



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

# Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti e acque interne

## I Manuali di Ecotossicologia



MANUALI E LINEE GUIDA



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

# **Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti e acque interne**

---

**I Manuali di Ecotossicologia**

---

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

**ISPRA** - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale  
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma  
[www.isprambiente.it](http://www.isprambiente.it)

ISPRA, Manuali e Linee Guida 88/2013  
ISBN 978-88-448-0607-1

Riproduzione autorizzata citando la fonte

**Elaborazione grafica**  
ISPRA

*Grafica di copertina:* Franco Iozzoli  
*Foto di copertina:* Renato Baudo

**Coordinamento editoriale:**  
Daria Mazzella  
**ISPRA** – Settore Editoria

**Luglio 2013**

---

## **Autori**

Renato Baudo (CNR–ISE, Verbania)  
Marco Faimali (CNR–ISMAR, Genova)  
Fulvio Onorati (ISPRA)  
David Pellegrini (ISPRA)  
Cristian Mugnai (ISPRA)

## **Collaboratori**

- Fabrizio Bandini, ARPA Emilia Romagna- Ravenna
- Franco Baroncelli, ECOTOX srl - Pregnana Milanese
- Andrea Buffagni, CNR IRSA, Brugherio
- Raffaella Cardente, ECOTOX srl - Pregnana Milanese
- Giuseppe Crosa, UNI Insubria, Varese
- Enrico Dallara, Sasol Olefins and Surfactants, Parma
- Roberto Farina, ENEA, Bologna
- Marco Francese, SHORELINE Soc.Coop.ar.l. AREA Science Park, Trieste
- Paola Frisenda, SHORELINE Soc.Coop.ar.l. AREA Science Park, Trieste
- Elisabetta Galli, ARPA Lombardia, Cremona
- Cristina Giarei, Eurofins, Milano
- Tristano Leoni, ARPA Marche, Macerata
- Maria Rita Minciardi, ENEA, Saluggia
- Giovanni Sansone, UNI Federico II, Napoli
- Giancarlo Sbrilli, ARPAT – Toscana, Grosseto
- Gabriella Scanu, Ministero Ambiente, Roma
- Annamaria Zoppini, CNR IRSA, Roma

---

## Indice

PREMESSA .....	6
CAPITOLO 1:.....	8
CRITERI DI IDENTIFICAZIONE DELLE BATTERIE.....	8
1.1 Caratteristiche degli ambienti e dei relativi substrati.....	8
1.2 Identificazione degli obiettivi dell'indagine ecotossicologica (a, b, c, d, e, f, g, h, i).....	10
1.3 Selezione delle matrici e dei comparti (I-V) .....	11
1.4 Scelta degli endpoint e degli organismi .....	13
1.5 Scelta degli organismi e modalità di esecuzione dei saggi (A - H).....	15
1.6 - Applicazioni per obiettivi specifici.....	18
<i>Obiettivo a: monitoraggio ambientale</i> .....	18
<i>Obiettivo b: effluenti e ambienti recettori</i> .....	19
<i>Obiettivo c: monitoraggio ai fini della balneazione</i> .....	21
<i>Obiettivo d: salvaguardia, protezione e recupero di ambienti particolari</i> .....	21
<i>Obiettivo e: dragaggi</i> .....	21
1.7 Conclusioni .....	22
CAPITOLO 2:.....	25
CRITERI DI GIUDIZIO PER LA VALUTAZIONE DELLA VALENZA ECOLOGICA E PRATICA DI BATTERIE DI SAGGI BIOLOGICI .....	25
2.1 Valenza ecologica della batteria di saggi biologici.....	25
2.1.1 <i>Prerequisiti</i> .....	25
2.1.2 - <i>Parametri da ponderare mediante giudizio esperto</i> .....	26
2.2 - Valenza pratica della batteria di saggi biologici.....	33
2.2.1 - <i>Parametri da ponderare mediante giudizio esperto</i> .....	33
2.3 - Conclusioni .....	36
CAPITOLO 3:.....	37
IDENTIFICAZIONE DEGLI ORGANISMI ED ENDPOINT .....	37
3.1 Saggi in vitro.....	37
3.2 Batteri.....	38
3.3 -Alghe.....	41
3.4 - Altri vegetali acquatici .....	42
3.5 - Rotiferi.....	44
3.6 - Crostacei .....	44
3.7 - Nematodi.....	47
3.8 - Anellidi .....	47
3.9 - Insetti .....	48
3.10 - Pesci.....	49
3.11 - Anfibi.....	52

---

3.12 - Conclusioni .....	53
CAPITOLO 4:.....	56
COMPOSIZIONE E VALUTAZIONE DELLE BATTERIE .....	56
4.1 - Obiettivo a: monitoraggio ambientale .....	56
4.2 - Obiettivi b e c: effluenti e ambienti recettori, monitoraggio ai fini della balneazione .....	62
4.3 - Obiettivo d: salvaguardia, protezione e recupero di ambienti particolari .....	63
4.4 - Obiettivo e: dragaggi .....	63
4.5 - Conclusioni .....	64
CAPITOLO 5:.....	65
SCALE DI TOSSICITÀ E INDICI INTEGRATI .....	65
5.1 - Indice proposto .....	65
5.2 - Conclusioni .....	72
BIBLIOGRAFIA .....	73

---

## PREMESSA

Con la pubblicazione di questo volume ISPRA intende proseguire la serie: "*I Manuali di Ecotossicologia*". In particolare viene fornito un riferimento tecnico-scientifico sull'applicazione delle metodologie ecotossicologiche nell'ambito "acque interne". L'esigenza è emersa soprattutto durante le ultime due edizioni delle Giornate di studio su "Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici e matrici contaminate" nelle quali era presente il comparto "acque dolci" ed in cui progressivamente è cresciuta la richiesta di un contributo "nazionale" che rappresenti lo stato dell'arte dei metodi ecotossicologici e dei criteri per la composizione delle batterie e di valutazione dei risultati, così come precedentemente realizzato per le "acque salate e salmastre". L'ambito normativo deve poter contare infatti su riferimenti tecnici con solide basi scientifiche e su metodi di analisi ampiamente validati.

È opportuno precisare che le indicazioni contenute nel 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.

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 ecotossicologia, 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, secondo quanto già previsto da differenti normative di settore.

Un supporto tecnico-scientifico è stato dato nell'ambito della Commissione UNICHIM "Qualità dell'acqua", Gruppo di Lavoro "Metodi Biologici", Sottogruppo "Acque dolci", che dal 2009 ha avuto il compito di valutare, attraverso un esame critico della bibliografia internazionale e nazionale, la possibilità di costituire una o più batterie di saggi biologici che consentano di effettuare una valutazione ecotossicologica delle acque interne. Successivamente, la partecipazione ai lavori è stata estesa ad altri colleghi, costituendo un gruppo ad hoc autonomo di lavoro.

Tale gruppo ad hoc ha concordato di proporre non una sola batteria, ma un insieme di batterie di saggi biologici, diversificati in funzione degli obiettivi. 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.

Riassumendo, sono state definite una o più batterie di saggi ecotossicologici da applicare agli effluenti e alle acque interne (corsi d'acqua e corpi idrici, naturali od artificiali).

Sono sicuramente ammesse variazioni e combinazioni alternative di saggi ecotossicologici compatibili con i criteri di scelta identificati in questo documento secondo l'approccio PBMS (*Performance-Based Measurement Systems*, raccomandato ad esempio da USEPA/ACS (2000), il quale 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.

Riguardo gli obiettivi identificati, nella prima parte del presente documento (**Criteri di identificazione delle batterie**) vengono 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.

Nella seconda parte del documento (**Criteri di giudizio per la valutazione della valenza ecologica e pratica di batterie di saggi biologici**) viene proposta una metodologia di valutazione scientifico – pratica delle batterie di saggi ecotossicologici teoricamente componibili, indipendentemente dalla loro costituzione specifica.

Nella terza parte del documento (**Identificazione degli organismi ed endpoint**) vengono esaminati criticamente i vari tipi di saggi ecotossicologici che prevedono l'utilizzo di diversi modelli sperimentali (organismi di diversi livelli trofici).

La quarta parte del documento (**Composizione e valutazione delle batterie**), combinando le indicazioni emerse nelle parti precedenti, propone alcune 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.

---

Infine, la quinta parte del documento (Scale di tossicità e indici integrati) propone una metodologia di ponderazione matematica dei risultati ottenibili da ciascuno dei saggi che compongono una batteria. È auspicabile che la validità delle batterie proposte venga verificata con il sistematico utilizzo dei protocolli standardizzati da parte di un certo numero di operatori (idealmente, tutte le ARPA e gli operatori coinvolti nel monitoraggio delle acque dolci) 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). In sostanza è opportuna una attività continuativa, nella quale la formulazione delle batterie e la loro successiva sperimentazione potrà/dovrà essere sistematicamente ripetuta. Tale attività probabilmente richiederà una qualche istituzionalizzazione, cioè una organizzazione che si assuma il compito ed i relativi oneri di raccolta dati, organizzazione degli interconfronti, elaborazione ed interpretazione.

Gli autori

Renato Baudo  
Fulvio Onorati  
David Pellegrini  
Cristian Mugnai  
Marco Faimali



---

## CAPITOLO 1: CRITERI DI IDENTIFICAZIONE DELLE BATTERIE

In questa parte del documento vengono esaminate le caratteristiche principali che un saggio ecotossicologico deve avere in funzione di:

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

### *1.1 Caratteristiche degli ambienti e dei relativi substrati*

#### *Ambienti*

Le batterie di saggi ecotossicologici devono essere applicate per la valutazione della qualità delle acque interne. Poiché tali acque possono ovviamente avere caratteristiche notevolmente differenti, si rende necessario innanzi tutto verificare la possibilità di raggrupparle in categorie ben definite.

In Limnologia<sup>1</sup> si definiscono “*acque continentali o acque interne: a) raccolte di acque ferme o con moto inapprezzabile (ambienti léntici: stagni, pozze, paludi, laghi, ecc.), e b) dotati di un più o meno vivace movimento (acque correnti o ambienti lotici: ruscelli, torrenti, fiumi, ecc.)*”. Lo studio di queste ultime viene anche definito potamologia” (Bertoni, 2001).

Con riferimento alla vigente legislazione, per identificare una tipologia di “*ambienti*” è possibile partire dalla Direttiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 relativa a standard di qualità ambientale nel settore della politica delle acque, recante modifica e successiva abrogazione delle direttive del Consiglio 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE e 86/280/CEE, nonché modifica della direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio.

A questa direttiva, recepita in Italia nel 2010<sup>2</sup>, si applicano le definizioni stabilite all'articolo 2 della Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque ed in particolare:

- acque superficiali: *le acque interne, ad eccezione delle acque sotterranee; le acque di transizione e le acque costiere, ...*
- acque interne: *tutte le acque superficiali correnti o stagnanti, e tutte le acque sotterranee all'interno della linea di base che serve da riferimento per definire il limite delle acque territoriali;*
- fiume: *un corpo idrico interno che scorre prevalentemente in superficie ma che può essere parzialmente sotterraneo;*
- lago: *un corpo idrico superficiale interno fermo;*
- corpo idrico artificiale: *un corpo idrico superficiale creato da un'attività umana;*
- corpo idrico fortemente modificato: *un corpo idrico superficiale la cui natura, a seguito di alterazioni fisiche dovute a un'attività umana, è sostanzialmente modificata, come risulta dalla designazione fattane dallo Stato membro in base alle disposizioni dell'allegato II;*

---

<sup>1</sup> WIKIPEDIA: La limnologia (dal greco Λίμνη "limne" = acqua stagnante e λόγος "logos" = studio) è quella branca dell'idrologia che studia le acque continentali (o acque interne).

<sup>2</sup> DECRETO LEGISLATIVO 10 dicembre 2010, n. 219 Attuazione della direttiva 2008/105/CE relativa a standard di qualità ambientale nel settore della politica delle acque, recante modifica e successiva abrogazione delle direttive 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE, nonché modifica della direttiva 2000/60/CE e recepimento della direttiva 2009/90/CE che stabilisce, conformemente alla direttiva 2000/60/CE, specifiche tecniche per l'analisi chimica e il monitoraggio dello stato delle acque. GU n. 296 del 20-12-2010.

- 
- corpo idrico superficiale: *un elemento distinto e significativo di acque superficiali, quale un lago, un bacino artificiale, un torrente, fiume o canale, parte di un torrente, fiume o canale, acque di transizione o un tratto di acque costiere.*

Combinando queste definizioni, gli ambienti da considerare per questo documento sono dunque *le acque interne superficiali, correnti o stagnanti, naturali od artificiali.*

Nel contesto di questo documento la tradizionale suddivisione tra acque “*correnti*” e “*ferme*” non verrà considerata. Infatti, le maggiori differenze tra i due tipi di ambienti sono legate alla velocità di corrente, alla natura del substrato, alla temperatura ed alla quantità di ossigeno disciolto.

Per quanto concerne la velocità di corrente, se, per i saggi ecotossicologici, si volessero utilizzare organismi che richiedono un apprezzabile movimento dell’acqua, sarebbe necessario ricorrere a sistemi a flusso continuo: questi, anche se disponibili (vedi ad esempio Dan Wall *et al.*, 1998), non sarebbero alla portata di tutti i laboratori. Pertanto, per una batteria di routine, si propone di utilizzare sistemi statici, o al massimo semi-statici (con rinnovo periodico del mezzo acquoso), alla temperatura adeguata per gli organismi prescelti.

In Limnologia, i corpi idrici vengono ulteriormente suddivisi in funzione della loro origine, morfologia, termica, idrologia, chimismo, o idrobiologia<sup>3</sup>. Anche queste ulteriori suddivisioni non appaiono necessarie, poiché per i saggi ecotossicologici tali caratteristiche risultano ininfluenti, purché nella scelta degli organismi vengano rispettate le loro esigenze per i parametri chimico-fisici (es., pH, durezza, alcalinità, temperatura, ossigeno disciolto, ecc.).

Al contrario, un fattore comune ad acque correnti e ferme che potrebbe essere rilevante è costituito dal tipo di substrato.

Per valutare lo stato di salute dei corpi idrici è infatti necessario esaminare il ruolo dei sedimenti nel ciclo biogeochimico degli elementi e composti chimici. In effetti, come sottolineano Power e Chapman (1992), numerosi tossici vengono normalmente riscontrati solo a livello di tracce nelle acque, mentre gli stessi elementi e composti tendono ad essere accumulati nei sedimenti anche in concentrazioni estremamente elevate. Infatti, i sedimenti tendono ad integrare nel tempo gli apporti di sostanze chimiche, mentre per definizione le condizioni delle acque sono, allo stesso tempo, variabili e dinamiche, in particolare per i corsi d’acqua. Per tali motivi i sedimenti possono essere considerati sia come “*deposito*”, sia come “*fonte*” potenziali per gli inquinanti. Non a caso, la Commissione Europea indica che i sedimenti sono il mezzo di elezione per lo studio dei fenomeni di contaminazione da parte di fosforo (elemento eutrofizzante), metalli, PAHs, VOX, HCB, PCBs, pesticidi organoclorurati, fenoli clorurati, olii, ecc. (Adriaanse *et al.*, 1995).

### ***Substrati (1,2,3,4)***

Se la valutazione della qualità delle acque interne prevede un’indagine sui sedimenti, potrebbe richiedere l’utilizzo di organismi bentonici. Poiché questi possono avere specifiche esigenze per il tipo di substrato, viene proposta la seguente suddivisione:

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). Talvolta, proprio il substrato che rappresenta solo una minima percentuale dell’area ospita le specie di interesse (economico, estetico, naturalistico, ecc.) da tutelare.

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 quel tipo di substrato copra almeno una determinata

---

<sup>3</sup> Wikipedia: L'idrobiologia (dal greco ὕδωρ "ydor" = acqua e λόγος "logos" = studio) è la scienza che studia gli organismi viventi nelle acque interne in tutti i loro aspetti: (tassonomici, fisiologici, associativi, etologici).

---

percentuale dell'area. Questa frazione deve, evidentemente, essere scelta anche in funzione degli obiettivi e dopo che saranno state valutate le differenze tra batterie per i vari substrati: ovviamente, se le differenze risulteranno modeste, si potrebbe optare per una frazione del 50 %; se, invece, risulteranno notevoli, potrebbe essere necessario scendere al 25 % o meno. Tuttavia, occorre essere consapevoli che una simile strategia comporta, almeno in via teorica, uno studio specifico sulla estensione relativa di ogni tipo di substrato, con costi non trascurabili.

In ogni caso, occorre salvaguardare 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, come ad nel caso del fondo roccioso di corsi d'acqua, dove solo in sacche limitate si raccolgono del sedimento sul quale poter studiare adsorbimento e rilascio.

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

Uno studio delle acque interne viene solitamente commissionato per verificare:

1. se sono contaminate 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.

Ovviamente, se la risposta è affermativa ad entrambe le domande, sarà necessario stabilire quali sono le cause della compromissione, 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 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 sulle acque interne.

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.

