins and bivalves: Evaluation of applicability to the Venice Lagoon (Italy). *Environment International*, **35**: 118-126.
- LYNDON A.R. (1999). Fish Growth in Marine Culture Systems: A Challenge for Biotechnology. *Mar. Biotechnol.*, **1**: 376-379.
- LYTLE J.S. AND T.F. LYTLE (2001). Use of plants for toxicity assessment of estuarine ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 68-83.
- MACHELLA N., M. BATTINO, B. PISANELLI, F. REGOLI (2006). Influence of the SCGE Protocol on the amount of basal DNA damage detected in the Mediterranean Mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Mol. Mutag.*, **47**: 579 - 586.
- MACINNIS-NG C.M.O. AND P.J. RALPH (2003). In situ impact of petrochemicals on the photosynthesis of the seagrass *Zostera capricorni*. *Mar. Pollut. Bull.*, **46**: 1395-1407.
- Macinnis-Ng, C.M.O. and P.J. Ralph. 2003. *In situ* impact of petrochemicals on the photosynthesis of the seagrass *Zostera capricorni*. *Mar. Pollut. Bull.*, **46**: 1395-1407.
- MAGALETTI E., F. ONORATI, O. FARAPONOVA, L. MARIANI, A. TORNAMBÈ AND A.M. CICERO (2006). Ecotoxicological Tests for the Approval of Oil Dispersants and Absorbents to Be Used at Sea. *SETAC Europe 16th Annual Meeting*. The Hague, The Netherlands 7-11 May 2006. Abstract Book: 96, MO1/KL/P168.
- MAGILLO V., M. FAIMALI AND S. GERACI (2003). Effect of cadmium chloride on the swimming behaviour of *Balanus amphitrite* (Crustacea: cirripedia) larvae. *Biol. Mar. Med.*, **10(2)**: 1014-1017.
- MANFRA L., B. DI LORENZO, V. BELLARIA, B. FLORIS, I. GARTNER, F. GELLI, T. LEONI, C. LOSSO, F. MARTELLI, L. MIGLIORE, D. PALAZZI, P. RIGHINI, E. MAGALETTI E F. SAVORELLI (2007). Attività di interconfronto sul saggio acuto di immobilizzazione con *Artemia franciscana*. *Biol. Mar. Mediterr.*, **14(1)**: 68-72.
- MANFRA L., F. SAVORELLI, L. MIGLIORE, E. MAGALETTI, A.M. CICERO (2009). Saggio di tossicità a 14 giorni con *Artemia franciscana*: validazione del metodo. *Biol. Mar. Mediterr.*, **14(2)**: 15-18.
- MANZO S., S. BUONO AND C. CREMISINI (2006). Toxic effects of irgarol and diuron on sea urchin *Paracentrotus lividus* early development, fertilization, and offspring qualità. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **51**: 61-68.
- MANZO S., F. DE LUCA PICIONE, R. CAROTENUTO E A. ROCCO (2007). Utilizzo di una batteria di test ecotossicologici nel monitoraggio delle acque marine. *Biol. Mar. Mediterr.*, **14(1)**: 152-155.
- MANZO S., S. BUONO AND C. CREMISINI (2008). Predictability of copper, irgarol, and diuron combined effects on sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **54**: 57-68.

- MARIANI L. E F. SAVORELLI (2005). Attività sperimentale: pesci. In: *Sperimentazione di test tossicologici su organismi marini ai fini dell'applicabilità del D.D. 23.12.2002*. Min. Ambiente e Tutela del Territorio. Rapporto finale programma di ricerca TAXA: Cap.6: 79-127.
- MARIANI L., A. TORNAMBÈ, E. MAGALETTI, F. ONORATI, C. VIRNO LAMBERTI AND A.M. CICERO (2005). The acute toxicity responses of *Dicentrarchus labrax* (post larvae and juveniles) to diethylene glycol exposure: introductory remarks. *Proceeding of 12th International Symposium on toxicity assessment*. Skiathos, Greece 12-17/6 2005: 123.
- MARIANI L., D. DE PASCALE, O. FARAPONOVA, A. TORNAMBÈ, A. SARNI, S. GIULIANI, G. RUGGIERO, F. ONORATI AND E. MAGALETTI (2006). Use of a test battery for evaluation of sodium dodecil sulfate (SDS) acute toxicity in the marine environment. *Environmental Toxicology*, **21**(4): 373-379.
- MARIANI L., F. SAVORELLI, V. BELLARIA, F. CADONI, M. CIGAR, F. DE LUCA PICIONE, M. FRANCESE, E. GIACCO, S. MANZO, C. MARTONE, P. MASULLO, S. MODUGNO, D. PALAZZI, L. PANE, G. SANSONE E B. DI LORENZO (2007). Impiego del branzino (*Dicentrarchus labrax*, l. 1758) in esercizi di interconfronto. sperimentazione per la validazione e normazione della metodica di test tossicologici acuti con specie ittiche marine mediterranee. *Biol.Mar.Medit.*, 14(1): 64-68.
- MARIANI L., L. MANFRA, C. MAGGI, F. SAVORELLI, R. DI MENTO AND A.M. CICERO (2004). Produced formation waters: a preliminary study on chemical characterization and acute toxicity by using fish larvae (*Dicentrarchus labrax* L., 1758). *Fresenius Envir. Bull.*, **13**(12a): 1427-1432.
- MARÍN-GUIRAO L., A. CESAR, A. MARÍN, J. LLORET AND R. VITA (2005). Establishing the ecological quality status of soft-bottom mining-impacted coastal water bodies in the scope of the Water Framework Directive. *Mar. Pollut. Bull.*, **50**: 374-387.
- MARTIN S., J. CLAVIER, J.-M. GUARINI, L. CHAUVAUD, C. HILY, J. GRALL, G. THOUZEAU, F. JEAN AND J. RICHARD (2005). Comparison of *Zostera marina* and maerl community metabolism. *Aquatic Botany*, **83**: 161-174.
- MASINI M.A., P. PRATO, B.M. UVA, G.L. MARIOTTINI E L. PANE (2007). Effetto di tensioattivi e disperdenti in *Sparus aurata* L. *Biol. Mar. Medit.*, **14**(1): 175-177.
- MATRANGA V. AND R. BONAVENTURA (2002). Development of *Paracentrotus lividus* embryos and larvae. In: Y. Yokota, V. Matranga and Z. Smolenicka. (Eds.). *The sea urchin: from basic biology to aquaculture*. Balkema, Lisse, the Netherlands: 223-230.
- MATRANGA V. (2005). Echinodermata. *Series: Progress in Molecular and Subcellular Biology Subseries: Marine Molecular Biotechnology*, **39**: 1-270.
- MAYOR D.J., M. SOLAN, I. MARTINEZ, L. MURRAY, H. MCMILLAN, G.I. PATON, K. KILLHAM (2008). Acute toxicity of some treatments commonly used by the salmonid aquaculture industry to *Corophium volutator* and *Hediste diversicolor*: Whole sediment. *Aquaculture*, **285**: 102-108.