Ovviamente, l'uso di una batteria di saggi ecotossicologici permetterebbe di valutare meglio e più direttamente l'entità dell'impatto (su un recettore reale o potenziale). Quindi, una batteria di saggi ecotossicologici sarebbe funzionale a quando 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.

Uno studio potrà dunque avere "obiettivi" diversi, in funzione del numero e tipo di impatti considerati. 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 rischio o di vero e proprio pericolo.

È però possibile indicare alcune ricette "base", utilizzando "casi tipo" generici ed altri più specifici.

Tra gli obiettivi generici si riconoscono:

- **a** - il monitoraggio ambientale in generale (definizione dello stato di qualità), con una possibile differenziazione (**a**<sub>1</sub>) 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, con la possibile differenziazione **b**<sub>1</sub>, solo effluente; **b**<sub>2</sub>, scarico accidentale; **b**<sub>3</sub>, recettore;
- **c** - le autorizzazioni alla balneazione (possibili effetti dell'ambiente sull'uomo);

- **d** - la salvaguardia, protezione e recupero di ambienti particolari (es. **d**<sub>1</sub>: riserve, parchi e zone di particolare pregio naturalistico; **d**<sub>2</sub>: ittiocolture, ecc.). Come per **a**<sub>1</sub>, si può distinguere un obiettivo **d**<sub>3</sub>, per studi intesi al recupero di zone particolari, ma già degradate.

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

- **e** - caratterizzazione dei sedimenti da dragare; **e**<sub>1</sub>: per la valutazione degli effetti nel sito da dragare e nelle aree adiacenti; **e**<sub>2</sub>: per la valutazione degli effetti nel sito di smaltimento a terra, discarica. Questi obiettivi **e** non si applicano sicuramente agli ambienti di tipo **1** (substrato duro).

Infine, anche se non possono essere studiati attraverso saggi ecotossicologici, per completezza vengono indicati anche alcuni ulteriori obiettivi (che non saranno più 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 e così via (i biomarker rientrerebbero in questo obiettivo, anche se in parte potrebbero essere utilizzati per **a**<sub>1</sub> e **d**<sub>3</sub>; si veda a tal proposito le linee guida *JAMP* (OSPAR, 2003). Ma per questo obiettivo non è possibile, né utile, definire una ricetta unica.

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

Per ambienti nei quali la raccolta di sedimenti è impossibile (substrati rocciosi, scarichi idrici, canali artificiali, ecc.) o difficoltosa (corpi idrici profondi), l’unica matrice possibile è costituita dall’acqua.

Nei casi, invece, dove il campionamento dei sedimenti risulta possibile, i saggi ecotossicologici dovrebbero preferibilmente essere condotti sulla fase solida.

Va però 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). Per questo si raccomanda di seguire le indicazioni della guida ASTM E 1391-02 (2002).

Ammettendo che i campioni di sedimento giungano in tempi utili ed in condizioni idonee in laboratorio, i saggi di tossicità possono allora 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 di tipo **1**); 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 sia possibile, perché offre informazioni complementari e permette di utilizzare tipi diversi di organismi. Esso è anche il comparto che permette di effettuare TIE (Carr *et al.*, 2001b; Stronkhorst *et al.*, 2003). 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 E 1525 – 94, 1994). L’elutriato, pur costituendo un artefatto, è la simulazione più vicina alle movimentazioni dei fondali e ai dragaggi.
- **IV** – sedimento intero. Si intende il sedimento assieme all’acqua interstiziale, che ha subito una manipolazione minima dopo il campionamento (ASTM 1525-94, 1994). Il sedimento non deve essere congelato, ma a 4 °C può essere conservato almeno per 2 settimane prima dell’esecuzione dei saggi di tossicità (Norton *et al.*, 1999), salvo diversa indicazione dello specifico protocollo. Secondo ISO 16712-05, 2005, 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, 1993). 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, 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 allo stesso modo del sedimento intero.

Inoltre, a volte viene fatto riferimento a un “*sedimento sospeso*” o a “*materiale particellato in sospensione*” (Cotou *et al.*, 2005); questo potrebbe costituire un “comparto” separato, in particolare se fosse monitorato un tributario.

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 lo scopo è quello di ipotizzare il possibile destino degli inquinanti associati al particellato).

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 sovranatante 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 è possibile solo l’utilizzo del comparto **I** per gli obiettivi **a, b, c e d**.

Negli ambienti con substrato di tipo **II**, 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 porosa 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 quanto, alcuni organismi non possono essere utilizzati con determinati substrati.

Ai fini di questo documento 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, ottenendo così le seguenti opzioni.

- Obiettivo **a** (monitoraggio): sono prescritti i comparti **I** (acqua) e **IV** (sedimento intero). Raccomandato il comparto **II** (acqua interstiziale). Se lo studio viene effettuato per valutare il

---

possibile recupero della zona (obiettivo **a**<sub>1</sub>), la batteria prevede anche saggi raccomandati sui comparti **III** (elutriati) e **V** (estratti con solventi).

- Obiettivo **b** (scarichi e recettori): per tutti (**b**<sub>1</sub>, **b**<sub>2</sub>, **b**<sub>3</sub>) è prescritto il comparto **I** (acqua); per **b**<sub>1</sub> (scarico) il saggio può essere effettuato sul campione tal quale o filtrato, ma sono raccomandati anche i comparti **III** (elutriati) e **V** (estratti) sui solidi sospesi dello scarico; per **b**<sub>2</sub> (scarico accidentale), se possibile si applica l'approccio seguito per **b**<sub>1</sub>, ma comunque è prescritto anche l'esame a monte e a valle del recettore; per **b**<sub>3</sub> (recettore) è prescritto anche il comparto **IV** (sedimento) e raccomandato il comparto **II** (acqua interstiziale). 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 (obiettivo **d**<sub>2</sub>), si ritiene inoltre indispensabile uno studio di bioaccumulo. Ai fini di un recupero ambientale (obiettivo **d**<sub>3</sub>), la batteria comprende anche saggi raccomandati sui comparti **III** (elutriati) e **V** (estratti) come parte di uno studio del tipo TIE.
- Obiettivo **e** (dragaggi): è prescritto il comparto **IV** (sedimento intero). Per studiare gli effetti sul sito dragato (obiettivo **e**<sub>1</sub>), è prescritto anche il comparto **II** (acqua interstiziale). Per valutare la dispersione del sedimento nell'area adiacente alle operazioni di dragaggio (obiettivo **e**<sub>1</sub>) e per studiare gli effetti sul sito di smaltimento o nell'area adiacente, sono prescritti saggi sul comparto **III** (elutriati); per studiare gli effetti sul sito di smaltimento a terra (obiettivo **e**<sub>2</sub>), 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 procede alla scelta del numero minimo e tipo di organismi ed endpoint desiderati.

### ***Endpoint***

Si premette che il DLgs 152/2006, non prevede obbligatoriamente l'effettuazione dei saggi tossicologici nelle fasi iniziali del monitoraggio; i saggi biologici, considerati non prescritti nell'All. I 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 biologici).

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), 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”.*

---

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 transtegumentaria, 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.

Nelle Linee Guida australiane 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. 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 il presente manuale.

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*” (OECD, 1984) e “*Sub-chronic sublethal toxicity*” (drafts EEC, ISO, OECD).

ECETOC (1993) definisce come tossicità acuta gli “*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*”; come tossicità subacuta (Subletale) gli “*Effetti avversi che si manifestano dopo l’esposizione ad una sostanza per un periodo  $\leq$  10 % vita dell’organismo (e durante il quale gli organismi vengono alimentati)*”; come tossicità cronica gli “*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 i vari taxa possiedono 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 del 2001 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) indica nel titolo 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 (indipendentemente cioè se la terminologia utilizzata è o meno condivisa dai membri del gruppo *ad hoc*), 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 inoltre richiesto che le specie prescelte siano autoctone. ASTM (1994), infatti, indica che devono essere indigene del sito da controllare, ma ammette che possano essere utilizzate in alternativa altre specie che abbiano una simile nicchia ecologica e le medesime modalità di alimentazione, o avere un comportamento simile a quello di specie indigene.

Altre caratteristiche importanti sono ad esempio 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 comunque 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.

Il Decreto Legislativo 152 del 3 aprile 2006, nell'Allegato I, alla parte Terza, 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.

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, occorre reperire 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 1 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 viene fatta 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 sovrastante 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 (Tabella 1.1).

**Tabella 1.1** – *Gli otto possibili tipi di saggi utilizzabili.*

	<b>Tipo di studio</b>	<b>Sedimento intero</b>	<b>Organismi bentonici</b>	<b>Sedimento presente</b>
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, naturale od artificiale (quindi in realtà viene simulato un microcosmo che contiene sia fase solida, sia fase liquida). Per ASTM (1994) anche quest'acqua è considerata "sovrinatante", ma questa definizione dovrebbe essere riservata alla vera acqua sovrinatante, in particolare quella a contatto del sedimento durante il campionamento; l'acqua 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, perché 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 risospendendo il sedimento in acqua e lasciando successivamente decantare. Alcuni Autori (Geffard *et al.*, 2004) 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, 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). Essi includono anche i saggi (sperimentali) di TIE in fase solida (esempio: Phillips *et al.*, 2006) e comportano, in ogni caso, 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 sovrinatante), 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, in quanto priva di riscontro in letteratura.

---

Le combinazioni E e G possono sembrare improbabili, ma sono spesso utilizzate 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 sovrannatante 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.

Per i vari ambienti, obiettivi e comparti, sono ritenuti prescritti i saggi biologici:

- **1(a, b, c, d) I** – saggi di tipo H;
- **2, 3, 4 (a)** – saggi di tipo H, A, B (raccomandati D con acqua interstiziale e C e/o G);
- **2, 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);
- **2, 3, 4 (c)** – saggi di tipo H (raccomandati A e/o B);
- **2, 3, 4 (d)** – saggi di tipo H, A, B, D (raccomandati C e G);
- **2, 3, 4 (e)** – saggi di tipo A e B + H (**e<sub>1</sub>**) o C (**e<sub>2</sub>**).

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

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

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 applicato solo ai sedimenti fluviali basato sull'analisi statistica delle caratteristiche biologiche ed ecologiche delle specie bentoniche.

Hoekzema *et al.* (2006) passano in rassegna numerosi sistemi per minimizzare il numero di pesci nei saggi biologici, 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 del CTN\_AIM (ANPA, 2001) identifica tra i saggi ecotossicologici:

- il test di tossicità con batteri bioluminescenti per corsi d'acqua, laghi, e relativi sedimenti, nonché per scarichi in acque superficiali e in fognatura;
- il test di crescita algale con *Selenastrum capricornutum* (ora *Pseudokirchneriella subcapitata*) per corsi d'acqua, laghi, scarichi nel suolo e scarichi in acque superficiali e fognatura;
- il saggio di tossicità con *Daphnia magna* per acqua e sedimenti di corsi d'acqua, laghi, relativi sedimenti, scarichi reflui ed industriali nel suolo, acque superficiali ed in fognatura;
- il test di mutagenicità e teratogenesi (test di Ames, Mutatox<sup>®</sup>) su campioni acquosi concentrati per le acque correnti ed i laghi.

Per la metodologia ed eventuali approfondimenti si rimanda ad ARPAT (1998).

Inoltre, il D.Lgs 152/99 nei corsi d'acqua e nei laghi prevede indagini di bioaccumulo di PCB, DDT e Cd su tessuti muscolari di specie ittiche e su organismi macrobentonici non precisati.

## ***1.6 - Applicazioni per obiettivi specifici***

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

### ***Obiettivo a: monitoraggio ambientale***

Questo obiettivo ha una possibile differenziazione (**a<sub>1</sub>**) se il monitoraggio è inteso ad identificare strategie di recupero ambientale.

---

Proprio per la sua genericità, l'obiettivo **a** pone particolari problemi per la definizione di una batteria di routine che, presumibilmente, andrà applicata in modo discontinuo (magari una sola volta), in aree per le quali si hanno scarse o nulle informazioni pregresse relative all'ecotossicità dei sedimenti. Occorre 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 attuabili 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 varie Sediment Quality Guidelines (SQG) potrà contribuire ad indirizzare anche saggi di tossicità specifici.

In ambienti con substrato duro (**1**) 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 **2, 3, 4** (sabbiosi, fangosi e misti), 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).

In generale, se lo studio viene effettuato per valutare il possibile recupero della zona (obiettivo **a<sub>1</sub>**), la batteria comprende anche saggi raccomandati sui comparti **III** (elutriati) e **V** (estratti con solventi), nonché tecniche di TIE. Per questo scopo, si potrebbe proporre l'utilizzo del ROTAS<sup>TM</sup> (Rapid On site Toxicity ASsay), basato sui batteri bioluminescenti<sup>4</sup>.

#### **Obiettivo b: effluenti e ambienti recettori**

L'applicazione di saggi di tossicità al monitoraggio e al controllo degli effluenti ha ormai una lunga storia e sono quindi disponibili molti esempi di batterie. Tuttavia, questa evidenza scientifica contrasta con la realtà dei laboratori referenti delle attività di monitoraggio e controllo previste in materia, nei quali la comprensione dei fenomeni d'inquinamento ha tradizionalmente sempre prediletto una "visione chimica".

La scelta di organismi e endpoint (acuti vs. cronici) spesso è condizionata dall'obiettivo principale, l'effluente oppure il recettore (Tinsley *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2004).

D'altra parte in ecotossicologia il mantenimento della struttura e della funzionalità degli ecosistemi rimane un obiettivo importante, anche alla luce del fatto che la mortalità di parte della popolazione dell'ecosistema è prodotta sia dalle relazioni inter- e intraspecifiche tra gli organismi viventi, sia dall'effetto di fattori ambientali abiotici. In più il ricorso ai saggi ecotossicologici consente di valutare la frazione biodisponibile degli inquinanti e il verificarsi di eventuali fenomeni di sinergia e/o antagonismo tra sostanze diverse (Cairns, 1995).

In un tale quadro, dove il controllo degli scarichi in acque superficiali è anche previsto per legge (D.Lgs. 152/06 e s.m.i., parametro 51 Tabella 3, Allegato 5, Parte terza), si rende necessario lavorare su saggi multispecie che garantiscano la comprensione dell'evento tossico eventualmente apportato al corso d'acqua. A tale scopo è opportuno utilizzare in maniera completa organismi vivi rappresentativi delle principali catene trofiche (alghe, crostacei, pesci, batteri). Nel merito si segnala che, seppure in passato siano stati condotti saggi sui pesci, oggi nei laboratori pubblici (ARPA) si ha la tendenza ad una loro riduzione per ragioni etiche, economiche e logistiche, a favore di saggi più economici, affidabili e pratici nei controlli di routine. Si riporta anche che nella maggioranza dei laboratori ARPA non si effettuano saggi multispecie sugli scarichi, ma ci si limita ancora ad applicare il saggio più conosciuto e previsto per legge che utilizza solo il crostaceo *Daphnia magna*. Tuttavia, attualmente, sui corsi d'acqua che a volte possono essere recapito degli effluenti controllati di routine, le strutture pubbliche dedicate tendono ad attuare un monitoraggio secondo le direttive comunitarie, utilizzando macroinvertebrati, diatomee, macrofite piuttosto che crostacei, batteri e alghe.

Si aggiunga che in tema di controllo degli scarichi in acque superficiali, anche gli eventi accidentali d'inquinamento richiedono una completa caratterizzazione del possibile danno arrecato al corso d'acqua. Occorre quindi orientare la scelta dei saggi da utilizzare in batteria verso quelli che si mostrano validi strumenti sia per i controlli di routine, sia per quelli d'emergenza. Le risorse dedicate (umane e strumentali) risulterebbero così impiegate in modo più razionale.

---

<sup>4</sup> ([http://www.cysense.com/images/upload/docum/CTPN200531\\_ROTAS.pdf](http://www.cysense.com/images/upload/docum/CTPN200531_ROTAS.pdf))

---

Il comparto I (acqua) può richiedere batterie differenziate per acqua con diverso grado di durezza e/o alcalinità. Sono da prevedere saggi di tipo H (con acqua sovranatante e organismi non bentonici, senza fase solida).

Per gli ambienti con substrati **1, 2, 3, 4** la batteria dovrebbe prevedere:

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

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.

Tutto ciò premesso, considerata l'eterogeneità degli approcci seguiti dai soggetti coinvolti (Regioni, ARPA, ecc.) e stante l'esigenza di un riordino sistematico delle azioni indispensabili alla tutela delle acque, ai fini del presente manuale, per l'obiettivo b viene proposta la seguente differenziazione tra scarichi e recettori:

- **b<sub>1</sub>**, solo effluente, prescritto il comparto I (Acqua, tal quale/filtrato: saggi di tipo H) + raccomandati saggi di tipo C e/o G sui Solidi Sospesi dello scarico, comparto III (elutriati) e V (estratti);
- **b<sub>2</sub>**, scarico accidentale, come **b<sub>1</sub>** + recettore (monte/valle) come **b<sub>3</sub>**;
- **b<sub>3</sub>**, recettore, prescritti comparto I (acqua) e IV (sedimenti, escludendo ovviamente gli ambienti con substrato duro 1), con saggi di tipo H, A/B, + raccomandato il comparto II (acqua interstiziale), con saggi di tipo D, C/G.