- MCCARTY L.S. AND K.R. MUNKITTRICK (1996). Environmental biomarkers in aquatic toxicology: Fiction, fantasy or functional? *Human and Ecological Risk Assessment*, **2**: 268-274.
- MCCORMICK P.V., J.R. PRATT, G.G. JENKINS AND J. CAIRNS Jr. (1988). A comparison of protozoan, algal, and metazoan colonization of artificial substrates of different sizes. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, **107**: 259-268.
- MCCREADY S., G. SPYRAKIS, C.R. GREELY, G.F. BIRCH AND E.R. LONG (2004). Toxicity of surficial sediments from Sidney Harbour and vicinity, Australia. *Environ. Monit. Assess.*, **96**: 53-83.
- MCGREER E.R. 1979. Sublethal effects of heavy metal contaminated sediments on the bivalve *Macoma balthica* (L.). *Mar. Poll. Bull.*, **10**: 259-262.
- MICHELETTI C., A. CRITTO, C. CARLON AND A. MARCOMINI (2004). Ecological risk assessment of persistent toxic substances for the clam *Tapes philipinarum* in the Lagoon of Venice, Italy. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**: 1575-1582.
- MILLS, E.L. 1967. The biology of an ampeliscid amphipod crustacean sibling species pair. *J. Fish. Res. Board Can.*, **24**: 305-335.
- MIRTO S. AND R. DANOVARO (2004). Meiofaunal colonisation on artificial substrates: a tool for biomonitoring the environmental quality of coastal marine systems. *Mar. Poll. Bull.*, **48**: 919-926.

- MISITANO D.A. AND M.H. SCHIEWE (1990). Effect of chemically contaminated marine sediment on naupliar production of the marine harpacticoid copepod, *Tigriopus californicus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **44** (4): 636-642.
- MOODLEY L., C.H.R. HEIP AND J.J. MIDDELBURG (1998). Benthic activity in sediments of the northwestern Adriatic Sea: sediment oxygen consumption, macro- and meiofauna dynamics. *J. Sea Res.*, **40**: 263-280.
- MOREIRA DOS SANTOS M., I. MORENO-GARRIDO, F. GONÇALVES, A.M.V.M. SOARES AND R. RIBEIRO (2002). An in situ bioassay for estuarine environments using the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**: 567-574.
- MOREIRA S.M., M. MOREIRA-SANTOS, L. GUILHERMINO AND R. RIBEIRO (2005). A short-term sublethal in situ toxicity assay with *Hediste diversicolor* (Polychaeta) for estuarine sediments based on postexposure feeding. *Environ. Toxicol. Chem.*, **24**: 2010-2018.
- MOREIRA S.M., M. MOREIRA-SANTOS, L. GUILHERMINO AND R. RIBEIRO (2006a). Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* in alginate for in situ experiments: Bead stability and suitability. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**: 135-141.
- MOREIRA, S.M., L. GUILHERMINO AND R. RIBEIRO (2006b). An in situ assay with the microalga *Phaeodactylum tricorutum* for sediment-overlying water toxicity evaluations in estuaries. *Environ. Contam. Toxicol.*, **25**: 2272-2279.
- MORIARTY F. (1990). *Ecotoxicology. The Study of Pollutants in Ecosystems*. Academic Press: 289 pp.
- MORRONI, L. (2011). Saggi biologici *in situ* con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* per la valutazione della qualità ambientale delle acque marino-costiere. Tesi di laurea presso l'università degli studi di Pisa, Corso di laurea in Biologia Marina, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali.
- MUGNAI C., BRAIDA T., PELLEGRINI D., BARGHIGIANI C., SCERBO R., VOLPI GHIRARDINI A., BIGNONGIARI N. (2001). Test di bioaccumulo con il polichete *Hediste diversicolor*. *Biol. Mar. Mediterr.*, **8**(2): 72-84.
- MUGNAI C., MACCHIA S., SARTI F., ABBIATI M., REGOLI F., PELLEGRINI D. (2007). Study of processes of metal accumulation and subcellular partitioning in *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae). *Biol. Mar. Mediterr.*, **14**(1): 82-85.
- NARRACCI M., R.A. CAVALLO, M.I. ACQUAVIVA, F. BIANCOLINO AND E. PRATO (2007). *Vibrio harvey* e *Vibrio alginolyticus*: il loro effetto embriotossico in *Mytilus galloprovincialis*. *Atti 38° SIBM*, Santa Margherita Ligure, 28 maggio - 2 giugno 2006: 244-245.
- NASCI C., N. NESTO, R.A. MONTEDURO, L. DA ROS (2002). Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy). *Mar. Environ. Res.*, **54**(3-5): 811-816.
- NEHLS S. AND H. SEGNER (2005). Comet assay with the fish cell line rainbow trout gonad-2 for in vitro genotoxicity testing of xenobiotics and surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.*, **24**: 2978-2087.
- NEILL M. (2005). A method to determine which nutrient is limiting for plant growth in estuarine waters – at any salinity. *Mar. Pollut. Bull.*, **50**: 945-955.
- NENDZA M. (2002). Inventory of marine biotest methods for the evaluation of dredged material and sediments. *Chemosphere*, **48**: 865-883.
- NEUBERGER-CYWIAK L., Y. ACHITUV AND E.M. GARCIA (2003). Effects of zinc and cadmium on the burrowing behavior, LC50, and LT50 on *Donax trunculus* Linnaeus (Bivalvia-Donacidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **70**: 713-722.
- NIPPER M., R.S. CARR, J.M. BIEDENBACH, R.L. HOOTEN AND K. MILLER (2002). Toxicological and chemical assessment of ordnance compounds in marine sediments and porewaters. *Mar. Pollut. Bull.*, **44**: 789-806.
- NOCCIOLINI S., L. SPADAFINA, M.R. VACRI AND E. BACCI (2000). A simple bacterial index for relative water quality: Preliminary application in the Orbetello lagoon (Tuscany, Italy). *Chemosphere*, **41**: 1065-1069.
- NORTON B.L., M.A. LEWIS AND F.L. MAYER (1999). Storage Duration and Temperature and the Acute Toxicities of Estuarine Sediments to *Mysidopsis bahia* and *Leptocheirus plumulosus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **63**: 157-166.

- OCCHIPINTI AMBROGI A., M. FAVRUZZO AND D. SAVINI (2002). Multi-annual variations of macrobenthos along the Emilia-Romagna coast (Northern Adriatic). *P.S.Z.N. I. Mar. Ecol.*, **23**: 1-13.
- ODUM E.P. (1984). The mesocosm. *Bioscience*, **34**: 558-562.
- OECD (1984a). Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-days Study. In: *Guideline for Testing of Chemicals* n°204, adopted 04/04/1984: 9 pp.
- OECD (1984b). Guidelines for the testing of chemicals. OECD, Paris.
- OECD (1992a). Report of the OECD workshop on extrapolation of laboratory aquatic toxicity data to the real environment. OECD Environment Monographs No 59, Paris.
- OECD (1992b). Fish, Acute Toxicity Test. In: *Guideline for Testing of Chemicals* n°203, adopted 17/07/1992: 9 pp.
- OECD (1998). *Daphnia magna* Reproduction Test. *Guideline for Testing of Chemicals* n° 211, adopted 21/09/1998: 21 pp.
- OLLA B.L., W.H. PEARSON AND A.L. STUDHOLME, 1980. Applicability of behavioural measures in environmental stress assessment. *Rapports et Proces-verbaux des Reunions Conseil International pour l'Exploration de la Mer.*, **179**: 162-173.
- OMS (2004). Guideline for safe recreational waters: Vol. 1. Coastal and fresh water. http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/srwe1/en/
- ONORATI F., MECOZZI M. (2004). Effects of two diluents in the Microtox® toxicity bioassay with marine sediments. *Chemosphere*, **54**: 679-687.
- ONORATI F., PELLEGRINI D., AUSILI A. (1998). Sediment toxicity assessment with *Photobacterium phosphoreum*: a preliminary evaluation of natural matrix effect. *Fresenius Environ. Bull.*, **7**: 596-604
- ONORATI F., N. BIGONGIARI, D. PELLEGRINI AND S. GIULIANI (1999). The suitability of *Corophium orientale* (Crustacea, Amphipoda) in harbour sediment toxicity bioassessment. *Aquatic Ecosystem and Management*, **2**: 465-473.
- ONORATI F., SARNI A., FARAPONOVA O., RUGGIERO G. (2007). Ruolo dei nutrienti e della salinità come possibili fonti di interferenza sull'esito di alcuni saggi biologici. *Biol. Mar. Medit.*, **14(1)**: 181-185.
- OSPAR Commission (1995). PARCOM Protocols on methods for the testing of chemicals used in the offshore oil industry. ISBN 0946956448: 35 pp.
- OSPAR Commission (1997). JAMP Guidelines for General Biological Effects Monitoring.
- OSPAR Commission (1999). JAMP Guidelines for Monitoring Contaminants in Biota. Ref. No. 1999-2.
- OSPAR Commission (2002). Survey on Genotoxicity Test Methods for the Evaluation of Waste Water within Whole Effluent Assessment.
- OSPAR Commission (2003). Survey of the use of effect related methods to assess and monitor wastewater discharges. Testing of endocrine effects.
- OSPAR Commission (2005a). Protocol for a Fish Acute-Toxicity Test. In: *Protocols on Methods for the Testing of Chemicals Used in the Offshore Oil Industry*, ref. n. 2005-11: 26 pp.
- OSPAR Commission (2005b). Synergies in Assessment and Monitoring between OSPAR and the European Union. Analysis of synergies in assessment and monitoring of hazardous substances, eutrophication, radioactive substances and offshore industry in the North-East Atlantic. Volume I.
- OSPAR Commission (2005c). Whole Effluent Assessment.
- OSPAR Commission (2007). Practical Guidance Document on Whole Effluent Assessment. Publication n. 316/2007.
- OSPAR/ICES (2004). Workshop on the evaluation and update of background reference concentrations (B/RCs) and ecotoxicological assessment criteria (EACs) and how these assessment tools should be used in assessing contaminants in water, sediment and biota. 9 – 13 February 2004, The Hague.

- PAGANO, G., M. CIPOLLARO, G. CORSALE, A. ESPOSITO, E. RAGUCCI, G.G. GIORDANO AND N.M. TRIEFF (1985). Comparative toxicities of chlorinated biphenyls on sea urchin egg fertilization and embryogenesis. *Mar. Environ. Res.*, **17**: 240-244.
- PAGANO G., M. CIPOLLARO, G. CORSALE, A. ESPOSITO, E. RAGUCCI, G.G. GIORDANO AND N.M. TRIEFF (1986). The sea urchin: Bioassay for the assessment of damage from environmental contaminants, In: J. Cairns, Jr. (Ed.). *Community Toxicity Testing*. ASTM STP 920: 67-92.
- PAGANO G., M. CIPOLLARO, G. CORSALE, A. ESPOSITO, G.G. GIORDANO, E. RAGUCCI AND N.M. TRIEFF (1988). Comparative toxicities of benzene, chlorobenzene and dichlorobenzene to sea urchin embryos and sperm. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **40**: 481-488.
- PAGANO G., B. ANSEMI, P.A. DINNEL, A. ESPOSITO, M. GUIDA, M. IACCARINO, G. MELLUSO, M. PASCALE AND N.M. TRIEFF (1993). Effects on sea urchin fertilization and embryogenesis of water and sediment from two rivers in Campania, Italy. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **25**: 20-26.
- PAGANO, G., L.G. KORKINA, M. IACCARINO, A. DE BIASE, I.B. DEEVA, Y.K. DORONIN, M. GUIDA, G. MELLUSO, S. MERIÇ, R. ORAL, N.M. TRIEFF AND M. WARNAU (2001). Developmental, cytogenetic and biochemical effects of spiked or environmentally polluted sediments in sea urchin bioassays. In: P. Garrigues, C.H. Walker and H. Barth (Eds.). *Biomarkers in Marine Ecosystems: A Practical Approach*. Elsevier, Amsterdam.
- PANE L., M. FELETTI E A. M. CARLI (1996). Fattori ambientali e fluttuazioni della popolazione del copepode *Tigriopus fulvus* delle pozze di scogliera di Genova – Nervi (Mar Ligure). *S. It. E. Atti* **17**: 317-320.
- PARCOM (1995). A sediment bioassay using an amphipod *Corophium* sp. PARCOM protocols on methods for the testing of chemicals used in the offshore industry. Oslo and Paris Commissions, London: 35 pp.
- PARVEZ S., C. VENKATARAMAN AND S. MUKHERJI (2006). A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environ. Internat.*, **32**: 265-268.
- PEARSON W.H., D.L. WOODRUFF, P.C. SUGARMAN AND B.L. OLLA (1981). Effects of oiled sediment on predation on the littleneck clam, *Prothotaca staminea*, by the Dungeness crab, *Cancer magister*. *Est. Coast. Shelf Sci.*, **13**: 445-454.
- PELERIN J., B. VINCENT ET E. PELLETIER (1993). Evaluation écotoxicologique de la qualité de la baie des Anglais (Québec). *Wat. Pollut. Res. J. Can.*, **28**: 665-689.
- PELLEGRINI D., A. AUSILI, F. ONORATI, G. CIUFFA, M. GABELLINI, N. BIGONGIARI AND S. DE RANIERI (1999). Characterisation of harbour and coastal sediments: specific destinations of dredged material. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, **2**: 455-464.
- PEREIRA A.M.M., A.M.V.M. SOARES, F. GONÇALVES AND R. RIBEIRO (1999). Test chambers and test procedures for in situ toxicity testing with zooplankton. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**: 1956-1964.