All'interno di progetti di monitoraggio di corsi d'acqua recettori oggetto di pressioni antropiche, in cui sia necessario controllare anche gli scarichi in esso recapitanti, al fine di concretizzare un giudizio complessivo sul suo stato ecologico, la scelta della strada da percorrere da parte dei soggetti coinvolti sarà determinata da una giusta combinazione dei casi previsti nei tre punti precedenti.

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 privilegiano quando possibile i microbiotest. Inoltre, i saggi non si limitano più a rilevare la tossicità "acuta" ma anche la tossicità "cronica", nonché possibili effetti genotossici, mutageni, ecc.

Nel 2005 la OSPAR ha dedicato un volume al "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 ISO. Sono richiesti ulteriori studi per saggi di tossicità cronica e per il confronto e la validazione di due saggi di bioaccumulo.

La logica OSPAR è quindi quella di fornire un insieme di "strumenti", dando 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, tuttavia, opinabile, in quanto la sensibilità dei pesci varia notevolmente 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).

Sempre secondo OSPAR, dovrebbero essere inclusi saggi di bioaccumulo (membrane semipermeabili), di biodegradabilità, di genotossicità (OSPAR, 2002) e per i distruttori endocrini (OSPAR, 2003a).

Per OSPAR, una batteria per il comparto acqua dolce dovrebbe comprendere almeno saggi con batteri + alghe + crostacei cronico, ovvero: *Vibrio fischeri* 30 min EC50 (Microtox<sup>®</sup>); *Pseudokirchneriella subcapitata* 72h EC50 (ISO 8692); *Daphnia magna* 21d NOEC (OECD 211).

---

Per EPA, la WEA prevede saggi di tossicità acuta e cronica. Per la tossicità acuta, il manuale USEPA (2002), indica, per gli organismi di acqua dolce: *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia pulex* e *D. magna*, *Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss* e *Salvelinus fontinalis*.

Riassumendo, tenendo conto della bibliografia precedentemente citata, per il comparto I (acqua, tal quale e/o filtrata), sembra proponibile una batteria comprendente alghe, batteri e crostacei, con saggi su *Pseudokirchneriella subcapitata* a 72 h; *Vibrio fischeri* 15/30 min; *Daphnia magna* a 24 h. Per i solidi sospesi andrebbe aggiunto il saggio con *Vibrio fischeri* 15/30 min.

#### **Obiettivo c: monitoraggio ai fini della balneazione**

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

Un potenziale problema per la balneazione è l'insorgere di bloom algali 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).

Linee guida sono state predisposte dalla OMS nel 2004<sup>5</sup>.

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 utile impiegare un saggio con *Vibrio fischeri*, o altro saggio speditivo di cui sia stata accertata una sufficiente sensibilità specifica, 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, poiché la proliferazione algale di specie tossiche e non è legata a condizioni di elevata eutrofizzazione, un saggio di crescita con alghe potrebbe servire a stabilire se esistono condizioni predisponenti il bloom. È però da verificare se un saggio algale 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 contaminanti da tossici chimici, ma la possibilità sembra così remota da non richiedere un controllo ecotossicologico di routine di tutte le aree balneabili.

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 **d**<sub>1</sub>: riserve, parchi e zone di particolare pregio naturalistico; **d**<sub>2</sub>: ittiocolture, ...) 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 alla parte Terza, Tabella 1/C, stabilisce un elenco di parametri fisici e chimici che devono essere rispettati, ma non prescrive saggi ecotossicologici. 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 prescritti anche i saggi che per l'obiettivo a erano raccomandati.

#### **Obiettivo e: dragaggi**

Il Decreto Legislativo 152 del 3 aprile 2006, nella parte Terza, Titolo III, Capo IV, Art. 109, che disciplina l'*Immersione in mare di materiale derivante da attività di escavo e attività di posa in mare*

---

<sup>5</sup> [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/bathing/srwe1/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/srwe1/en/)

---

*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*”, quale base tecnica per la stesura dei citati allegati tecnici, attualmente in fase di concertazione con altri Dicasteri . Il 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 analogia, si può ritenere che anche per le acque interne, nel caso debbano essere effettuati dragaggi, siano necessari saggi ecotossicologici. In tal caso, anche per le acque interne, 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) e almeno una da applicare alla fase liquida (elutriato).

Ancora, seguendo l’approccio utilizzato per i sedimenti marini (si veda l’approfondita review compilata dall’Agenzia Federale dell’Ambiente Tedesca, Herbst e Nendza, 2000; Nendza, 2002), è necessario prendere in considerazione: sensibilità, specificità, disponibilità degli organismi, variabilità del metodo, costo/efficacia, etica, standardizzazione e intercalibrazione.

Si possono così definire battere 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, sospensioni di sedimento e sedimento intero; al secondo livello saggi su elutriati, su sedimento intero e su estratti; al terzo livello studi sulla struttura della comunità, biomarker e bioaccumulo.

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

Ambienti **2** (sabbia - ghiaia), **3, 4** (substrato fangoso o sedimenti misti) e obiettivo (**e<sub>1</sub>**, 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 **e<sub>1</sub>**, effetti sul sito dragato, ed **e<sub>2</sub>**, smaltimento a terra di sedimento dragato da ambienti **2, 3, 4**, sono da prevedere anche saggi di Tipo C, con elutriati (o estratti) da sedimento intero e organismi non bentonici.

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.

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 (acquacolture e/o laboratori che commercializzano le specie di interesse, anche in forma di Toxkit). 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 del chimismo 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 copra 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.

Per scelta, il gruppo di lavoro non ha preso in considerazione i biomarker, considerandoli allo stato attuale non pienamente fruibili per attività di routine, anche in considerazione delle difficoltà di interpretazione in chiave ecosistemica (Forbes *et al.*, 2006). Ciò non toglie che, tra le raccomandazioni, si possa indicare anche la necessità di affiancare i saggi di tossicità con studi sulla composizione quali- quantitativa del benthos, di bioaccumulo, di biomarker.

In tabella 1.2 sono sintetizzati tutti i tipi di saggi identificati in funzione dei comparti e degli obiettivi. Sulla base dei criteri così identificati, il gruppo *ad hoc* ha successivamente elaborato un metodo di valutazione delle batterie di saggi ecotossicologici che teoricamente potrebbero essere proposte. Tale metodo viene proposto e discusso nel Capitolo 2.



**Tabella 1.2** – Saggi prescritti e raccomandati per le acque interne in funzione dei comparti e degli obiettivi.

Substrato		Saggi prescritti				Saggi 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
	a <sub>1</sub> – 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 <sub>1</sub> - scarichi idrici (b <sub>2</sub> come b <sub>1</sub> + b <sub>3</sub> )	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
	b <sub>3</sub> - 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
	d <sub>1</sub> - 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
	d <sub>2</sub> - 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
	d <sub>3</sub> - 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				
e <sub>1</sub> - 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					
e <sub>2</sub> - effetti nel sito di smaltimento a terra	Co		IV	IV	IV		V	V	V	
	Sa		A-B-C	A-B-C	A-B-C					
	Sa		A-B-C	A-B-C	A-B-C					

---

## **CAPITOLO 2:**

# **CRITERI DI GIUDIZIO PER LA VALUTAZIONE DELLA VALENZA ECOLOGICA E PRATICA DI BATTERIE DI SAGGI BIOLOGICI**

### ***Premessa***

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, la rappresentatività 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.

Pertanto, al *Sottogruppo Acque dolci* è stato affidato il compito 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.

Nel presente manuale, che riporta le conclusioni concordate tra i partecipanti ai lavori, vengono quindi descritte due metodologie distinte concernenti i criteri per la ponderazione esperta di alcuni fattori che, a giudizio del gruppo *ad hoc*, 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 lavoro) che consenta di "giudicare" e quindi confrontare in maniera obiettiva, attraverso la ponderazione esperta di alcuni fattori, 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 *ad hoc*.

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.

Il gruppo *ad hoc* ha 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.

## ***2.1 Valenza ecologica della batteria di saggi biologici***

### ***2.1.1 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 endpoint, 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.

Tuttavia, nella prima fase di recepimento ed attuazione di tali criteri, la batteria può 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.

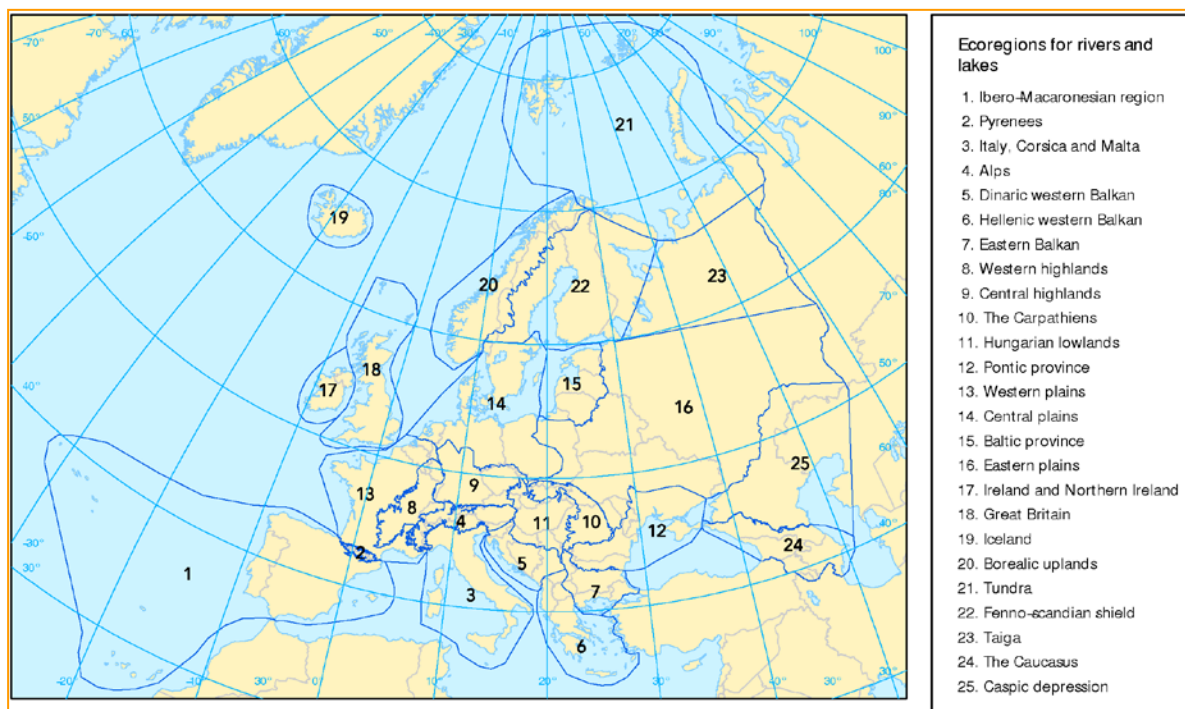
### **2.1.2 - Parametri da ponderare mediante giudizio esperto**

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, fattori di interferenza, 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:
  - **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;
  - **livello II** - l'endpoint considerato è stato pubblicato ed è stato "validato" da almeno un esercizio di interconfronto con un numero di laboratori  $\geq 8$  o normato da un organismo nazionale (es. AFNOR, DIN, EPA, ASTM, ecc.);
  - **livello III** - l'endpoint considerato è standardizzato da un ente sovranazionale (ISO, CEN, OECD, ecc.) e/o normato dall'ente di normazione nazionale (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 nel tipo di 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 nella Ecoregione 3 (Italia, Corsica e Malta) o 4 (Alpi), secondo quanto specificato dalla WFD, Allegato XI, MAPPA A, Sistema A: Ecoregioni relative a fiumi e laghi (Figura 2.1), e nella specifica area oggetto di studio<sup>6</sup>. Si fa riferimento al trattato di Illies, 1978.
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). Per una descrizione approfondita degli obiettivi possibili dell'indagine, si rimanda al Capitolo 1 del documento.

<sup>6</sup> Si segnala la Collana del progetto Finalizzato "Promozione della qualità dell'Ambiente" AQ/1/201 Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne Italiane, CNR.

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.



**Figura 2.1** – Water Framework Directive, Allegato XI, MAPPA A, Sistema A: Ecoregioni relative a fiumi e laghi.

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 (Tabelle 2.1 – 2.6).

**Tabella 2.1** - Rappresentatività della Specie nell’area di studio ( $RS_{eco}$ )

Valore	Descrizione
1	Quando la specie-test non trascorre nessun periodo del proprio ciclo vitale nell’area di studio (stagni, pozze, paludi, laghi, ruscelli, torrenti, fiumi, 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

**Tabella 2.2 - Standardizzazione dell'endpoint (Sep)**

Valore	Descrizione
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 $\geq 8$ laboratori o normato da un organismo nazionale (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 (UNI) (Livello III normazione UNICHIM)

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 (altre Ecoregioni), 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.

**Tabella 2.3 - Distribuzione Geografica della specie-test (DG)**

Valore	Descrizione
1	Quando la specie-test non è presente nelle Ecoregioni 3 e 4
2	Quando la specie-test presenta un areale di distribuzione cosmopolita (incluse le Ecoregioni 3 e 4)
3	Quando la specie-test, cosmopolita, è effettivamente presente nella specifica area oggetto di studio
3,5	Quando la specie-test risulta endemica delle Ecoregioni 3 e 4
4	Quando la specie-test, endemica delle Ecoregioni 3 e 4, ed è effettivamente presente nella specifica area oggetto di studio

**Tabella 2.4 - Rappresentatività dello Stadio Vitale impiegato nella matrice ( $RSV_M$ )**

Valore	Descrizione
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

**Tabella 2.5 - Rappresentatività della Matrice rispetto all'applicazione ( $RM_{appl}$ )**

Matrice	Monitoraggio (obiettivo a, c, $d_2$ )	Monitoraggio effluenti/scarichi liquidi (obiettivo b)	Monitoraggio fondali (obiettivo d, $d_1$ , $d_3$ )	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 dagli scopi del presente manuale. 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).

**Tabella 2.6 - Rilevanza e Sensibilità dell'effetto RES**

Valori	Descrizione
5	Comportamento
4	Mutagenicità e genotossicità
3	Sviluppo (riproduzione, schiusa uova, fecondazione, metamorfosi, fissazione larve, ecc.)
2	Crescita (taglia, peso, divisione cellulare, ecc.)
1,5	Bioluminescenza, attività metabolica
1	Mortalità - immobilità

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

Nell'impossibilità di concordare una definizione comune che contempli 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 (letali acuti e sub-letali cronici). 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).

In merito al fattore  $RB_s$ , 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 addizionale, oltre alle 3 minime previste (Tabelle 2.7 -2.8).

**Tabella 2.7 - Rilevanza della Batteria rispetto alle specie ( $RB_s$ )**

Valore	Descrizione
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 4 <sup>a</sup> )
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 4 <sup>a</sup> )

In merito al fattore  $RB_t$ , gli stadi vitali degli organismi utilizzati nella batteria devono comprendere almeno tre dei livelli ecologici funzionali precedentemente definiti.

**Tabella 2.8 - Rilevanza della batteria rispetto al livello funzionale (RB<sub>t</sub>)**

Valore	Descrizione
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<sub>s</sub> e RB<sub>t</sub>.

La Valenza Ecologica Totale VET<sub>batt</sub> 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<sub>ep</sub>: 3 (endpoint standardizzato e/o normato (Livello III UNICHIM);
- RS<sub>eco</sub>: 4 (la specie trascorre l'intero ciclo vitale nell'ecosistema di studio);
- DG: 4 (la specie è endemica delle Ecoregioni 3 e 4 ed è presente nella specifica area oggetto di studio);
- RSV<sub>M</sub>: 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<sub>appl</sub>: 6 (massima rappresentatività della matrice rispetto all'applicazione);
- RES: 5 (endpoint più rilevante misurato dopo esposizione di lunga durata);
- RB<sub>s</sub>: 1,25 (delle 3 specie, almeno 1 effetto diverso da mortalità - immobilità);
- RB<sub>t</sub>: 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<sub>s</sub> = 1,50, RB<sub>t</sub> = 4 (le specie coprono tutti e 4 i livelli funzionali), VET<sub>batt</sub> = 572.

Per 5 endpoint (specie), ciascuno con fattori massimi, RB<sub>s</sub> = 1,75, RB<sub>t</sub> = 4,25, VET<sub>batt</sub> = 780.

Per 6 endpoint (specie), ciascuno con fattori massimi, RB<sub>s</sub> = 2,00, RB<sub>t</sub> = 4,5, VET<sub>batt</sub> = 1014.

Per 7 endpoint (specie), ciascuno con fattori massimi, RB<sub>s</sub> = 2,25, RB<sub>t</sub> = 4,75, VET<sub>batt</sub> = 1274, e così via.

La rilevanza ecologica della specifica batteria di endpoint (REC<sub>batt</sub>), espresso rispetto alla massima valenza teoricamente possibile diventa:  $REC_{batt} = (VET/VET_{max}) \times 100$ .

Il limite di questo approccio è che naturalmente, all'aumentare degli organismi/endpoint, paradossalmente, diviene più difficile avvicinarsi in pratica al VET<sub>max</sub>.