- PERSOONE G., A. VAN DE VEL, M. VAN STEERTEGEM AND B. DE NAYER (1989). Predictive value of laboratory test with aquatic invertebrates: influence of experimental conditions. *Aquatic Toxicology*, **14**: 149-167.
- PETERS C. AND W. AHLF (2005). Reproduction of the estuarine and marine amphipod *Corophium volutator* (Pallas) in laboratory for toxicity testing. *Chemosphere*, **59**: 525-536.
- PETERS C., S. BECKER, U. NOACK, S. PFITZNER, W. BÜLOW, K. BARZ, W. AHLF AND R. BERGHAHN (2002). A Marine Bioassay Test Set to Assess Marine Water and Sediment Quality – its Need, the Approach and First Results. *Ecotoxicology*, **11**: 379-383.
- PETERSEN J.K., O. SCHOU AND P. THOR (1997). In situ growth of the ascidian *Ciona intestinalis* (L.) and the blue mussel *Mytilus edulis* in an eelgrass meadow. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **218**: 1-11.
- PHELPS H.L., J.T. HARDY, W.H. PEARSON AND C.W. APTS (1983). Clam burrowing behaviour: inhibition by copper-enriched sediment. *Mar. Pollut. Bull.*, **14**: 452-455.
- PHELPS H.L. (1989). Clam Burrowing Bioassay for Estuarine Sediment. *Bull. Environ. Toxicol.*, **43**: 838-845.
- PHELPS H.L. AND K.A. WARNER (1990). Estuarine sediment bioassay with oyster pediveliger larvae (*Crassostrea gigas*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **44**: 197-204.

- PHELPS H.L., W.H. PEARSON AND J.T. HARDY (1985). Clam Burrowing Behavior and Mortality Related to Sediment Copper. *Mar. Poll. Bull.*, **16**: 309-313.
- PHILLIPS BM, HUNT JW, ANDERSON BS, PUCKETT HM, FAIREY R, WILSON CJ, TJEERDEMA (2001). Statistical significance of sediment toxicity test results: Threshold values derived by the detectable significance approach. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 371-373.
- PHILLIPS B.M., B.S. ANDERSON, J.W. HUNT, S.A. HUNTLEY, R. TJEERDEMA, N. KAPELLAS AND K. WORCESTER (2006). Solid-phase sediment toxicity identification evaluation in an agricultural stream. *Environ. Toxicol. Chem.*, **25**: 1671-1676.
- PICONE M., M. BERGAMIN, A. ARIZZI NOVELLI, S. NOVENTA, S. DELANEY, A. BARBANTI AND A. VOLPI GHIRARDINI (2008). Evaluation of *Corophium orientale* as bioindicator for Venice-Lagoon: sensitivity assessment and toxicity-score proposal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **70**: 174-184.
- PIERCE R.H. AND G.J. KIRKPATRICK (2001). Innovative techniques for harmful algal toxin analysis. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 107-114.
- PIERONI M. AND C. FALUGI (1992). Effects of cholinergic drugs on cell interactions during fertilization and early development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **68**: 16-22.
- PINTO B., D. PELLEGRINI, M. GABELLINI AND A. AUSILI (1995). Harbour and coastal sediments chemistry and toxicology: a preliminary study in dredging activities. *J. Aquat. Ecosyst. Health*, **4**: 1-17.
- PITOMBO F.B (2004). Phylogenetic analysis of the Balanidae (Cirripedia, Balanomorpha). *Zool Scr.*, **33**: 261-276.
- POGGIALE J.C. AND J.C. DAUVIN (2001). Long-term dynamics of three benthic *Ampelisca* (Crustacea-Amphipoda) populations from the Bay of Morlaix (western English Channel) related to their disappearance after the 'Amoco Cadiz' oil spill. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **214**: 201-209.
- POLYAK B., E. BASSIS, A. NOVODVORETS, S. BELKIN AND R.S. MARKS (2000). Optical fiber bioluminescent whole-cell microbial biosensors to genotoxicants. *Water Sci. Technol.*, **42**: 305-311.
- POLYAK B., E. BASSIS, A. NOVODVORETS, S. BELKIN AND R.S. MARKS (2001). Bioluminescent whole-cell optical fiber sensor to genotoxicants: system optimization. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **74**: 18-26.
- POWER E.A. AND R.S. BOUMPHREY (2004). International Trends in Bioassay Use for Effluent Management. *Ecotoxicology*, **13**: 377-398.
- PRATO E. AND F. BIANCOLINO (2003). Seasonal changes in an intertidal population of the amphipod *Gammarus aequicauda* (Martynov, 1931). *Mediterranean Marine Science*, **4(1)**: 49-56.
- PRATO E. AND F. BIANCOLINO (2005). *Gammarus aequicauda* (Crustacea: Amphipoda): a potential species test in marine sediment toxicity assessment. *J. Aquat. Ecosys. Health and Management*, **8(4)**: 475- 482.
- PRATO E., AND F. BIANCOLINO (2006a). Life history of the amphipod *Corophium insidiosum* (Crustacea, Amphipoda) from Mar Piccolo (Ionian sea, Italy). *Scientia marina*, **70(3)**: 355-362.
- PRATO E. AND F. BIANCOLINO (2006b). Factors Influencing the Sensitivity of *Gammarus aequicauda* Population from Mar Piccolo in Taranto (Southern, Italy). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**: 770-774.
- PRATO E. AND F. BIANCOLINO (2006b). *Monocorophium insidiosum* (Crustacea, Amphipoda) as a Candidate Species in Sediment Toxicity Testing. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **77(1)**: 1-8.
- PRATO, E. AND F. BIANCOLINO (2006c). Protocollo per l'utilizzo dell'anfipode *Gammarus aequicauda* nei test di tossicità. *Rapporto Tecnico* n°114/Biologia/E.P&F.B./novembre 2006.
- PRATO E. AND F. BIANCOLINO (2007). Combined toxicity of mercury, copper and cadmium on embryogenesis and early larval stages of the *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Technol.*, **287(8)**: 915-920.
- PRATO, E., F. BIANCOLINO AND C. SCARDICCHIO (2006a). Acute toxicity of Copper, Cadmium and Mercury to four Peracarida and *Mytilus galloprovincialis* larvae. *Journal Turkish of Zoology*, **30**: 285-290.
- PRATO E., A. DI LEO, F. BIANCOLINO AND N. CARDELLICCHIO (2006b). Sediment Toxicity Tests Using Two Species of Marine Amphipods: *Gammarus aequicauda* and *Corophium insidiosum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **76**: 629-636.

- PRATO, E., F. BIANCOLINO AND C. SCARDICCHIO (2006c). Individual and combined toxicity of cadmium, copper and mercury to *Mytilus galloprovincialis*. Congresso di Ecotossicologia. *Biol. Mar. Mediter.*, **14(1)**: 207-209.
- PRATO E., F. BIANCOLINO AND C. SCARDICCHIO (2006d). Sublethal effects of copper on *Mytilus galloprovincialis* larvae. *Biol. Mar. Mediter.*, **13(2)**: 350-351.
- PRATO E., F. BIANCOLINO AND C. SCARDICCHIO (2006i). Postembryonic growth, development and reproduction of *Gammarus aequicauda* (Martynov, 1931) in laboratory culture. *Zoological Studies*, **45(4)**: 503-509.
- PRATO E., M. I. ACQUAVIVA, F. BIANCOLINO, M. NARRACCI AND R. A. CAVALLO (2006l). Bioassays Utilization for Toxicity Assessment of Sediments along Apulia Coast. First International Symposium Environment, Identities and Mediterranean area. Corte. July 2-12. *Book of Abstract*: 320-323.
- PRATO E., C. SCARDICCHIO AND F. BIANCOLINO (2007a). Effects of Temperature on the acute toxicity of Cadmium to *Corophium insidiosum*. *Environmental Monitoring Assessment*. (Published online: 17 March 2007)
- PRATO E., F. BIANCOLINO AND C. SCARDICCHIO (2007b). The effects of salinity on the toxicity of Cadmium to *Corophium insidiosum*. *Biol. Mar. Mediter.*, **14(1)**: 216-218.
- PRATO E., F. BIANCOLINO AND C. SCARDICCHIO (2007c). Sensitivity of *Gammarus aequicauda* population rearing in the laboratory. *Biol. Mar. Mediter.*, **14(1)**:210-212.
- PRATO E., M.I. ACQUAVIVA, F. BIANCOLINO, M. NARRACCI AND R.A. CAVALLO (2007e). A multi-trophic battery of tests for sediment quality assessment. 42° EMBS. Kiel 27-31 Agosto.
- PRATO E., F. BIANCOLINO AND C. SCARDICCHIO (2008). Implications for toxicity tests with amphipod *Gammarus aequicauda*: effects of Temperature and Salinity on life cycle. *Environ. Technol.*, **12**: 1349-1356.
- QIU J.-W., V. THIYAGARAJAN, S. CHEUNG AND P.Y. QIAN (2005). Toxic effects of copper on larval development of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Mar. Poll. Bull.*, **51**: 688–693.
- RALPH P.J., R. GADEMANN AND W.C. DENNISON (1998). In situ seagrass photosynthesis measured using a submersible, pulse-amplitude modulated fluorometer. *Mar. Biol.*, **132**: 367-373.
- RAMADE, F. 1977. Ècotoxicologie. Masson: 205 pp.
- RASHEED M., C. WILD, U. FRANKE AND M. HUETTEL (2004). Benthic photosynthesis and oxygen consumption in permeable carbonate sediments at Heron Island, Great Barrier Reef, Australia. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **59**: 139-150.
- RICE C.A., M.S. MYERS, M.L. WILLIS, B.L. FRENCH AND E. CASILLAS (2000). From sediment bioassay to fish biomarker –connecting the dots using simple trophic relationships. *Mar. Env. Res.*, **50**: 527-533.
- RINGWOOD A.H., M.E. DE LORENZO, P.E. ROSS AND A.F. HOLLAND (1997). Interpretation of Microtox® solid-phase toxicity tests: the effects of sediment composition. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**: 1135-1140.
- RINGWOOD A.H., D.E. CONNERS AND C.J. KEPPLER (1999). Cellular responses of oysters, *Crassostrea virginica*, to metal-contaminated sediments. *Mar. Environ. Res.*, **48**: 427-437
- RINGWOOD A.H. AND C.J. KEPPLER (2002). Comparative in situ and laboratory sediment bioassays with juvenile *Mercenaria mercenaria*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**: 1651-1657
- RITTSCHOF D. AND P. MCCLELLAN-GREEN (2005). Molluscs as multidisciplinary models in environmental toxicology. *Mar. Pollut. Bull.*, **50**: 369-373.
- ROBERTS A.P., J.T. ORIS AND W.A. STUBBLEFIELD (2006). Gene expression in caged juvenile Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to the waters of Prince William Sound, Alaska. *Mar. Poll. Bull.*, **52**: 1527-1532.
- RONCARATI A., F. GELLI, P. MELOTTI, D. PALAZZI, L. PREGNOLATO, F. SAVORELLI, A.M. CICERO E G. CASAZZA (2001). Impiego del branzino (*Dicentrarchus labrax* L.) nello svolgimento di test ecotossicologici: effetti di un tossico di riferimento (sodio laurilsolfato) su diversi stadi vitali. *Rivista Italiana di Acquacoltura*, **36**: 43–52.
- RÖNNPAGEL K., W. LISS AND W. AHLF (1995). Microbial bioassay to assess the toxicity of solid-associated contaminants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **31**: 99-103.

- ROPER D.S. AND C.W. HICKEY (1994). Behavioural responses of the marine bivalve *Macoma liliana* exposed to copper- and chlordane- dosed sediments. *Mar. Biol.*, **118**: 673-680.
- ROPER D.S., M.G. NIPPER, C.W. HICKEY, M.L. MARTIN AND M.A. WEATHERHEAD (1995). Burial, crawling and drifting behaviour of the bivalve *Macomona liliana* in response to common sediment contaminants. *Mar. Poll. Bull.*, **31**: 471-478.
- RUFFO S. (1982). The Amphipoda of the Mediterranean. 1. Gammaridea (Acanthonotozomatidae to Gammaridae). *Mémoires de l'Institut océanographique - Monaco* **13(1)**: 364 pp.
- RUSSO R., R. BONAVENTURA, F. ZITO, H.-C. SCHRÖDER, I. MÜLLER, W.E.G. MÜLLER AND V. MATRANGA (2003). Stress to cadmium monitored by metallothionein gene induction in *Paracentrotus lividus* embryos. *Cell Stress & Chaperones*, **8**: 232-241.
- SALAMANCA, M.J., FERNADEZ, N., CESAR, A., ANTON, R, LOPEZ, P., DELVALLS, A. (2009). Improved seurchin embryo bioassay for in situ evaluation of dredged material. *Ecotoxicology*, **18**:1051-1057.
- SALAZAR M.H. AND S.M. SALAZAR (1995). In situ bioassays using transplanted mussels: Estimating chemical exposure and bioeffects with bioaccumulation and growth. In: Hughes, S.J., Biddinger G.R., Mones E. (Eds.). 1995. *Environmental Toxicity and Risk Assessment*. ASTM. **3**: 216-241.
- SARAIVA M.C. (1973). Étude sur la radiosensibilité d'un copépode benthique, *Tigriopus fulvus* (Fischer). *J. Cons. Int. Explor. Mer*, **35**: 7-12.
- SAVORELLI F., F. GELLI, L. PREGNOLATO, A.M. CICERO, A. RONCARATI, P. MELOTTI E B. FLORIS (2003). Saggio semistatico per il biomonitoraggio di metalli pesanti mediante organismi bioaccumulatori (*Dicentrarchus labrax*). *Atti della Conferenza Internazionale di Acquacoltura*, 15-16 ottobre 2003, Verona: 79.