Per stabilire se la batteria ipotizzata raggiunge almeno i requisiti minimi di "scientificità" è necessario quindi calcolare anche una VET<sub>min</sub>, 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<sub>ep</sub> = 3 (endpoint di III livello);
- RS<sub>eco</sub> = 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 non è presente nelle Ecoregioni 3 e 4);
- $RSV_M = 2$  (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 fattori di cui alla tabella 2.9.

**Tabella 2.9** – Fattori di ponderazione attribuibili ad una batteria di saggi biologici costituita da 3 endpoint.

Endpoint	$S_{ep}$	$RS_{eco}$	DG	$RSV_M$	$RM_{appl}$	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 ottengono i fattori di ponderazione di cui alla tabella 2.10.

**Tabella 2.10** – Fattori di ponderazione attribuibili ad una batteria di saggi biologici costituita da 4 endpoint.

Endpoint	$S_{ep}$	$RS_{eco}$	DG	$RM_{appl}$	$RSV_M$	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



Quindi:

- $RB_s = 1,5$ ;
- $RB_t = 3,25$  (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 ottengono i fattori di ponderazione di cui alla tabella 2.11.

**Tabella 2.11** – Fattori di ponderazione attribuibili ad una batteria di saggi biologici costituita da 5 endpoint.

Endpoint	$S_{ep}$	$RS_{eco}$	DG	$RM_{appl}$	$RSV_M$	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

Quindi:

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

Analogamente per 6 endpoint si ottengono i fattori di ponderazione di cui alla tabella 2.12.

**Tabella 2.12** – Fattori di ponderazione attribuibili ad una batteria di saggi biologici costituita da 6 endpoint.

Endpoint	$S_{ep}$	$RS_{eco}$	DG	$RM_{appl}$	$RSV_M$	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

Quindi:

- $RB_s = 2,00$ ;
- $RB_t = 3,75$  (3 livelli funzionali);
- $VET_{min} = 342,125$ ;
- $VET_{max}$  per 6 endpoint è 1014;
- $REC_{min} = (VET_{min}/VET_{max}) * 100 = 33,74 \%$ .

Per 7 endpoint si ottengono i fattori di ponderazione di cui alla tabella 2.13.

Quindi:

- $RB_s = 2,25$ ;
- $RB_t = 4,00$  (3 livelli funzionali);
- $VET_{min} = 409,375$ ;
- $VET_{max}$  per 6 endpoint è 1274;
- $REC_{min} = (VET_{min}/VET_{max}) * 100 = 32,13 \%$

**Tabella 2.13** – Fattori di ponderazione attribuibili ad una batteria di saggi biologici costituita da 7 endpoint.

Endpoint	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RM <sub>appl</sub>	RSV <sub>M</sub>	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
7	1	1	1	1	1	1	6

Da tale valutazione emerge il concetto che, minore è il numero di endpoint/organismi e livelli funzionali coperti, maggiore è la REC<sub>min</sub> 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.

## 2.2 - Valenza pratica della batteria di saggi biologici

Alla ponderazione “scientifica” di cui sopra ne viene affiancata un’altra, di tipo pratico, per la valutazione di una batteria di routine, che prende in considerazione altri parametri. In particolare, tra i prerequisiti viene aggiunta 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.

### 2.2.1 – Parametri da ponderare mediante giudizio esperto

Analogamente a quanto proposto per la ponderazione di tipo scientifico, anche in questo caso, 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, a meno che un parametro sia 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 ne limita temporalmente la loro utilità. 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 più ambienti diversi e in periodi differenti dell’anno, mentre se la disponibilità è limitata, il carico di lavoro pesa unicamente sul periodo di disponibilità. Inoltre, può diventare 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 sono prioritari rispetto alle 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 sarà 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. Il peso di questo parametro sarà quindi inversamente proporzionale alla complessità della strumentazione necessaria, privilegiando in tal modo saggi che non richiedono una strumentazione e/o esperienza particolare.
6. **Impegno operativo della batteria (IB).** Non essendo certamente facile la ponderazione di fattori economici, ma assumendo un costo unitario per il tempo degli operatori, viene ponderato l’impegno in termini di risorse umane richieste per l’allestimento ed esecuzione del saggio.

Questi 6 parametri combinati con l’algoritmo in seguito descritto, consentono una “ponderazione esperta” della praticità della batteria, assegnando a ciascuno di essi un fattore numerico secondo quanto dettagliato nelle tabelle 2.14 – 2.

**Tabella 2.14 – Fattori di ponderazione attribuibili alla Reperibilità degli Organismi (RO).**

Valore	Descrizione
1	Gli organismi sono raccolti in ambienti naturali e non sono disponibili tutto l’anno per difficoltà oggettive (ad es. meteorologiche o stagionali).
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.

**Tabella 2.15 – Fattori di ponderazione attribuibili alla Standardizzazione (SP).**

Valore	Descrizione
1	Il protocollo metodologico è sperimentale (“personalizzato”).
2	Il protocollo metodologico è validato da prove interlaboratorio ( $\geq 8$ laboratori) o normato da un organismo nazionale (es. AFNOR, DIN, EPA, ASTM, ecc.).
3	Il protocollo metodologico è standardizzato da un organismo sovranazionale (ISO, CEN, OECD, ecc.).
4	Il protocollo metodologico è prescritto in Italia da un disposto legislativo.

**Tabella 2.16 – Fattori di ponderazione attribuibili all’ Effetto dell’ endpoint sulla scala di Rischio.**

Valore	Descrizione
1	Comportamento
2	Mutagenicità e genotossicità
3	Sviluppo (riproduzione, schiusa uova, fecondazione, metamorfosi, fissazione larve, ecc.)

4	Crescita (taglia, peso, divisione cellulare, ecc.)
4,5	Bioluminescenza – attività metabolica
5	Mortalità - immobilità

**Tabella 2.17** – Fattori di ponderazione attribuibili alla Preparazione della Matrice (PM).

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

**Tabella 2.18** – Fattori di ponderazione attribuibili alla Fattibilità della Batteria (FB).

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

**Tabella 2.19** – Fattori di ponderazione attribuibili all' Impegno operativo della Batteria (IB).

Valore	Descrizione
1	Impegno risorsa umana durata > 5 giorni (con impegno semiquotidiano).
2	Impegno risorsa umana durata < 5 giorni (con impegno quotidiano).
3	Impegno risorsa umana durata : <ul style="list-style-type: none"> <li>• ≤ 3 giorni con impegno semiquotidiano</li> <li>• giorni con impegno inizio e fine, con un controllo intermedio</li> <li>• ≤ 2 giorni con impegno semigiornaliero con tempi morti</li> </ul>
4	Impegno risorsa umana durata ≤ 2 giorni (con impegno semigiornaliero)
5	Impegno risorsa umana durata ≤ 1 giorno

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

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

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 viene calcolata dal rapporto:

$$RP_{batt} = (VT/VT_{max}) \times 100.$$

---

## 2.3 – Conclusioni

Il Sottogruppo *Acque dolci*, sulla base dei criteri di valutazione identificati, ritiene che 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* penalizzi la praticità o, in alternativa, quanto la praticità faccia 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 + 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<sub>batt</sub>) fornisce molti elementi di giudizio, ma non pretende (né potrebbe fare diversamente) di introdurre un automatismo che sostituisca l'interpretazione “*esperta*”.

Pertanto, i componenti del gruppo *ad hoc* assumono l'impegno 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 ED ENDPOINT

### *Premessa*

Sulla base dei criteri identificati dal Sottogruppo *Acque dolci* ed illustrati nel Capitolo 1 di questo manuale, è stata esaminata criticamente la bibliografia esistente e le esperienze originali di ricerca dei componenti del Sottogruppo per 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 saggi ecotossicologici su acque interne.

A tale scopo, per ciascun saggio viene identificato il tipo di prova, l'organismo, la matrice utilizzata, l'endpoint, l'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 organismi appartenenti a diversi livelli trofici. I criteri ed i fattori numerici di ponderazione sono stati dettagliatamente discussi nel Capitolo 2 di questo manuale.

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

- Rappresentatività della specie ( $RS_{eco}$ );
- Standardizzazione dell'endpoint ( $S_{ep}$ )<sup>7</sup>;
- Valenza della distribuzione geografica della specie (DG) (limitatamente alle opzioni: Ecoregione 3 e 4, 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 del saggio, 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 di questo manuale.

### **3.1 Saggi *in vitro***

Il riferimento considerato è costituito dalla norma UNI EN ISO 21427-2 (2009a).

Il saggio *in vitro* permette l'identificazione di sostanze che causano danni citogenetici con formazione di micronuclei contenenti frammenti cromosomici (e/o i cromosomi interi) compromessi. Il saggio si basa sull'aumento nella frequenza di cellule micronucleate dopo incubazione con e senza l'attivazione metabolica. Cellule V79 del criceto cinese vengono esposte per 24 ore (4 ore con la miscela S9) ad un intervallo di concentrazioni del campione di prova. In seguito, vengono preparati i vetrini, vengono evidenziate le cellule e valutate quelle micro nucleate.

È adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

---

<sup>7</sup> Per la valutazione della standardizzazione, sia scientifica che pratica, i saggi ISO attualmente in votazione (versione DIS, Draft International Standard, e FDIS, Final Draft International Standard) vengono assimilati a quelli già pubblicati.

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.1.

**Tabella 3.1** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per i saggi in vitro.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
cellule V79	3	1	1	4	<b>9</b>	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
cellule V79	5	3	2	2	3	<b>15</b>

### 3.2 Batteri

#### *Salmonella* spp

Il primo riferimento considerato è costituito dalla norma ISO 11350 (2012a).

La norma, applicabile ad acque di scarico, estratti o elutriati acquosi, acque dolci, elutriati di sedimenti, acque interstiziali, sostanze singole diluite in acqua, prevede la determinazione (endpoint) del potenziale citotossico e genotossico, utilizzando il ceppo *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo *typhimurium* TA 98 e TA 100 (precedentemente nota come *Salmonella typhimurium*). Per l'esecuzione del saggio i batteri vengono riattivati per una notte, viene inoculato il campione e posto in incubatore a (37 ± 1) °C per 100 min, dopodiché viene aggiunto un indicatore di pH e incubate le piastre per 48 ore (estendibili a 72 h). L'attività mutagenica viene determinata contando i pozzetti dal colore mutato (da viola a giallo), trattate con il campione in esame, rispetto a quelli negativi di controllo. La misura può essere diretta o con un lettore fotometrico di micropiastre. Poiché alcuni composti chimici non sono mutageni prima della metabolizzazione in un organismo, la prova può essere effettuata anche aggiungendo una frazione enzimatica di fegato di ratto quale attivatore del potenziale mutageno.

È adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.2.

**Tabella 3.2** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il test di AMES con *Salmonella typhimurium* (Ames et al., 1975).

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Salmonella typhimurium</i>	3	1	1	4	<b>9</b>	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Salmonella typhimurium</i>	5	3	2	4	4	<b>18</b>

Il secondo saggio che può essere contemplato è quello relativo al test di mutazione OECD (1997), per il quale è disponibile anche una versione in kit (Muta-ChromoPlate™ kit), con lettura diretta del cambiamento di colore in piastre multi pozzetto.

Un altro riferimento utile è dato dalla norma ISO 13829 (2000a). Il saggio, anch'esso basato sul batterio *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 geneticamente ingegnerizzato, rileva la genotossicità del campione di prova che incrementa l'espressione del sistema di SOS-riparazione associato all'umuC-gene. Il batterio, reperibile commercialmente, viene coltivato e preservato in fiale monouso da conservare a temperatura non superiore a – 80 °C. Per l'esecuzione del saggio, i batteri vengono riattivati per una notte, viene inoculato il campione e posto in incubatore a (37 ± 1) °C per 2 + 2 ore. L'endpoint è l'induzione del gene umuC, misurata spettrometricamente a 420 nm.

È adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e è pratica dettagliata nella Tabella 3.3.

**Tabella 3.3** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per umu-test con *Salmonella typhimurium*.

Valenza scientifica	<b>S<sub>ep</sub></b>	<b>RS<sub>eco</sub></b>	<b>DG</b>	<b>RES</b>	<b>Totale</b>	
<i>Salmonella typhimurium</i>	3	1	1	4	9	
Valenza pratica	<b>RO</b>	<b>SP</b>	<b>ER</b>	<b>FS</b>	<b>IS</b>	<b>Totale</b>
<i>Salmonella typhimurium</i>	5	3	2	4	4	18

### *Pseudomonas putida*

Il riferimento utile considerato è dato dalla norma UNI EN ISO 10712 (1999a) che utilizza *Pseudomonas putida*, batterio coltivabile ubiquitario in suoli e ambienti acquatici. L'endpoint è costituito dalla inibizione della crescita cellulare misurata come densità ottica a seguito di una esposizione a  $(23 \pm 1)$  °C per  $16 \pm 1$  ore al campione acquoso di prova.

È adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.4.

**Tabella 3.4** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con umu-test con *Pseudomonas putida*.

Valenza scientifica	<b>S<sub>ep</sub></b>	<b>RS<sub>eco</sub></b>	<b>DG</b>	<b>RES</b>	<b>Totale</b>	
<i>Pseudomonas putida</i>	3	4	2	2	11	
Valenza pratica	<b>RO</b>	<b>SP</b>	<b>ER</b>	<b>FS</b>	<b>IS</b>	<b>Totale</b>
<i>Pseudomonas putida</i>	5	3	4	4	3	19

### *Arthrobacter globiformis*

Il riferimento utile considerato è dato dalla norma ISO/CD 18187 (2012).

Si tratta di un saggio per contatto con campioni solidi (suoli, sedimenti limnici, fanghi e rifiuti) che utilizza il ceppo ATCC 8010 del batterio *Arthrobacter globiformis*, comunemente presente in suoli e sedimenti. Il ceppo batterico è commercialmente disponibile (liofilizzato, disidratato o in coltura) e l'intera prova si completa nell'arco di 6 ore.

L'inoculo viene aggiunto ad una sospensione del materiale solido (campione naturale o sedimento artificiale) ed incubato a 30 °C per 2 h. Successivamente viene aggiunto il colorante redox resazurina che, per l'attività deidrogenasica, forma resorufina, rilevata fluorimetricamente (a 535 nm, eccitazione a 590 nm) con letture ogni 15 min per 1 h.

È adatto per saggi di tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici) e di tipo F (con acqua + fase solida e organismi non bentonici) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.5.



**Tabella 3.5** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Arthrobacter globiformis*.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Arthrobacter globiformis</i>	3	4	2	1,5	10,5	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Arthrobacter globiformis</i>	5	3	4,5	4	5	21,5

***Vibrio fischeri***

Il riferimento utile considerato è dato dalla norma UNI EN ISO 11348-1-2-3 (2009a).

La norma, applicabile ad acque di scarico, estratti o elutriati acquosi, acque dolci, elutriati di sedimenti, acque interstiziali, sostanze singole diluite in acqua, prevede, previo aggiustamento della pressione osmotica, la determinazione (endpoint) dell'inibizione della bioluminescenza del batterio marino *Vibrio fischeri*, misurata dopo un tempo di contatto di 5, 15 o 30 min. È commercialmente disponibile una strumentazione dedicata, con lettura ed elaborazione dei dati automatizzata.

Le misure possono essere effettuate usando batteri preparati di fresco (ISO 11348-1), batteri liofilizzati (ISO 11348-3) o batteri disidratati (ISO 11348-2), opportunamente ricostituiti.

Il saggio può essere effettuato anche su una sospensione di campioni ambientali solidi (sedimenti).

Esso è previsto dal Decreto Legislativo 152/06 e s.m.i. ed è adatto per saggi di tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici), C (con elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida), F (con acqua + fase solida e organismi non bentonici) e di tipo H (con acqua, compresa quella interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica dettagliata nella Tabella 3.6.

**Tabella 3.5** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Vibrio fischeri* secondo la norma UNI EN ISO 11348-1-2-3 (2009).

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Vibrio fischeri</i>	3	1	1	1,5	6,5	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Vibrio fischeri</i>	5	4	4,5	3	5	21,5

Il saggio è descritto anche nei Manuali e Linee Guida APAT-IRSA 29 (2003a).

Una variante della precedentemente norma citata è data dalla ISO 21338 (2010) che prevede la determinazione (endpoint) dell'inibizione della bioluminescenza del batterio marino *Vibrio fischeri* per contatto diretto con sospensioni di sedimento, effluenti (soprattutto se torbidi e colorati), estratti acquosi (elutriati) da suolo, rifiuti solidi e altro materiale solido.

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.6.

**Tabella 3.6** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Vibrio fischeri* mediante la norma ISO 21338 (2010).

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Vibrio fischeri</i>	3	1	1	1,5	6,5	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Vibrio fischeri</i>	5	4	4,5	3	5	21,5

### 3.3 –Alghe

#### *Desmodesmus subspicatus* o *Pseudokirchneriella subcapitata*

Il riferimento utile considerato è dato dalla norma ISO 8692 (2012b).