- SAVORELLI F., S. SEI, G. GORBI, M. INVIDIA, D. PALAZZI, F. GELLI, P.L. TRENTINI E E. MAGALETTI (2006). Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti: applicazione della metodologia di saggio sugli stadi uovo/nauplio del copepode *Acartia tonsa* Dana, 1948. *Biol. Mar. Medit.*, **13(1)**: 1112-1115.
- SAVORELLI F., D. PALAZZI, G. GORBI, M. INVIDIA, S. SEI, E. MAGALETTI, L. MANFRA, F. GELLI (2007). Messa a punto di una metodologia di saggio cronico su *Artemia franciscana* e *A. parthenogenetica*. *Biol. Amb.*, **21(1)**: 27-36.
- SBRILLI G. E M. CRUSCANTI (1999). I batteri marini planctonici, componente fondamentale dell'ecosistema pelagico e sensibili indicatori della qualità delle acque marine costiere. *Biologi Italiani*, Anno XXIX, n. 4, Aprile 1999.
- SBRILLI G., M. BUCCI, L. BRILLI E F. GAMBASSI (1995). Utilizzazione di test di tossicità nel controllo degli scarichi industriali. *Acqua Aria* n. 5, maggio 1995.
- SBRILLI G., M. CRUSCANTI E R. BEDINI (1996a). La componente luminescente del batterioplancton; variazioni stagionali delle specie e della densità nell'alto Tirreno. *Biol. Mar. Medit.*, **4**: 615-618.
- SBRILLI G., M. CRUSCANTI, M. BUCCI, C. GAGGI E E. BACCI (1996b). Batteri eterotrofi e qualità delle acque costiere: studio di un tratto di costa toscana. *Atti del VII Congresso nazionale della S.It.E.* Napoli 11-14 settembre 1996.
- SBRILLI G., M. CRUSCANTI, M. BUCCI, C. GAGGI AND E. BACCI (1997). Marine heterotrophic bacteria as indicators in the quality assessment of coastal waters: Introducing the "Apparent Bacterial Concentration" approach. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**: 135-139.
- SBRILLI G., L. BRILLI E S. MILANI (1999). Utilizzazione del saggio algale per la valutazione della qualità delle acque marine costiere. *Acqua Aria*, **3/99**: 95-101
- SBRILLI G., E. GUERRERA E C. SINISCALCO (2001). La prova di crescita algale con *Dunaliella tertiolecta* nel controllo delle acque marine costiere. *Biol. Mar. Medit.*, **8(2)**: 85-101.
- SBRILLI G., L. BRILLI E S. MILANI (2000). La metodologia di saggio algale nel monitoraggio marino costiero e nella classificazione delle acque marine. *Biologi Italiani* Anno XXX, n. 6 Giugno 2000.
- SCAPS, P. (2002). A review of biology, ecology and potential use of the common ragworm *Hediste diversicolor* (O.F.Muller (Annelida: Polychaeta). *Hydrobiologia*, **470**: 203-218.
- SCHELLENBERG A. (1928). XXXV. Report on the Amphipoda. Zoological results Cambridge expedition to the Suez Canal. *Trans. Zool. Soc. London*, **22**: 633-692.

- SCHRÖDER H.C., G. DI BELLA, N. JANIPOUR, R. BONAVENTURA, R. RUSSO, W.E. MÜLLER AND V. MATRANGA (2005). DNA damage and developmental defects after exposure to UV and heavy metals in sea urchin cells and embryos compared to other invertebrates. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, **39**: 111-37.
- SEA URCHIN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, **314** (5801): 941-52.
- SEI S. AND I. FERRARI (2006). First report of the occurrence of *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) in the Lesina lagoon (south Adriatic Sea- Mediterranean Sea). *J. Mar. Biol. Ass. 2 - Biodiversity Records*. Published online.
- SEI S., G. ROSSETTI, F. VILLA AND I. FERRARI (1996a). Zooplankton variability related to environmental changes in a eutrophic coastal lagoon in the Po Delta. *Hydrobiologia*, **329**: 45-55.
- SEI S., M. INVIDIA AND G. GORBI (2006). Near anoxia and sulfide as possible factors influencing the spatial distribution of *Acartia tonsa* and *A. clausi*: comparative evaluation of egg tolerance. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **337**: 121-130.
- SELLEM F. AND G. MONIQUE (2007). Reproductive biology of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats of northern Tunisia (south-east Mediterranean). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **87**: 763-767.
- SEO J.S., K.W. LEE, J.S. RHEE, D.S. HWANG, Y.M. LEE, H.G. PARK, I.Y. AHN AND J.S. LEE (2006). Environmental stressors (salinity, heavy metals, H₂O₂) modulate expression of glutathione reductase (GR) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquat. Toxicol.*, **80**(3): 281-289.
- SEO, J.S., T.J. PARK, Y.M. LEE, H.G. PARK, Y.D. YOON AND J.S. LEE (2006). Small heat shock protein 20 gene (Hsp20) of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* as a possible biomarker for exposure to endocrine disruptors. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **76**(4): 566-572.
- SEPA (Scottish Environmental Protection Agency) (2003). Technical Guidance Manual for Licensing Discharges to Water. 03-DLM-COPA-EA3, 10 October 2003, 1-24.
- SETAC-Europe (1991). Guidance document on Testing Procedures for Pesticides in Freshwater Static Mesocosms. Workshop 3-4 July 1991, Monks Wood Exp. St., UK.
- SHIN P.K.S., A.W.M. NG AND R.Y.H. CHEUNG (2002). Burrowing responses of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* to sediment contaminants. *Mar. Poll. Bull.*, **45**: 133-139.
- SIMONINI R., I. ANSALONI, A.M. BONVICINI PAGLIAI, F. CAVALLINI, M. IOTTI, M. MAURI, G. MONTANARI, M. PRETI, A. RINALDI AND D. PREVEDELLI (2005a). The effects of sand extraction on the macrobenthos of a relict sands area (northern Adriatic Sea): results 12 months post-extraction. *Mar. Pollut. Bull.*, **50**: 768-777.
- SIMONINI R., I. ANSALONI, F. CAVALLINI, F. GRAZIOSI, M. IOTTI, G. MASSAMBA N'SIALA, M. MAURI, G. MONTANARI, M. PRETI AND D. PREVEDELLI (2005b). Effects of long-term dumping of harbor-dredged material on macrozoobenthos at disposal sites along the Emilia-Romagna coast (Northern Adriatic Sea, Italy). *Mar. Pollut. Bull.*, **50**: 1595-1605.
- SNELL T.W. AND K. CARRILLO (1984). Body size variation among strains of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, **37**:359-367.
- SPIRLET C., P. GROSJEAN AND M. JANGOUX (2000). Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata). *Aquaculture*, **185**: 85-99.