Colture algali monospecifiche di *Desmodesmus subspicatus* (ex *Scenedesmus subspicatus*) o *Pseudokirchneriella subcapitata* (ex *Selenastrum capricornutum*) vengono coltivate per diverse generazioni in un intervallo di concentrazioni del campione di prova acquoso, preparato miscelando appropriate quantità del mezzo di crescita, della sostanza e di un inoculo di celle algali in crescita esponenziale. I contenitori vengono incubati per un periodo di  $72 \pm 2$  ore, durante il quale viene misurata per ogni soluzione la densità cellulare almeno ogni 24 ore.

La norma è compatibile con l'uso di un kit commercialmente disponibile.

Il saggio, previsto dal Decreto Legislativo 152/06 e s.m.i., è applicabile ad acque di scarico, estratti o elutriati acquosi, acque dolci, elutriati di sedimenti, acque interstiziali, sostanze singole diluite in acqua, è adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.7.

**Tabella 3.7** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Pseudokirchneriella subcapitata* applicabile a colture e al kit da forme durature.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	3	4	2	2	11	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	5	4	4	4	3	20

Per questo saggio algale è disponibile anche la linea guida OECD (2006), che prevede l'uso di *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus subspicatus* e *Chlorella vulgaris*. Il saggio è descritto anche in ASTM (2004).

La norma ISO 14442 (2006a), fornisce, inoltre, procedure, non trattate in ISO 8692 e ISO 10253, per sostanze "difficili".

Si segnala infine la pubblicazione ISO/TR 11044 (2008) nella quale vengono discussi gli aspetti tecnico scientifici delle prove di inibizione della crescita algale presi in esame per lo sviluppo delle norme ISO 8692 ed ISO 10253.

#### *Ulva pertusa*

Il riferimento utile considerato è dato dalla norma ISO/DIS 13308 (2011).

Dischi di tallo dell'alga marina verde multicellulare *Ulva pertusa* vengono esposti per 96 ore a campioni acquosi, modificandone però la salinità. L'endpoint è costituito dall'inibizione della riproduzione, basata sul cambiamento di colore del tallo, da verde-giallo (stadio vegetativo) a verde olivo scuro (stadio riproduttivo) ed infine a bianco (stadio finale di riproduzione). Le misure possono essere effettuate con un analizzatore di immagini o mediante ispezione visiva della proporzione dell'area di riproduzione rispetto all'area totale.

Le alghe, la cui presenza non risulta segnalata in Italia, sono raccolte in natura e possono essere mantenute in coltura in acqua marina artificiale per 4 settimane.

Il saggio, applicabile ad acque di scarico, estratti o elutriati acquosi, acque dolci, elutriati di sedimenti, acque interstiziali, sostanze singole diluite in acqua (con modifica della salinità), è adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata in Tabella 3.8.

**Tabella 3.8** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Ulva pertusa*.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Ulva pertusa</i>	3	1	1	3	8	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Ulva pertusa</i>	1	3	3	2	1	10

### 3.4 – Altri vegetali acquatici

#### *Lemna minor*

Il riferimento utile considerato è dato dalla norma UNI EN ISO 20079 (2006).

Fronde di *Lemna minor* in fase esponenziale di crescita (da culture axeniche) vengono incubate nel campione acquoso di prova a  $24 \pm 2$  °C per 168 h. L'endpoint è l'inibizione della crescita, misurata in base al numero e area delle fronde (rilevati con un sistema computerizzato di riconoscimento delle immagini), al contenuto di clorofilla ed al peso secco.

Il saggio, applicabile ad acque di scarico, estratti o elutriati acquosi, acque dolci, elutriati di sedimenti, acque interstiziali, sostanze singole diluite in acqua, è adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

*Lemna minor* è presente in Italia secondo la *Checklist della flora vascolare d'Italia* (<http://dbiodbs1.univ.trieste.it/checklist/index.php?procedure=search>).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nelle Tabella 3.9

**Tabella 3.9** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Lemna minor*.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Lemna minor</i>	3	4	3	2	12	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Lemna minor</i>	5	3	4	3	1	16

Per questo saggio è disponibile anche una linea guida OECD (2006b), che ammette anche l'utilizzo di *Lemna gibba*.

#### *Myriophyllum aquaticum*

Il riferimento utile considerato è dato dalla norma ISO/DIS 16191 (2012).

Spire di *Myriophyllum aquaticum* provenienti da colture vengono esposte ai campioni di prova di acqua e fase solida (fanghi e sedimenti, anche artificiali), per un periodo di 10 giorni con luce continua per  $(24 \pm 1)$  °C. L'endpoint è rappresentato dalla crescita, misurata come peso fresco.

Il saggio è adatto per saggi di tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici) ed F (con acqua + fase solida e organismi non bentonici) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

Secondo la *Checklist della flora vascolare d'Italia* (<http://dbiodbs1.univ.trieste.it/checklist/index.php?procedure=search>), *Myriophyllum aquaticum*, nativo del Rio delle Amazzoni, è ormai presente in Lombardia, Toscana, Lazio e Campania.

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è descritta nella Tabella 3.10.

**Tabella 3.10** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Myriophyllum aquaticum*.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	3	4	2	2	11	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	5	3	4	4	1	17

### Altre piante terrestri

Per ciò che concerne altri vegetali superiori è possibile fare riferimento al protocollo OECD 208. (2003).

Adattato alle acque interne, il saggio valuta gli effetti sulla germinazione dei semi e sui primi stadi di sviluppo di piante superiori esposte alla sostanza di prova nei sedimenti. I semi vengono posti a contatto con il sedimento trattato con la sostanza di prova e dopo la germinazione per il 50 % dei semi del gruppo di controllo vengono valutati gli effetti a 14 e a 21 giorni. Gli endpoint misurati sono la stima visiva della germinazione, la biomassa (peso fresco o secco del germoglio, oppure altezza del germoglio) e il rilevamento visivo di effetti avversi (clorosi, mortalità, anormalità dello sviluppo della pianta, ecc.). Le misure vengono effettuate almeno settimanalmente, o più spesso, se viene registrata la germinazione dei semi, e confrontate con quelle di piante di controllo non trattate.

Sulla base di questa linea guida, è stato pubblicato il Metodo Ufficiale UNICHIM N. 1651 (2003).

Il metodo può essere applicato sia ad acque (superficiali, di falda, di pioggia, di scarico e percolati), che a campioni solidi quali sedimenti, fanghi di depurazione o di risulta da attività produttive. I semi di due dicotiledoni (*Cucumis sativus* L. e *Lepidium sativum* L.) e di una monocotiledone (*Sorghum saccharatum* Moench) sono esposti al campione ed incubati al buio alla temperatura di  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$  per 72 ore. Al termine dell'esposizione, sono contati i semi germinati e misurata la lunghezza dell'apparato radicale di ciascuno di essi.

È disponibile anche un kit commerciale con semi di *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* e *Sinapis alba*, utilizzato per un confronto interlaboratorio internazionale (28 laboratori partecipanti). Il saggio prevede la conta e la misura dell'allungamento radicale, manuale o tramite un software liberamente disponibile per il riconoscimento delle immagini.

Utilizzando il kit, la prova è adatta per saggi di tipo B (con sedimento intero e organismi non bentonici), C (con elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) ed F (con acqua + fase solida e organismi non bentonici) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è descritta nella Tabella 3.11.

**Tabella 3.11** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio di germinazione e allungamento in kit con semi di *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* e *Sinapis alba*.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
Kit di germinazione e allungamento radicale	2	1	3	3	9	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
Kit di germinazione e allungamento radicale	5	2	3	4	3	17

È disponibile commercialmente anche una versione in kit (Phytotoxkit), basata sullo stesso principio ma con diversi semi (le dicotiledoni *Sinapis alba* e *Lepidium sativum* e la monocotiledone *Sorghum saccharatum*), validata a livello internazionale con un confronto interlaboratorio.

### 3.5 - Rotiferi

Il riferimento utile considerato è dato dalla norma ISO 20666 (2008a).

Femmine del rotifero planctonico *Brachionus calyciflorus*, di età inferiore a 2 ore, ottenute da allevamenti o da cisti commercialmente disponibili, vengono esposte individualmente ad una serie di concentrazioni del campione acquoso di prova per 48 ore a  $(25 \pm 1)$  °C. L'endpoint misurato consiste nella crescita della popolazione per riproduzione partenogenetica (almeno tre riproduzioni), sulla base del conteggio delle femmine (con lente di ingrandimento o sistema di riconoscimento delle immagini). La norma è compatibile con l'uso di un kit commercialmente disponibile.

Il saggio, applicabile ad acque di scarico, estratti o elutriati acquosi, acque dolci, elutriati di sedimenti, acque interstiziali, sostanze singole diluite in acqua, è adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

*Brachionus calyciflorus* è compreso nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.12.

**Tabella 3.12** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio in kit con *Brachionus calyciflorus*.

Valenza scientifica	<b>S<sub>ep</sub></b>	<b>RS<sub>eco</sub></b>	<b>DG</b>	<b>RES</b>	<b>Totale</b>	
<i>Brachionus calyciflorus</i>	3	4	3	3	13	
Valenza pratica	<b>RO</b>	<b>SP</b>	<b>ER</b>	<b>FS</b>	<b>IS</b>	<b>Totale</b>
<i>Brachionus calyciflorus</i>	5	3	3	4	3	18

### 3.6 - Crostacei

#### *Daphnia magna*

Un primo riferimento utile considerato è dato dalla norma UNI EN ISO 6341 (1999b).

Una revisione di questa Norma è stata approvata nel 2012 da ISO e CEN (EN ISO 6341, 2012).

Femmine partenogenetiche di *Daphnia magna*, di età non superiore a 24 ore, provenienti da allevamenti o da forme durature (efippi), vengono esposte per 24 (o 48) h a campioni acquosi (effluenti industriali o di scarico, acque superficiali o di falda) a  $(25 \pm 2)$  °C al buio o con fotoperiodo 16 h luce/8 h buio. L'endpoint misurato è rappresentato dalla immobilizzazione.

La norma è compatibile anche con l'uso di un kit commerciale.

Il saggio, previsto dal Decreto Legislativo 152/06 e s.m.i., è adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

*Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dubia* sono comprese nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica sono dettagliate nella Tabella 3.13.

**Tabella 3.13** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Daphnia magna* a 24 e 48h.

Valenza scientifica	<b>S<sub>ep</sub></b>	<b>RS<sub>eco</sub></b>	<b>DG</b>	<b>RES</b>	<b>Totale</b>	
<i>Daphnia magna</i> 24 (48) h	3	4	3	1	11	
Valenza pratica	<b>RO</b>	<b>SP</b>	<b>ER</b>	<b>FS</b>	<b>IS</b>	<b>Totale</b>
<i>Daphnia magna</i> 24 (48) h	5	4	5	4	3	21

*Daphnia magna* è compreso nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>).

Il saggio è descritto anche nel Manuale APAT – IRSA 29 (2003b) e nella Linea Guida OECD 202 (2004a), che, oltre a *Daphnia magna*, ammette l'utilizzo di *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia affinis* e *C. dubia*.

Un secondo riferimento è dato dalla norma ISO 10706 (2000b).

Giovani femmine di *Daphnia*, di età inferiore alle 24 h ad inizio saggio, provenienti da allevamenti, vengono esposte al campione acquoso. La durata del saggio è di 21 giorni. Viene rilevato il numero totale di neonati vivi prodotti da ciascun progenitore vivo al termine del saggio.

La norma è derivata dal metodo OECD 211 (1998).

È adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica sono dettagliate nella Tabella 3.14.

**Tabella 3.14** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Daphnia magna* a 21d.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Daphnia magna</i> 21 d	3	4	3	3	13	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Daphnia magna</i> 21 d	5	3	3	4	1	16

### *Ceriodaphnia dubia*

Il riferimento utile considerato è dato dalla norma ISO 20665 (2008b).

Femmine di *Ceriodaphnia dubia*, di età non superiore a 24 ore, provenienti da allevamenti o da forme durature (efippi), vengono esposte al campione acquoso (effluenti industriali o fognari, acque dolci di superficie e di falda, estratti acquosi) per 7 ± 1 giorni (25 ± 2) °C. Gli endpoint misurati sono due<sup>8</sup>: la mortalità delle femmine adulte e la loro riproduzione durante l'intero periodo d'esposizione.

La norma è compatibile con l'uso di un kit commercialmente disponibile.

È adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

*Ceriodaphnia dubia* è compresa nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica sono dettagliate nella Tabella 3.15.

**Tabella 3.15** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Ceriodaphnia dubia* riferiti alla riproduzione e alla mortalità.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (riproduzione)	3	4	3	3	13	
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (mortalità)	3	4	3	1	11	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (riproduzione)	5	3	3	4	1	16
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (mortalità)	5	3	5	4	1	18

<sup>8</sup> Nel calcolo della valenza pratica e scientifica di una batteria comprendente questo saggio, verrà conteggiato due volte.

Il saggio di tossicità cronica è descritto nel Manuale APAT-IRSA n. 29 (2003c) , il quale riporta anche un saggio di tossicità acuta (APAT-IRSA, 2003d).

### *Heterocypris incongruens*

Il riferimento utile considerato è dato dalla norma ISO 14371 (2012c).

In questo saggio per contatto diretto, neonati di un ostracode cosmopolita, *Heterocypris incongruens*, ottenuti dalla schiusa di uova durature (cisti), sono esposte al campione di sedimento di acqua dolce o a fanghi per 6 giorni a  $(25 \pm 1)$  °C al buio. L'endpoint è la mortalità. Nel caso al termine del saggio la mortalità sia inferiore al 30 %, si utilizza come endpoint l'inibizione della crescita, in base alla lunghezza, misurata allo stereomicroscopio, dei sopravvissuti.

La norma è compatibile con l'uso di un kit commercialmente disponibile.

Utilizzando il sedimento artificiale del controllo negativo, è possibile effettuare il saggio anche con campioni acquosi. Pertanto, è adatto per saggi di tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici) e D (con acqua + fase solida e organismi bentonici) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

*Heterocypris incongruens* è elencato nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica sono dettagliate nella Tabella 3.15.

**Tabella 3.15** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Heterocypris incongruens* riferiti alla crescita e alla mortalità.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Heterocypris incongruens</i> (mortalità)	3	4	3	1	11	
<i>Heterocypris incongruens</i> (crescita)	3	4	3	2	12	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Heterocypris incongruens</i> (mortalità)	5	3	5	2	1	16
<i>Heterocypris incongruens</i> (crescita)	5	3	3	2	1	14

### *Thamnocephalus platyrus*

Il riferimento utile considerato è dato dalla norma ISO 14380 (2011).

Neonati di *Thamnocephalus platyrus*, ottenuti dalla schiusa di uova durature (cisti), sono esposte al campione acquoso (effluenti industriali o fognari, acque dolci di superficie e di falda, estratti acquosi, tossine di cianobatteri) per 24 h a  $(25 \pm 1)$  °C al buio. L'endpoint considerato è rappresentato dalla mortalità, rilevata con osservazione allo stereo microscopio.

La norma è compatibile con l'uso di un kit commercialmente disponibile.

È adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrannatante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

*Thamnocephalus platyrus*, specie nordamericana, non è compreso nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica sono dettagliate nella Tabella 3.17.

**Tabella 3.17** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Thamnocephalus platyrus*.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Thamnocephalus platyrus</i>	3	4	1	1	9	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Thamnocephalus platyrus</i>	5	3	5	2	3	18

### 3.7 - Nematodi

#### *Caenorhabditis elegans*

Il riferimento utile considerato è dato dalla norma ISO 10872 (2010b).

Giovani di *Caenorhabditis elegans*, nematode comunemente presente in suoli e sedimenti di acqua dolce, provenienti da allevamenti su piastre di agar rinnovati ogni due mesi, vengono esposti al campione ambientale (sedimenti con salinità massima del 5 ‰, acqua interstiziale, elutriati, estratti acquosi) a  $(20 \pm 0,5)$  °C e al buio per 96 h. Gli endpoint sono rappresentati dalla mortalità (conteggio diretto), dalla crescita (lunghezza misurata allo stereomicroscopio), dalla fertilità (conteggio delle uova) e dalla riproduzione (conteggio della prole).

Utilizzando il sedimento artificiale del controllo negativo, è possibile effettuare il saggio anche con campioni acquosi. Pertanto, è adatto per saggi di tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici) e D (con acqua + fase solida e organismi bentonici) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

*Caenorhabditis elegans* è compresa nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.18.

**Tabella 3.18** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Heterocypris incongruens*.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	3	4	2	3	12	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Caenorhabditis elegans</i>	5	3	3	2	3	16

### 3.8 - Anellidi

#### *Lumbriculus variegatus*

Il riferimento utile considerato è dato dal protocollo OECD 225 (2007).

Il saggio, inteso per sostanze chimiche, prevede che oligocheti bentonici (*Lumbriculus variegatus*) in uno stato fisiologico simile (sincronizzati), provenienti da allevamenti, vengano esposti al campione in un sistema (sedimento artificiale + sostanza di prova) – acqua ricostituita per 28 giorni a  $20 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ , con fotoperiodo di 16 ore luce / 8 ore buio. Gli endpoint sono rappresentati dalla mortalità e dalla riproduzione (espressa come biomassa).

Combinando opportunamente i campioni ambientali (acque e/o sedimento) con quelli artificiali (acqua ricostituita e/o fase solida artificiale), è possibile utilizzare il saggio anche per campioni acquosi. Pertanto, è adatto per saggi di tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici) e D (con acqua + fase solida e organismi bentonici) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

*Lumbriculus variegatus* è compresa nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.19.

**Tabella 3.19** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Heterocypris incongruens*.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Lumbriculus variegatus</i>	3	4	2	3	12	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Lumbriculus variegatus</i>	5	3	3	4	1	16



### *Eisenia fetida*

Il riferimento utile considerato è dato dal protocollo OECD 222 (2004b). Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*).

Come variante per le acque dolci, adulti di *Eisenia fetida* (o *Eisenia andrei*), oligocheti terrestri provenienti da allevamenti, vengano esposti al campione in un sistema (sedimento artificiale + sostanza di prova) – acqua ricostituita per 28 giorni a 20 °C ± 2°C con fotoperiodo di 16 ore luce / 8 ore buio. Gli endpoint misurati sono la mortalità e la riproduzione (espressa come biomassa).

Combinando opportunamente i campioni ambientali (acque e/o sedimento) con quelli artificiali (acqua ricostituita e/o fase solida artificiale), è possibile utilizzare il saggio anche per campioni acquosi. Pertanto, è adatto per saggi di tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici) e D (con acqua + fase solida e organismi bentonici) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* sono compresi nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.20.

**Tabella 3.20** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Eisenia fetida*.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Eisenia fetida</i>	3	1	2	3	9	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Eisenia fetida</i>	5	3	3	4	1	16

### 3.9 - Insetti

Il riferimento utile considerato è dato dal protocollo OECD 218 (2004c).

Il saggio, inteso per sostanze chimiche, prevede che larve al primo stadio di sviluppo di chironomidi bentonici del genere *Chironomus* sp., quali *C. riparius*, *C. dilutus* (ex *C. tentans*), *C. yoshimatsui* provenienti da allevamenti, vengano esposti al campione in un sistema (sedimento artificiale + sostanza di prova) – acqua ricostituita per 28 giorni (*C. riparius*, *C. yoshimatsui*) o 65 giorni (*C. dilutus*) a 20 °C ± 2°C con fotoperiodo di 16 ore luce / 8 ore buio. L'endpoint è rappresentato dall'emergenza degli adulti. Addizionali endpoint possono essere la crescita e la sopravvivenza.

Un secondo importante riferimento è dato dal protocollo OECD 219 (2004d).

Il saggio, inteso per sostanze chimiche, prevede che larve al primo stadio di sviluppo di chironomidi bentonici del genere *Chironomus* sp., quali *C. riparius*, *C. dilutus* (ex *C. tentans*), *C. yoshimatsui*, provenienti da allevamenti, vengano esposti al campione in un sistema sedimento artificiale – (acqua ricostituita + sostanza di prova) per 28 giorni (*C. riparius*, *C. yoshimatsui*) o 65 giorni (*C. dilutus*) a 20 °C ± 2°C con fotoperiodo di 16 ore luce / 8 ore buio. Anche in questo caso, l'endpoint è dato dall'emergenza degli adulti. Addizionali endpoint possono essere la crescita e la sopravvivenza.

Considerando entrambe le linee guida, quindi, è possibile condurre saggi di tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici) e D (con acqua + fase solida e organismi bentonici) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

*Chironomus annularius*, *C. anthracinus*, *C. calipterus*, *C. cingulatus*, *C. dorsalis*, *C. melanotus*, *C. obtusidens*, *C. plumosus*, *C. riparius*, *C. salinarius* sono compresi nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.21.

Il protocollo OECD 233 (2010), infine, è un'estensione delle linee guida precedenti e prevede una durata di 44 giorni per *C. riparius* e *C. yoshimatsui*, o ben 100 giorni per *C. dilutus*.

**Tabella 3.21** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per i saggi biologici con *Chironomus* spp.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Chironomus</i> spp.	3	4	2	3	12	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Chironomus</i> spp.	5	3	3	4	1	16

### 3.10 - Pesci

#### *Danio rerio*

Il riferimento utile considerato è dato dal protocollo UNI EN ISO 7346-1 (2000).

Pesci di allevamento, isolati almeno 7 giorni prima dell'inizio del saggio, vengono esposti al campione acquoso a 23 °C ± 1°C, con fotoperiodo da 12 a 16 h. L'endpoint è rappresentato dalla mortalità, rilevata a 24, 48, 72 e 96 h.

La specie consigliata è *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae), ma possono essere utilizzate altre specie di pesci (*Lepomis macrochirus*, *Oryzias latipes*, *Pimephales promelas*, *Poecilia reticulata*), apportando appropriate modifiche nella procedura di prova, come la qualità dell'acqua di diluizione e le condizioni di temperatura.

È adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

*Danio rerio*, specie presente in Nord America e Oceania, non è compresa nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>).

*Pimephales promelas*, specie presente in Nord e Centro America, non è compresa nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>).

*Oryzias latipes*, specie presente in Asia, non è compresa nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>).

La lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>) non comprende *Lepomis macrochirus*, ma riporta che *Lepomis gibbosus* è stato introdotto dal Nord America e acclimatato ad inizio Novecento.

*Poecilia reticulata*, specie Americana, non è compresa nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>), ma almeno una popolazione perfettamente naturalizzata è stata riscontrata anche in Italia centrale, a Canino, in provincia di Viterbo.

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.22.

**Tabella 3.22** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio biologico con adulti di *Danio rerio*.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Danio rerio</i> (adulti)	3	4	1	1	9	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Danio rerio</i> (adulti)	5	4	5	4	1	19

Un secondo importante riferimento è dato dalla norma ISO 12890 (1999).

Embrioni di *Danio rerio*, ottenuti da uova di pesci di allevamento fertilizzate di recente, vengono esposte per 10 giorni (estendibili a 14) al campione acquoso a 26 °C ± 2 °C, con fotoperiodo di 12, 14 o 16 h. Gli endpoint sono costituiti dalla schiusa delle uova e dal numero di sopravvissuti, rilevati giornalmente. L'intera procedura richiede 4 settimane. Possono essere usate altre specie di pesci di acqua dolce, apportando appropriate modifiche nella procedura.

È adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e

organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.23.

**Tabella 3.23** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio biologico con uova di *Danio rerio*.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Danio rerio</i> (uova)	3	4	1	3	11	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Danio rerio</i> (uova)	5	3	3	4	1	16

Un ulteriore riferimento è dato dalla norma UNI EN ISO 15088 (2009b).

Embrioni di *Danio rerio* (la schiusa delle uova richiede da 72 a 96 h a 26 °C), da pesci di allevamento di età compresa tra 6 e 24 mesi, vengono esposti per 48 h al campione acquoso (effluenti) in micro piastre a 26 °C ± 1 °C, con fotoperiodo di 16 o 12 h. L'endpoint è rappresentato dalla mortalità, basata sul numero di uova coagulate, sul distacco della coda dell'embrione dal sacco vitellino, sul battito del cuore, rilevati al microscopio invertito o binoculare.

È adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.24.

**Tabella 3.24** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio biologico con embrioni di *Danio rerio*.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Danio rerio</i> (embrioni)	3	4	1	3	11	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Danio rerio</i> (embrioni)	5	3	3	2	1	14

### ***Oncorhynchus mykiss***

Il riferimento utile considerato è dato dal protocollo ISO 10229 (1994).

Pesci di allevamento della specie *Oncorhynchus mykiss*, acclimatati per almeno 2 settimane prima dell'inizio del saggio, vengono esposti al campione acquoso a 12,5 °C – 17,5 °C (± 1°C), con fotoperiodo da 12 a 16 h. L'endpoint è la crescita (peso e lunghezza), rilevata dopo 14 e 28 giorni sui pesci anestetizzati e marcati individualmente.

È adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

*Oncorhynchus mykiss* è compresa nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>). È stata introdotta dal Nord America ed è ora diffusa ovunque per scopi di pesca sportiva; non acclimatata, è attualmente rara in ambienti naturali, ma è molto diffusa negli allevamenti.

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.25.

**Tabella 3.25** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio biologico con *Oncorhynchus mykiss*.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	3	4	2	1	10	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	5	4	5	4	1	19

### Altri pesci

Il saggio biologico con pesci è previsto anche dalle linee guida OECD 203 (1992b), OECD 210 (1992c), OECD 212 (1998), OECD 215 (2000), che ammettono anche l'uso di *Cyprinus carpius*. Per alcuni saggi, la durata di esposizione è estesa fino a 28 giorni.

*Cyprinus carpio* è compresa nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>), dove è stata introdotta molti secoli fa dagli antichi Romani per l'allevamento.

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.26.

**Tabella 3.26** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio biologico con *Cyprinus carpio*.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Cyprinus carpio</i>	3	4	2	1	10	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Cyprinus carpio</i>	5	4	5	4	1	19

Il saggio di tossicità con pesci è descritto nel Manuale APAT – IRSA nr. 29 (2003e).

Le specie ammesse sono *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta fario* (trota di fiume), *Phoxinus laevis* (sanguinerola), *Alburnus albidus* (alborella), *Leuciscus cephalus cadeda* (cavedano). Queste specie si possono ottenere dalle peschicoltura o raccogliere nella maggior parte delle acque italiane.

Sono noti anche protocolli per la valutazione di alcuni marcatori biologici (biomarker). Il riferimento utile considerato è dato dal protocollo ISO/TS 23893-2 (2007). Esso valuta l'induzione del citocromo P450 1A, misurando con metodo fluorimetrico l'attività enzimatica EROD (*Ethoxy Resorufin-O-Deethylase*) su una frazione post-mitocondriale dell'omogenato di fegato di pesce. Si applica a pesci campionati nel loro ambiente naturale (acque dolci o salate) o a pesci esposti a sostanze o effluenti in laboratorio.

Tutte le operazioni con la frazione S9 vanno effettuate a temperatura prossima ai 4 °C; la reazione enzimatica viene invece avviata a 20 °C ± 2 °C.

È adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.27.

**Tabella 3.27** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il biomarker EROD su pesci.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
EROD	3	4	2	1,5	10,5	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
EROD	5	3	4,5	1	1	14,5

Un altro documento di riferimento per i biomarker su pesci è ISO/FDIS 23893-3 (2012).

Si tratta di un saggio enzimatico ELISA su campioni di plasma di pesce. Viene applicato a pesci campionati nell'ambiente (acque dolci, d'estuario o salate) e a pesci esposti a sostanze o effluenti in laboratorio.

È adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.28.

**Tabella 3.28** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il biomarker EROD su pesci.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
Vitellogenina	3	4	2	1,5	10,5	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
Vitellogenina	5	3	4,5	1	1	14,5

### 3.11 - Anfibi

*Xenopus laevis*

Il riferimento utile considerato è dato dal protocollo ISO 21427-1 (2006b).

Il metodo è basato sull'uso di larve allo stadio 50 (tavole di sviluppo cronologico di Nieuwkoop e Faber) di *Xenopus laevis* (raccomandato), ma si applica anche a *Pleurodeles waltl*. Le larve, ottenute nello stesso processo di schiusa delle uova di animali allevati in laboratorio, devono essere mantenute nelle condizioni del saggio per almeno 8 giorni prima dell'inizio della prova. Gli organismi di prova vengono esposti per 12 giorni ad un campione acquoso (effluenti acquosi, percolati, eluati di suoli, rifiuti industriali, fanghi d'impianti di trattamento acque, acque di superficie e di falda) a 22 °C ±1 °C con fotoperiodo di 12 h, con rinnovo giornaliero del mezzo e del cibo. L'endpoint considerato è rappresentato dalla genotossicità, valutata per esame istologico al microscopio a immersione di vetrini ematologici, con conteggio della proporzione di eritrociti con micronuclei e calcolo dell'indice mitotico su almeno 1000 eritrociti.

È adatto per saggi di tipo C (elutriati o estratti da sedimento intero e organismi non bentonici, senza fase solida) e di tipo H (con acqua, compresa l'acqua interstiziale e sovrantante dei sedimenti, e organismi non bentonici, senza fase solida) per gli obiettivi **a** (monitoraggio), **b** (scarichi e recettori), **c** (balneazione), **d** (salvaguardia) ed **e** (dragaggi).

*Xenopus laevis*, specie africana, non è compresa nella lista delle specie presenti in Italia (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>), ma è stata segnalata la sua diffusione in Sicilia a seguito dell'utilizzo come animali da laboratorio e da acquario.

Utilizzando i fattori di ponderazione descritti nel Capitolo 2, la valenza scientifica e pratica è dettagliata nella Tabella 3.29.

**Tabella 3.29** – Fattori per la ponderazione scientifica e pratica per il saggio con *Xenopus laevis*.

Valenza scientifica	S <sub>ep</sub>	RS <sub>eco</sub>	DG	RES	Totale	
<i>Xenopus laevis</i>	3	4	1	4	12	
Valenza pratica	RO	SP	ER	FS	IS	Totale
<i>Xenopus laevis</i>	5	3	2	1	1	12

### 3.12 - Conclusioni

Sulla base delle valutazioni precedenti, i saggi attualmente proponibili sono riassunti in Tabella 3.30. Tutti i saggi considerati sono utilizzabili per gli obiettivi a, b, c, d, e. Inoltre, non sono stati individuati saggi di tipo E e G, mentre per gli altri tipi di saggi sono possibili numerose alternative, dai metodi biochimici a quelli che utilizzano vegetali ed animali (dagli invertebrati ai vertebrati), di durata variabile da poche ore ai 100 giorni.

Tabella 3.30 – Quadro sinottico dei saggi proponibili.

Tipo test	Organismo	Durata test	Endpoint	Obiettivo	Valenza scientifica	Valenza pratica
A	<i>cellule V79</i>	24 h	Genotossicità	a b c d e	9	15
	<i>Heterocypris incongruens</i>	6 d	Mortalità	a b c d e	11	16
	<i>Heterocypris incongruens</i>	6 d	Riproduzione	a b c d e	12	14
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	96 h	Mortalità, crescita, fertilità, riproduzione	a b c d e	12	16
	<i>Lumbriculus variegatus</i>	28 d	Mortalità, riproduzione	a b c d e	12	16
	<i>Eisenia fetida, Eisenia andrei</i>	28 d	Mortalità, riproduzione	a b c d e	9	16
	<i>Chironomus sp.</i>	28 d, 65 d 44 d, 100 d	Emergenza adulti, mortalità, riproduzione	a b c d e	12	16
B	<i>Arthrobacter globiformis</i>	6 h	Inibizione deidrogenasi	a b c d e	10,5	21,5
	<i>Vibrio fischeri</i>	5, 15, 30 ‘	Inibizione bioluminescenza	a b c d e	6,5	21,5
	Semi mono- e dicotiledoni	72 h	Germinazione e allungamento radicale	a b c d e	9	17
	<i>Myriophyllum aquaticum</i>	10 d	Inibizione crescita	a b c d e	11	17
C	<i>Salmonella typhimurium</i> Test di Ames	48, 72 h	Citotossicità mutagenicità genotossicità	a b c d e	9	18
	<i>Pseudomonas putida</i>	16 h	Inibizione crescita	a b c d e	11	19
	<i>Vibrio fischeri</i>	5, 15, 30 ‘	Inibizione bioluminescenza	a b c d e	6,5	21,5
	<i>Salmonella typhimurium</i> umu-test	4 h	Genotossicità	a b c d e	9	18
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	72 h	Inibizione crescita	a b c d e	11	20
	<i>Ulva pertusa</i>	96 h	Inibizione riproduzione	a b c d e	8	10
	<i>Lemna minor</i>	168 h	Inibizione crescita	a b c d e	12	16
	Semi mono- e dicotiledoni	72 h	Germinazione e allungamento radicale	a b c d e	9	17
	<i>Brachionus calyciflorus</i>	48 h	Inibizione crescita	a b c d e	13	18