- STAUBER J.L., N.M. FRANKLIN AND M.S. ADAMS (2002). Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *Trends in Biotechnology*, **20**: 141-143.
- STEPHENSON R.R. AND D. TAYLOR (1975). Influence of Edta on Mortality and Burrowing Activity of Clam (*Venerupis decussata*) Exposed to Sub Lethal Concentrations of Copper. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*; **14**: 304-308.
- STRONKHORST, J., M.E. SCHOT, M.C. DUBBELDAM AND K.T. HO (2003a). A toxicity identification evaluation of silty marine harbor sediments to characterize persistent and non-persistent constituents. *Mar. Pollut. Bull.*, **46**: 56-64.

- STRONKHORST J., SCHIPPER C., BRILS J., DUBBELDAM M., POSTMA J., VAN DE HOEVEN N. (2003b). Using marine bioassays to classify the toxicity of Dutch harbor sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**: 1535-1547.
- TAGLIAPIETRA D. AND A VOLPI GHIRARDINI (2006). Notes on coastal lagoon typology in the light of the EU Water Framework Directive: Italy as a case study. *Aquatic Conservation*, **16**: 457-467.
- THAIN J. E. AND J.L. WATTS (1984). The use of a bioassay to measure changes in water quality associated with a bloom of *Gyrodinium aureolum* (Hulburt). *ICES Special Meeting on the Causes, Dynamics and Effects of Exceptional Marine Blooms and Related Events*, Copenhagen, 4-5 October 1984. Paper D:3.
- THOMAS K.V., N. BARNARD, K. COLLINS AND J. EGGLETON (2003). Toxicity characterisation of sediment porewaters collected from UK estuaries using a *Tisbe battagliai* bioassay. *Chemosphere*, **53**: 1105-1111.
- THOMPSON B., B. ANDERSON, J. HUNT, K. TABERSKI AND B. PHILIPS (1999). Relationship between sediment contamination and toxicity in San Francisco Bay. *Mar. Environ. Res.*, **48**: 285-310.
- THURSBY G.B., HELTSHE J., SCOTT K.J. (1997). Revised approach to toxicity test acceptability criteria using a statistical performance assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**: 1322-1329.
- TINSLEY D., J. WHARFE, D. CAMPBELL, P. CHOWN, D. TAYLOR, J. UPTON AND C. TAYLOR (2004). The Use of Direct Toxicity Assessment and Control of Complex Effluents in the UK: A Demonstration Programme. *Ecotoxicology*, **13**: 423-436.
- TODARO M.A., O. FARAPONOVA, F. ONORATI, D. PELLEGRINI E P. TONGIORGI (2001). *Tigriopus fulvus* (Copepoda, Harpacticoda) una possibile specie-target nella valutazione della tossicità dei fanghi portuali: ciclo vitale e prove tossicologiche preliminari. *Bol. Mar. Medit.*, **8(1)**: 896-872.
- TRAINOR F.R. (1984). Indicator algal assays: laboratory and field approaches. In: L.E. Shubert (Ed.). *Algae as ecological indicators*. Academic Press. London: 3-14.
- UNITED NATIONS (2006). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/C.4/. United Nations, New York and Geneva.
- USACE (1991). Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal. Testing Manual USEPA-503-8-90/002: 219 pp.
- USEPA (1974). Marine algal assay procedure bottle test. Eutrophication and Lake Restoration Branch. National Environmental Research Center, Corvallis, Oregon: 43 p.
- USEPA (1988). Methods for toxicity tests of single substances and liquid complex wastes with marine unicellular algae. Environmental Research laboratory, Gulf Breeze, FL, EPA/600/04.
- USEPA (1991). Technical support document for water quality-based toxics control. Office of Water, Washington, D.C.
- USEPA (1993). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms (fourth edition). Weber C.I. Eds. EPA /600/4-90/027F, Ecological monitoring research division, Environmental monitoring system laboratory. Cincinnati, Ohio 45268
- USEPA (1994a). Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods. EPA/600/R-94/025, Washington, D.C.: 140 pp.
- USEPA (1994b). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. Klemm D.J., Morrison G.E., Norberg-Ring J.J., Peltier W.H., Heber M.A., U.S. Environmental Protection Agency. Report EPA-600/4-91/003, Cincinnati, OH.: 483 pp.
- USEPA (1994c). Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms, Method 1008.0," EPA/600/4-91/003 (2 nd Ed.).
- USEPA (1995). Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to West Coast Marine and Estuarine Organisms. EPA/600/R-95/136, Cincinnati, Ohio, U.S.
- USEPA (2000a). Estuarine and Coastal Marine Waters: Bioassessment and Biocriteria Technical Guidance. USEPA- Office of Water EPA-822-b-00-024, 385 pp.
- USEPA (2002a). Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms. Third Edition. EPA-821-R-02-014: 464 pp.

- USEPA, (2000b). Evaluation of approaches to improve the quality and cost-effectiveness of environmental monitoring. Final Report for USEPA/ACS Cooperative Agreement CX-825780-01-0. American Chemical Society, Committee on Environmental Improvement, May 2000: 47 pp.
- USEPA (2002b). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, Fifth Edition, EPA-821-R-02-012: 266 pp.
- USEPA/USACE (1994). Methods for Assessing the Toxicity of Sediment-associated Contaminants with Estuarine and Marine Amphipods. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC.
- VAN BEELEN P. (2003). A review on the application of microbial toxicity tests for deriving sediment quality guidelines. *Chemosphere*, **53**: 795-808.
- VAN DER BRINK P.J. AND B.J. KATER (2006). Chemical and biological evaluation of sediments from the Wadden Sea, The Netherlands. *Ecotoxicology*, **15**: 451-460
- VAN DER HURK P., R.H.M. EERTMAN AND J. SRONKHORST (1997). Toxicity of Harbour Canal sediments before dredging and after off-shore disposal. *Mar. Pollut. Bull.*, **34**: 244-249.
- VAN HUMMELEN P., C. ZOLL, J. PAULUSSEN, M. KIRSCH-VOLDERS AND A. JAYLETN (1989). The micronucleus test in *Xenopus*: A new and simple *in vivo* technique for detection of mutagens in fresh water. *Mutagenesis*, **4**:12-16.
- VENIER P, MARON S., CANOVA S. (1997). Detection of micronuclei in gill cells, haemocytes of mussels exposed to benzo(a)pyrene. *Mutation Res.*, **390**: 33 – 44.
- VIGHI M. E E. BACCI (a cura di) (1998). *Ecotossicologia*. UTET, Torino: 237 pp.
- VINDIMIAN R., GARRIC J., FLAMMARION P., THYBAUD E., BABUTS M. (1999). An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and chronic tests and expert judgements. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**: 2386-2391.
- VINDIMIAN R., J. GARRIC, P. FLAMMARION, E. THYBAUD AND M. BABUTS (1999). An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and chronic tests and expert judgements. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**: 2386-2391.