	<i>Daphnia magna</i>	24 – 48 h	Immobilizzazione	a b c d e	11	21
	<i>Daphnia magna</i>	21 d	Riproduzione	a b c d e	13	16
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	7 d	Riproduzione	a b c d e	13	16
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	7 d	Mortalità	a b c d e	11	18
	<i>Thamnocephalus platyrus</i>	24 h	Mortalità	a b c d e	9	18
	<i>Danio rerio</i> adulti	24, 48, 72, 96 h	Mortalità	a b c d e	9	19
	<i>Danio rerio</i> uova	10 (14) d	Schiusa uova, sopravvivenza	a b c d e	11	16
	<i>Danio rerio</i> embrioni	48 h	Mortalità	a b c d e	11	14
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	14 d, 28 d	Crescita	a b c d e	10	19
	<i>Cyprinus carpio</i>	14 d, 28 d	Crescita	a b c d e	10	19
	EROD		Induzione del citocromo P450 1A	a b c d e	10,5	14,5
	Vitellogenina		Saggio enzimatico ELISA	a b c d e	10,5	14,5
	<i>Xenopus laevis</i>	12 d	Genotossicità	a b c d e	12	12
D	<i>Heterocypris incongruens</i>	6 d	Mortalità	a b c d e	11	16
	<i>Heterocypris incongruens</i>	6 d	Riproduzione	a b c d e	12	14
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	96 h	Mortalità, crescita, fertilità, riproduzione	a b c d e	12	16
	<i>Lumbriculus variegatus</i>	28 d	Mortalità, riproduzione	a b c d e	12	16
	<i>Eisenia fetida</i> , <i>Eisenia andrei</i>	28 d	Mortalità, riproduzione	a b c d e	9	16
	<i>Chironomus</i> sp.	28 d, 65 d 44 d, 100 d	Emergenza adulti, mortalità, riproduzione	a b c d e	12	16
	<i>Arthrobacter globiformis</i>	6 h	Inibizione deidrogenasi	a b c d e	10,5	21,5
F	<i>Vibrio fischeri</i>	5, 15, 30	Inibizione bioluminescenza	a b c d e	6,5	21,5
	Semi mono-dicotiledoni	72 h	Germinazione e allungamento radicale	a b c d e	9	17
	<i>Myriophyllum aquaticum</i>	10 d	Inibizione crescita	a b c d e	11	17
H	cellule V79	24 h	genotossicità	a b c d e	9	15
	<i>Salmonella typhimurium</i> Test di Ames	48, 72 h	Citotossicità mutagenicità genotossicità	a b c d e	9	18
	<i>Pseudomonas putida</i>	16 h	Inibizione crescita	a b c d e	11	19
	<i>Salmonella typhimurium</i> umu-test	4 h	Genotossicità	a b c d e	9	18
	<i>Vibrio fischeri</i>	5, 15, 30	Inibizione bioluminescenza	a b c d e	6,5	21,5
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	72 h	Inibizione crescita	a b c d e	11	20

<i>Ulva pertusa</i>	96 h	Inibizione riproduzione	a b c d e	8	10
<i>Lemna minor</i>	168 h	Inibizione crescita	a b c d e	12	16
<i>Brachionus calyciflorus</i>	48 h	Inibizione crescita	a b c d e	13	18
<i>Daphnia magna</i>	24 – 48 h	Immobilizzazione	a b c d e	11	21
<i>Daphnia magna</i>	21 d	Riproduzione	a b c d e	13	16
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	7 d	Riproduzione	a b c d e	13	16
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	7 d	Mortalità	a b c d e	11	18
<i>Thamnocephalus platyrus</i>	24 h	Mortalità	a b c d e	9	18
<i>Danio rerio</i> adulti	24, 48, 72, 96 h	Mortalità	a b c d e	9	19
<i>Danio rerio</i> uova	10 (14) d	Schiusa uova, sopravvivenza	a b c d e	11	16
<i>Danio rerio</i> embrioni	48 h	Mortalità	a b c d e	11	14
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	14 d, 28 d	Crescita	a b c d e	10	19
<i>Cyprinus carpio</i>	14 d, 28 d	Crescita	a b c d e	10	19
EROD		Induzione del citocromo P450 1A	a b c d e	10,5	14,5
Vitellogenina		Saggio enzimatico ELISA	a b c d e	10,5	14,5
<i>Xenopus laevis</i>	12 d	Genotossicità	a b c d e	12	12



## CAPITOLO 4: COMPOSIZIONE E VALUTAZIONE DELLE BATTERIE

### **Premessa**

Sulla base dei saggi proponibili di cui al Capitolo 3 del presente manuale ed in particolare dei fattori di ponderazione attribuiti ai singoli saggi ecotossicologici basati su organismi appartenenti a diversi livelli trofici, 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 sulle acque interne.

Nel seguito, verranno 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 - Obiettivo a: monitoraggio ambientale**

In ambienti con substrato duro ovviamente è prescritto il comparto I (acqua) e sono richiesti saggi di Tipo H (con acqua e organismi non bentonici). È quindi indicata la batteria forse più comunemente utilizzata, composta di batteri, alghe e *Daphnia* (Batteria n. 1, Tabella 4.1).

**Tabella 4.1** – Batteria indicata n.1: comparto I, saggi di tipo H, 3 endpoint.

<b>Batteria N. 1</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inibizione crescita	ISO/FDIS 8692: 2011
Tipo H	<i>Daphnia magna</i>	Immobilizzazione	EN ISO 6341: 2012
<i>Valenza ecologica</i>	71,15 %		
<i>Valenza pratica</i>	92,26 %		
<i>Valenza scientifico-pratica</i>	81,71 %		

Questa batteria conferma dunque l'ottima affidabilità verificata dall'esperienza pratica, è basata su metodi ufficiali italiani e normalizzati a livello internazionale e, in assenza di allevamenti/colture, può essere applicata con kit commercialmente disponibili.

Come si può osservare, ha una elevata valenza ecologica (71,15 su un massimo teorico del 100 %) ed una elevatissima valenza pratica (92,26 %), cosa che la rende particolarmente adatta all'applicazione di routine.

Su basi scientifiche, potrebbe essere consigliata una seconda batteria, sostituendo il saggio con *Vibrio fischeri*, organismo non indigeno nelle acque dolci (Batteria n. 2, Tabella 4.2).

**Tabella 4.2** – Batteria indicata n. 2: comparto I, saggi di tipo H, 3 endpoint.

<b>Batteria N. 2</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Inibizione crescita	ISO 20666: 2008
Tipo H	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inibizione crescita	ISO/FDIS 8692: 2011
Tipo H	<i>Daphnia magna</i>	Immobilizzazione	EN ISO 6341: 2012
<i>Valenza ecologica</i>	83,33 %		
<i>Valenza pratica</i>	88,10 %		
<i>Valenza scientifico – pratica</i>	85,71 %		

L'aumento della valenza ecologica compensa la lieve diminuzione della valenza pratica, dovuta alla maggior durata del saggio con il rotifero rispetto a quella del batterio, ed infatti complessivamente aumenta la valenza scientifico – pratica.

Allo scopo di includere un diverso endpoint, viene indicata anche la batteria n. 3 (Tabella 4.3).

**Tabella 4.3** – Batteria indicata n. 3: comparto I, saggi di tipo H, 3 endpoint.

<b>Batteria N. 3</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Salmonella typhimurium</i> Test di Ames	Mutagenicità, genotossicità	ISO/DIS 11350: 2011
Tipo H	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inibizione crescita	ISO/FDIS 8692: 2011
Tipo H	<i>Daphnia magna</i>	Immobilizzazione	EN ISO 6341: 2012
<i>Valenza ecologica</i>	74,36 %		
<i>Valenza pratica</i>	84,52 %		
<i>Valenza scientifico – pratica</i>	79,44%		

Le batterie 4 e 5 aumentano a 4 il numero di saggi con endpoint diversi (Tabelle 4.4 e 4.5), mentre le batterie 6 e 7 includono un pesce (Tabelle 4.6 e 4.7).

**Tabella 4.4** – Batteria indicata n. 4: comparto I, saggi di tipo H, 4 endpoint.

<b>Batteria N. 4</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inibizione crescita	ISO/FDIS 8692: 2011
Tipo H	<i>Daphnia magna</i>	Immobilizzazione	EN ISO 6341: 2012
Tipo H	<i>Salmonella typhimurium</i> (Test di Ames)	Mutagenicità, genotossicità	ISO/DIS 11350: 2011
<i>Valenza ecologica</i>	59,38 %		
<i>Valenza pratica</i>	89,73 %		
<i>Valenza scientifico – pratica</i>	74,55%		

**Tabella 4.5** – Batteria indicata n. 5: comparto I, saggi di tipo H, 4 endpoint.

<b>Batteria N. 5</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Inibizione crescita	ISO 20666: 2008
Tipo H	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inibizione crescita	ISO/FDIS 8692: 2011
Tipo H	<i>Daphnia magna</i>	Immobilizzazione	EN ISO 6341: 2012
Tipo H	<i>Salmonella typhimurium</i> Test di Ames	Mutagenicità, genotossicità	ISO/DIS 11350: 2011
<i>Valenza ecologica</i>	67,26 %		
<i>Valenza pratica</i>	86,61 %		
<i>Valenza scientifico – pratica</i>	76,94%		

**Tabella 4.6** – Batteria indicata n. 6: comparto I, saggi di tipo H, 4 endpoint.

<b>Batteria N. 6</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inibizione crescita	ISO/FDIS 8692: 2011
Tipo H	<i>Daphnia magna</i>	Immobilizzazione	EN ISO 6341: 2012
Tipo H	<i>Danio rerio</i> embrioni	Mortalità	UNI EN ISO 15088: 2009
<i>Valenza ecologica</i>	63,53 %		
<i>Valenza pratica</i>	86,16 %		
<i>Valenza scientifico – pratica</i>	74,84%		

**Tabella 4.7** – Batteria indicata n. 7: comparto I, saggi di tipo H, 4 endpoint.

<b>Batteria N. 7</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Inibizione crescita	ISO 20666: 2008
Tipo H	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inibizione crescita	ISO/FDIS 8692: 2011
Tipo H	<i>Daphnia magna</i>	Immobilizzazione	EN ISO 6341: 2012
Tipo H	<i>Danio rerio</i> embrioni	Mortalità	UNI EN ISO 15088: 2009
<i>Valenza ecologica</i>	71,42 %		
<i>Valenza pratica</i>	83,04 %		
<i>Valenza scientifico – pratica</i>	77,23%		

Infine, le batterie 8 e 9 propongono un insieme più articolato, con 5 saggi, adatta per studi di approfondimento (Tabelle 4.8 e 4.9).

**Tabella 4.8** – Batteria indicata n. 8: comparto I, saggi di tipo H, 5 endpoint.

<b>Batteria N. 8</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inibizione crescita	ISO/FDIS 8692: 2011
Tipo H	<i>Daphnia magna</i>	Immobilizzazione	EN ISO 6341: 2012
Tipo H	<i>Danio rerio</i> embrioni	Mortalità	UNI EN ISO 15088: 2009
Tipo H	<i>Salmonella typhimurium</i> Test di Ames	Mutagenicità, genotossicità	ISO/DIS 11350: 2011
<i>Valenza ecologica</i>	62,26 %		
<i>Valenza pratica</i>	85,36 %		
<i>Valenza scientifico – pratica</i>	73,81%		

Per il monitoraggio ambientale di ambienti con substrati non duri (sabbiosi, fangosi e misti) 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).

Una prima batteria potrebbe quindi essere basata sulla batteria n. 1 (saggi ufficiali), con l'aggiunta di un saggio di tipo A (con sedimento intero e organismi bentonici) con endpoint multipli (totale: 4 saggi con 7 endpoint diversi) (Batteria n. 10, Tabella 4.10).

**Tabella 4.9** – Batteria indicata n. 9: comparto I, saggi di tipo H, 5 endpoint.

<b>Batteria N. 9</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Inibizione crescita	ISO 20666: 2008
Tipo H	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inibizione crescita	ISO/FDIS 8692: 2011
Tipo H	<i>Daphnia magna</i>	Immobilizzazione	EN ISO 6341: 2012
Tipo H	<i>Danio rerio</i> embrioni	Mortalità	UNI EN ISO 15088: 2009
Tipo H	<i>Salmonella typhimurium</i> Test di Ames	Mutagenicità, genotossicità	ISO/DIS 11350: 2011
<i>Valenza ecologica</i>	68,65 %		
<i>Valenza pratica</i>	80,00 %		
<i>Valenza scientifico – pratica</i>	74,33 %		

**Tabella 4.10** – Batteria indicata n. 10: comparti I, IV; saggi di tipo H e A; 7 endpoint.

<b>Batteria N. 10</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inibizione crescita	ISO/FDIS 8692: 2011
Tipo H	<i>Daphnia magna</i>	Immobilizzazione	EN ISO 6341: 2012
Tipo A	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Mortalità	ISO 10872: 2010 15088: 2009
Tipo A	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Crescita	ISO 10872: 2010 15088: 2009
Tipo A	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Fertilità	ISO 10872: 2010 15088: 2009
Tipo A	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Riproduzione	ISO 10872: 2010 15088: 2009
<i>Valenza ecologica</i>	47,91 %		
<i>Valenza pratica</i>	80,36 %		
<i>Valenza scientifico – pratica</i>	64,13%		

In alternativa, può essere proponibile una batteria meno convenzionale, basata su kit commercialmente disponibili, con 4 saggi (di cui uno con due endpoint), 6 specie e 4 endpoint diversi, che pur prevedendo una durata complessiva maggiore (6 giorni per il saggio con l'ostracode *Heterocypris incongruens* invece che 96 ore per il nematode *Caenorhabditis elegans*), ha una migliore valenza ecologica e scientifico – pratica (Batteria n. 11, Tabella 4.11).

**Tabella 4.11** – Batteria indicata n. 11: comparti I, IV; saggi di tipo H, B e A; 4 endpoint.

<b>Batteria N. 11</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo B	Semi (3 specie)	Germinazione e allungamento radicale	Metodo Ufficiale UNICHIM N. 1651: 2003
Tipo H	<i>Thamnocephalus platyrus</i>	Mortalità	ISO 14380: 2011
Tipo A	<i>Heterocypris incongruens</i>	Mortalità	ISO 14371: 2012
Tipo A	<i>Heterocypris incongruens</i>	Crescita	ISO 14371: 2012
<i>Valenza ecologica</i>	67,82 %		
<i>Valenza pratica</i>	75,71 %		
<i>Valenza scientifico – pratica</i>	71,77%		

Entrambe queste batterie possono essere completate con un saggio raccomandato sull'acqua interstiziale (Batterie n. 12 e 13, Tabelle 4.12 e 4.13).

**Tabella 4.12** – Batteria indicata n. 12: comparti I, II, IV; saggi di tipo H, A e C; 8 endpoint.

<b>Batteria N. 12</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inibizione crescita	ISO/FDIS 8692: 2011
Tipo H	<i>Daphnia magna</i>	Immobilizzazione	EN ISO 6341: 2012
Tipo A	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Mortalità	ISO 10872: 2010 15088: 2009
Tipo A	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Crescita	ISO 10872: 2010 15088: 2009
Tipo A	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Fertilità	ISO 10872: 2010 15088: 2009
Tipo A	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Riproduzione	ISO 10872: 2010 15088: 2009
Tipo C	<i>Salmonella typhimurium</i> Test di Ames	Mutagenicità, genotossicità	ISO/DIS 11350: 2011
<i>Valenza ecologica</i>	48,29 %		
<i>Valenza pratica</i>	79,69 %		
<i>Valenza scientifico – pratica</i>	63,99 %		

**Tabella 4.13** – Batteria indicata n. 13: comparti I, II, IV; saggi di tipo H, B, A e C; 8 endpoint.

<b>Batteria N. 13</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo B	<i>Semi (3 specie)</i>	Germinazione e allungamento radicale	Metodo Ufficiale UNICHIM N. 1651: 2003
Tipo H	<i>Thamnocephalus platyrus</i>	Mortalità	ISO 14380: 2011
Tipo A	<i>Heterocypris incongruens</i>	Mortalità	ISO 14371: 2012
Tipo A	<i>Heterocypris incongruens</i>	Crescita	ISO 14371: 2012
Tipo C	<i>Salmonella typhimurium</i> (Test di Ames)	Mutagenicità, genotossicità	ISO/DIS 11350: 2011
<i>Valenza ecologica</i>	67,80 %		
<i>Valenza pratica</i>	75,60 %		
<i>Valenza scientifico – pratica</i>	71,70%		

#### **4.2 - Obiettivi b e c: effluenti e ambienti recettori, monitoraggio ai fini della balneazione**

Viene proposta la seguente differenziazione tra scarichi e recettori:

- **b<sub>1</sub>**, solo effluente, prescritto il comparto **I** (Acqua, tal quale/filtrato: saggi di tipo H) + raccomandati saggi di tipo C e/o G sui Solidi Sospesi dello scarico, comparto **III** (elutriati) e V (estratti);
- **b<sub>2</sub>**, scarico accidentale, come **b<sub>1</sub>** + recettore (monte/valle) come **b<sub>3</sub>**;
- **b<sub>3</sub>**, recettore, prescritti comparto **I** (acqua) e **IV** (sedimenti, escludendo ovviamente gli ambienti con substrato duro 1), con saggi di tipo H, A/B, + raccomandato il comparto **II** (acqua interstiziale), con saggi di tipo D, C/G.

Pertanto, per l'obiettivo **b<sub>1</sub>** possono essere indicate le batterie 1 o 2; con l'eventuale integrazione di un saggio di tipo C con elutriati o estratti dai solidi sospesi, non bentonici (senza fase solida), si ottengono le batterie 14 e 15 (Tabelle 4.14 e 4.15).