- VIOLLIER E., C. RABOUILLE, S.E. APITZ, E. BREUER, G. CHAILLOU, K. DEDIEU, Y. FURUKAWA, C. GRENZ, P. HALL, F. JANSSEN, J.L. MORFORD, J.-C. POGGIALE, S. ROBERTS, T. SHIMMIELD, M. TAILLEFORT, A. TENGBERG, F. WENZHÖFER AND U. WITTE (2003). Benthic biogeochemistry: state of the art technologies and guidelines for the future of in situ survey. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **285-286**: 5-31.
- VOLPI GHIRARDINI A. AND D. PELLEGRINI (2001). I saggi di tossicità nella valutazione della qualità di acque e sedimenti di ambienti marini e di transizione: indicazioni per la scelta, la messa a punto, la valutazione e l'utilizzo dei metodi. *Biol. Mar. Medit.*, **8(2)**: 1-16.
- VOLPI GHIRARDINI A., P.F. GHETTI, V. DI LEO AND C. PANTANI (1998). Microtox® solid-phase bioassay in sediment toxicity assessment. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, **26**: 2393-2397.
- VOLPI GHIRARDINI A., L. CAVALLINI, E. DELANEY, D. TAGLIAPIETRA, P.F. GHETTI, E. ARGESE AND C. BETTIOL (1999a). *H. diversicolor*, *N. succinea* e *P. cultrifera* (Polychaeta: Nereididae) as bioaccumulators of cadmium and zinc from sediments: preliminary results in the Venetian lagoon (Italy) *Toxicol. Environ. Chemistry*, **71**: 457-474.
- VOLPI GHIRARDINI A., T. BIRKEMEYER, A. ARIZZI NOVELLI, B. PAVONI AND P.F. GHETTI (1999b). An integrated approach to sediment quality assessment: the Venice lagoon as a case study. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, **2**: 435-447.
- VOLPI GHIRARDINI A., A. ARIZZI NOVELLI, C. LOSSO AND P.F. GHETTI (2003). Sea urchin toxicity bioassays for sediment quality assessment in the Lagoon of Venice (Italy). *Chemistry and Ecology*, **19(2-3)**: 99-111.
- VOLPI GHIRARDINI A., A. ARIZZI NOVELLI AND D. TAGLIAPIETRA (2005a). Sediment toxicity assessment in the Lagoon of Venice (Italy) using *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fertilization and embryo bioassays. *Environment International*, **31**: 1065-1077.
- VOLPI GHIRARDINI A., A. ARIZZI NOVELLI, C. LOSSO AND P.F. GHETTI (2005b). Sperm cell and embryo toxicity tests using the sea urchin *Paracentrotus lividus* (LmK). *Techniques in Aquatic Toxicology*, **2**: 147-168.

- VOLPI GHIRARDINI A., A. ARIZZI NOVELLI, C. LOSSO E E. HIS (2005c). Saggio di embriotossicità con *Mytilus galloprovincialis* per gli ambienti di transizione. *Biol. Mar. Medit.*, **12(1)**: 724-729.
- VOLPI GHIRARDINI A., C. LOSSO, A. ARIZZI NOVELLI, A. BAÙ, E. HIS AND P.F. GHETTI (2005d). *Mytilus galloprovincialis* as bioindicator in embryotoxicity testing to evaluate sediment quality in the lagoon of Venice (Italy). *Chemistry and Ecology*, **21(6)**: 455-463.
- VOLPI GHIRARDINI A., GIRARDINI, D. MARCHETTO AND C. PANTANI (2009). Microtox® Solid Phase Test: Effect of diluent used in toxicity test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**: 851-861.
- WARRIN L.W., S.J. KLAINE AND M.T. FINLEY (1995). Development of a field bioassay with juvenile mussels. *J. North Am. Benthol. Soc.*, **14**: 341-346.
- WEBB J.A. AND M.J. KEOUGH (2002). Measurement of environmental trace-metal levels with transplanted mussels and diffusive gradients in thin films (DGT): a comparison of techniques. *Mar. Poll. Bull.*, **44**: 222-229.
- WEIDEBORG M., E.A. VIK, G.D. ØFKORD, O. KJØNNØ (1997). Comparison of three marine screening tests and four Oslo and Paris Commission procedures to evaluate toxicity of offshore chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**: 384-389.
- WELLS P.G., K. LEE AND C. BLAISE (1998). Microscale testing in aquatic toxicology: advances, techniques and practice. *CRC Press LLC*.
- WHITEHOUSE P., I. JOHNSON, D.M. FORROW, C. CHUBB (2004). A Regulatory Framework for Controlling Effluent Discharges Using Toxicity Testing in the UK. *Ecotoxicology*, **13**: 399-411.
- WIDDOWS J., D.K. PHELPS AND W. GALLOWAY (1981). Measurement of physiological condition of mussels transplanted along a pollution gradient in Narragansett Bay. *Mar. Environ. Res.*, **4**: 181-194.
- WOELKE C.E. (1972). Envelopment of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48-hour Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo. *Tech. Rep. Dept. Fish. Wash.*, **9**: 1-93.
- WON W.D., L.H. DISALVO AND J. NG. (1976). Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31(4)**: 576-580.
- WONG W.-Z., Y.-F. WEN, J. STEWARD AND T. ONG (1986). Validation of the SOS/UMU test with mutagenic complex mixtures. *Mutat. Res.*, **175**: 139-144.
- WU R.S.S., P.K.S. LAM AND B.S. ZHOU (1997a). A phototaxis inhibition assay using barnacle larvae. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, **12**: 231-236.
- WU R.S.S., P.K.S. LAM AND B.S. ZHOU (1997b). Effects of two oil dispersants on phototaxis and swimming behaviour of barnacle larvae. *Hydrobiologia*, **352**: 9-16.
- Wu R.S.S., P.K.S. Lam and Z. Bingsheng (1997c). A settlement inhibition assay with cyprid larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Chemosphere*, **35**: 1867-1874.
- XU K., J.K. CHOI, E.J. YANG, K.C. LEE AND Y. LEI (2002). Biomonitoring of coastal pollution status using protozoan communities with a modified PFU method. *Mar. Poll. Bull.*, **44**: 877-886.
- YASUMOTO-HIROSE M., M. NISHIJIMA, M.K. NGIRCHECHOL, K. KANO, Y. SHIZURI AND W. MIKI (2006). Isolation of Marine Bacteria by In Situ Culture on Media-Supplemented Polyurethane Foam. *Mar. Biotechnol.*, **8**: 227-237.
- YOKOTA Y., V. MATRANGA AND Z. SMOLENICKA (2002). The Sea Urchin: From Basic Biology To Aquaculture. Balkema, Lisse, the Netherlands: 1-231.
- YOON S.-J., G.S. PARK, J.-H. OH, Y.-S. KANG, S.-Y. PARK (2006). Marine ecotoxicological assessment using the harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *SETAC Europe 16th Annual Meeting 7-11 May 2006*, The Hague, The Netherlands.