**Tabella 4.14** – Batteria indicata n. 14: comparti I, III o V; saggi di tipo H e C; 4 endpoint.

<b>Batteria N. 14</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo H	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inibizione crescita	ISO/FDIS 8692: 2011
Tipo H	<i>Daphnia magna</i>	Immobilizzazione	EN ISO 6341: 2012
Tipo C	<i>Salmonella typhimurium</i> (Test di Ames)	Mutagenicità, genotossicità	ISO/DIS 11350: 2011
<i>Valenza ecologica</i>	56,88 %		
<i>Valenza pratica</i>	87,05 %		
<i>Valenza scientifico – pratica</i>	71,97 %		

**Tabella 4.15** – Batteria indicata n. 15: comparti I, III o V; saggi di tipo H e C; 4 endpoint.

<b>Batteria N. 15</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Inibizione crescita	ISO 20666: 2008
Tipo H	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inibizione crescita	ISO/FDIS 8692: 2011
Tipo H	<i>Daphnia magna</i>	Immobilizzazione	EN ISO 6341: 2012
Tipo C	<i>Salmonella typhimurium</i> (Test di Ames)	Mutagenicità, genotossicità	ISO/DIS 11350: 2011
<i>Valenza ecologica</i>	64,77 %		
<i>Valenza pratica</i>	83,93 %		
<i>Valenza scientifico – pratica</i>	74,35 %		

Si noti che queste ultime due batterie differiscono dalle 4 e 5 per la diversa applicazione del saggio di genotossicità (saggio di tipo C invece che H) e quindi per la differente rappresentatività della matrice per la specifica applicazione agli effluenti, il che comporta un diverso calcolo delle valenze.

Per gli obiettivi **b**<sub>2</sub>, scarico accidentale, e **b**<sub>3</sub>, recettore, sono proponibili le corrispondenti batterie dell'obiettivo **a** (monitoraggio ambientale), dove per i saggi di tipo H l'acqua è quella dell'effluente, mentre per i saggi con sedimento si intende il sedimento del corpo recettore.

Da notare che a causa della diversa rappresentatività della matrice per la specifica applicazione, le valenze sono leggermente inferiori. Ad esempio, la batteria 11 ha una valenza ecologica del 65,61 % (invece di 67,82 %), una valenza pratica del 75,71 (uguale) e una valenza scientifico – pratica del 70,66 % (contro il 71,77 %).

Per l'obiettivo c (monitoraggio ai fini della balneazione) sono proponibili le medesime batterie previste per l'obiettivo **b**<sub>3</sub>.

#### **4.3 - Obiettivo d: salvaguardia, protezione e recupero di ambienti particolari**

L'obiettivo **d** (suddiviso in **d**<sub>1</sub>: riserve, parchi e zone di particolare pregio naturalistico; **d**<sub>2</sub>: ittiocolture) rappresenta un caso particolare del monitoraggio ambientale e richiede solo un livello superiore di attenzione.

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

Sono dunque indicate la batteria 13 per l'obiettivo **d**<sub>1</sub> e la batteria 8 per l'obiettivo **d**<sub>2</sub>.

#### **4.4 - Obiettivo e: dragaggi**

Le batterie teoricamente proponibili, in funzione della rilevanza di ciascun saggio, degli ambienti (esclusi ovviamente ambienti con substrati duri) e degli obiettivi, potrebbero essere le seguenti:

Comparti **2** (sabbia - ghiaia), **3, 4** (substrato fangoso o sedimenti misti) e obiettivo (**e**<sub>1</sub>, 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  $e_1$ , effetti sul sito dragato, ed  $e_2$ , smaltimento a terra di sedimento dragato da ambienti 2, 3, 4, sono da prevedere anche saggi di Tipo C, con elutriati (o estratti) da sedimento intero e organismi non bentonici.

Una batteria che risponde a questi requisiti è la n. 16 (Tabella 4.16).

**Tabella 4.16** – Batteria indicata n. 16: comparti II, III e IV; saggi di tipo H, B, C e A; 6 endpoint.

<b>Batteria N. 16</b>			
<b>Saggio</b>	<b>Specie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Protocollo</b>
Tipo H	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescenza	ISO 11348-3: 1998
Tipo B	<i>Semi (3 specie)</i>	Germinazione e allungamento radicale	Metodo Ufficiale UNICHIM N. 1651: 2003
Tipo H	<i>Thamnocephalus platyrus</i>	Mortalità	ISO 14380: 2011
Tipo A	<i>Heterocypris incongruens</i>	Mortalità	ISO 14371: 2012
Tipo A	<i>Heterocypris incongruens</i>	Crescita	ISO 14371: 2012
Tipo C	<i>Salmonella typhimurium</i> Test di Ames	Mutagenicità, genotossicità	ISO/DIS 11350: 2011
<i>Valenza ecologica</i>	60,71 %		
<i>Valenza pratica</i>	75,89 %		
<i>Valenza scientifico – pratica</i>	68,30%		

#### **4.5 - Conclusioni**

Nel presente Capitolo sono state identificate alcune batterie possibili, differenziate per ambienti e obiettivi, che comprendono saggi prioritari e test raccomandati per approfondimenti.

Un totale di 10 saggi diversi, con organismi bentonici e non bentonici, comprendenti batteri (*Vibrio fischeri*, *Salmonella typhimurium*), rotiferi (*Brachionus calyciflorus*), vegetali (*Pseudokirchneriella subcapitata*, semi di piante superiori), crostacei (*Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyrus*, *Heterocypris incongruens*), nematodi (*Caenorhabditis elegans*) e pesci (*Danio rerio*), che coprono 8 endpoint (bioluminescenza, mortalità, crescita, fertilità, riproduzione, sviluppo, mutagenicità e genotossicità), potrebbero bastare a soddisfare tutte le esigenze.

Per eventuali esigenze di approfondimento, le 16 batterie identificate possono essere opportunamente modificate e/o ampliate, introducendo altri saggi tra quelli discussi nel Capitolo 3 (organismi).

---

## CAPITOLO 5: SCALE DI TOSSICITÀ E INDICI INTEGRATI

### **Premessa**

Il gruppo *ad hoc* “Batterie, scale di tossicità e indici integrati” ha ricevuto il mandato di esplorare la possibilità di stabilire una scala di tossicità da applicare ai saggi ecotossicologici che compongono una batteria, indipendentemente dal loro numero e tipo, e di formulare, 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, nell’Allegato 5, alla parte Terza, 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 del Capitolo viene discussa una proposta di scale ed indici, limitatamente ai saggi di tossicità.

Questo documento riporta una sintesi dell’analoga parte pubblicata nella medesima collana ISPRA (Manuale e Linee Guida 67/2011) (*Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre*), al quale si rimanda per la versione integrale.

### **5.1 - Indice proposto**

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:

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

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:

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

Nel caso della mortalità:

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

Ai valori negativi si assegna un valore di 0.

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

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

Consistenza e 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.

Viste le finalità eminentemente pratiche di questo manuale, si è ritenuto sufficiente procedere ad una rielaborazione dell'approccio di Hartwell (1997), resa necessaria per superare certe limitazioni: ad esempio, per la % di 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 concentrazioni relativamente basse di 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 % di 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 perché 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 sulla base del seguente algoritmo:

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

Per la severità, Hartwell (1997) prende in considerazione solo 3 casi: mortalità, fecondità e crescita. Il gruppo *ad hoc* 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 questi fattori di ponderazione:

- 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 seguenti fattori della matrice:

- 1 Estratto;
- 2 Elutriato;
- 3 Acqua interstiziale o sedimento disidratato;
- 4 Sedimento tal quale;
- 5 Acqua della colonna o effluente.

Questa impostazione riflette un ordine crescente di “*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:

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

E per la tossicità:

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

---

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

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

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 (severità x matrice x CSS) $_{\max}$  della batteria considerata:

$$\% PPR_e = \% \text{ risposta}_{\max, \text{CSS}_{\max}} \times PPR_e / PPR_{\max}$$

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

Il massimo corrisponde alla tossicità altamente significativa (CSS = 0,99) per un test di rilevanza massima (severità = 5) su sedimento intero (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 % 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 (severità x matrice x CSS), verrà utilizzata come % risposta $_{\max, \text{CSS}_{\max}}$  la % risposta più elevata tra i test nella condizione (severità x matrice x CSS) $_{\max}$  per la batteria considerata.

Il punteggio di tossicità (PT) si calcola come:

$$PT = (\sum \% PPR_e) / \sqrt{N},$$

ed il punteggio di rischio totale (PRT) come:

$$PRT = [(\sum \% PPR_e) + \text{consistenza}] / \sqrt{N}.$$

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:

$$\% PR = \% PT \times PRT / PT$$

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:

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

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, si è concordato di utilizzare un "giudizio esperto" di questo tipo:

- % PT ≤ 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);

- % < % PT < 20 % e consistenza  $\leq 0$  – tossicità moderata;
- % < % 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;
- % < % 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, è stato predisposto un foglio di calcolo (Excel) che consente di effettuare l'elaborazione e fornisce anche una rappresentazione grafica del risultato finale.

Si consideri ad esempio una batteria composta da 6 test con 8 endpoint:

1. *Daphnia magna* DM, mortalità M e riproduzione R, su acqua sovrannatante AS;
2. Alga AL, crescita C, su acqua sovrannatante 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 delle seguenti informazioni: 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.

Sulla base dei fattori per significatività, matrice e coefficiente correttivo statistico (calcolati automaticamente in base alle informazioni inserite ed al confronto statistico tra campione e controllo), si ottiene quindi 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 5.1).

A questo punto si ha il punteggio di tossicità, pari a 30,8, come somma dei %PPR<sub>e</sub> 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 rischio sale a 53,5. 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 %PPR<sub>e</sub> parziali, la percentuale di tossicità %PT complessiva è pari a 10,9 % (su una scala da 0 a 100), con %PPR<sub>e</sub> minima di 1,30 % e massima del 22,2 %). Tenendo conto della consistenza, il rischio, su un massimo teorico del 100 %, è pari al 18,9 %, per una batteria di endpoint che ha una rilevanza complessiva del 53,5 %.

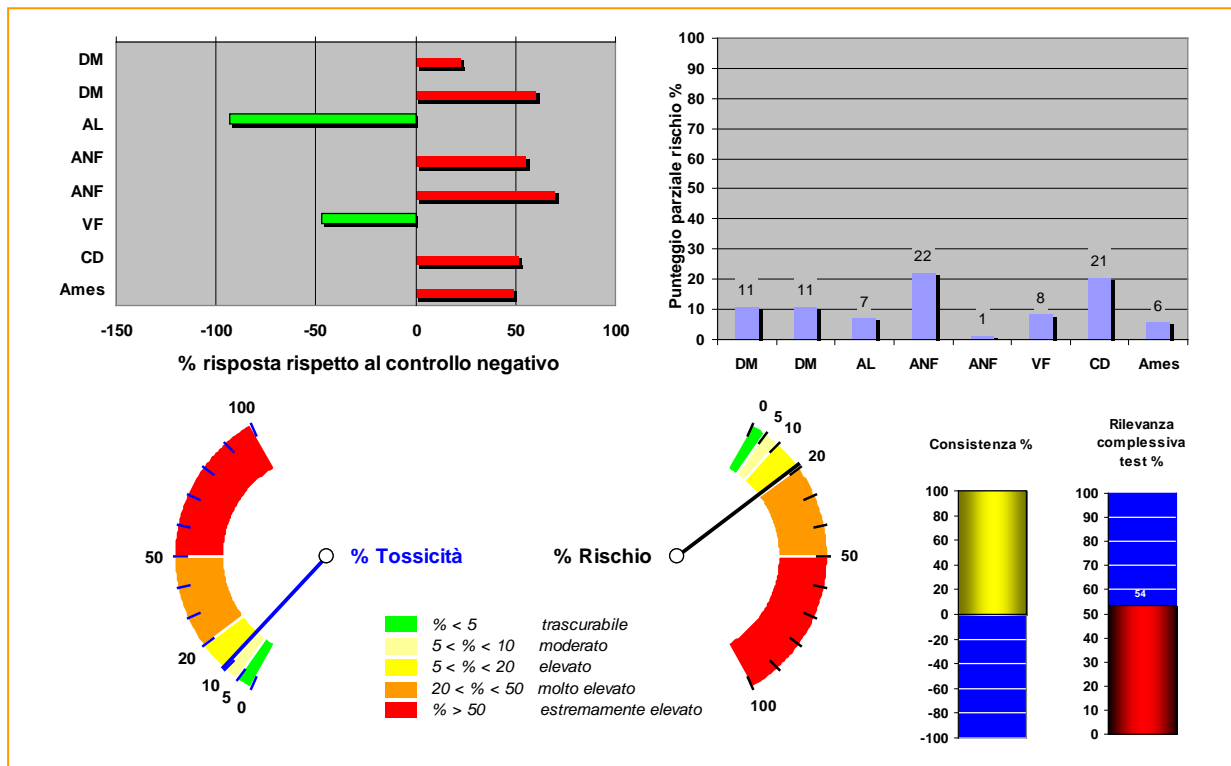
Graficamente, si può esprimere così: la % risposta rispetto al controllo negativo indica se c'è biostimolazione o inibizione per l'endpoint considerato; il % punteggio parziale di rischio mette a confronto i diversi endpoint, corretti per i fattori severità, comparto e statistica; la % tossicità e la % di 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 rischio è superiore alla tossicità, perché c'è consistenza massima.

**Tabella 5.1** – Esempio di calcolo di PPR per una batteria costituita da 6 test con 8 endpoint.

Test	Endpoint	Matrice	90° MSD (% risposta)	n repliche controllo	Media Controllo	Devst Controllo	n repliche campione	Risposta campione	Devst campione
DM	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

% 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



**Figura 5.1** - Rappresentazione grafica dei risultati del calcolo di tossicità e del rischio applicato all'esempio di cui al paragrafo 5.1.



---

## 5.2 - Conclusioni

Con questo documento il gruppo *ad hoc* ritiene di aver assolto il compito che gli era stato affidato, avendo elaborato un indice sintetico che 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 strumento di lavoro e non può sostituirsi alla valutazione critica e alla responsabilità dell'utilizzatore.

Il gruppo *ad hoc* infine ha stabilito che ciascun partecipante utilizzerà questo strumento con i propri dati reali, per verificare in particolare l'attendibilità 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.

L'invito alla verifica con dati reali è ovviamente esteso a tutti gli utilizzatori di questo indice sintetico, con preghiera di informare il gruppo *ad hoc* e/o gli Autori del volume di qualunque perplessità e/o difficoltà riscontrate, proponendo eventuali modifiche nel numero di parametri e nei rispettivi fattori di ponderazione.

---

## BIBLIOGRAFIA

- Adriaanse M., Niederländer H.A.G and Stortelder P.B.M., 1995. Monitoring water quality in the future. Vol. 1. Chemical monitoring. *Min. Housing*, The Netherlands: 100 pp.
- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E., 1975. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
- Andersen P., 1996. Design and implementation of some harmful algal monitoring systems. Paris, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, Technical Series No. 44.
- 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. Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality.
- APAT-IRSA, 2003a. 8030 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con batteri bioluminescenti. In: *Metodi analitici per le acque*, 8000 – Metodi ecotossicologici. Manuali e Linee Guida 29/2003.
- APAT-IRSA, 2003b. 8020. Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia* In: *Metodi analitici per le acque*, 8000 – Metodi ecotossicologici. Manuali e Linee Guida 29/2003.
- APAT-IRSA, 2003c. 8100. Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con *Ceriodaphnia dubia*. In: *Metodi analitici per le acque*, 8000 – Metodi ecotossicologici. Manuali e Linee Guida 29/2003.
- APAT-IRSA, 2003d. 8040. Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Ceriodaphnia dubia*. In: *Metodi analitici per le acque*, 8000 – Metodi ecotossicologici. Manuali e Linee Guida 29/2003.
- APAT-IRSA, 2003e. 8010. Metodi di valutazione della tossicità con pesci. In: *Metodi analitici per le acque*, 8000 – Metodi ecotossicologici. Manuali e Linee Guida 29/2003.
- 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.
- ARPAT, 1998. Metodologie di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico.
- ASTM, 1994. Standard Guide for Designing Biological Tests With Sediments. ASTM E1525: 22 pp.
- ASTM, 2002. Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing. ASTM E1391: 22 pp.
- ASTM, 2004. Practice for Algal Growth Potential Testing with *Pseudokirchneriella subcapitata*. ASTM D3978-04.
- Bertoni R., 2001. Introduzione allo studio della limnologia (ecologia e biologia delle acque dolci. Versione elettronica di Roberto Bertoni del testo originale rivisto da Gianluigi Giussani. CNR Istituto Italiano di Idrobiologia.
- Bombardier, M, and N. Bermingham, 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.
- 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.
- 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.M. Biedenbach, R.L. Hooten, K. Miller and S. Saepof, 2001b. Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) Studies at Marine Sites Suspected of Ordnance Contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 41: 298-307.
- Carr, R.S., M. Nipper and G.G. Bouchot, 2004. Final Report on Toxicity Testing of Sediments from the Sian Ka'an Biosphere Reserve, Quintana Roo, Mexico.
- Chapman, P.M. and F. Wang, 2001. Assessing sediment contamination in estuaries. *Environ. Contam. Toxicol.*, 20: 3-22.
- Code of Federal Regulations, 2001. TITLE 40, Protection of Environment, Chapter I-EPA, 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.
- 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.
- Dan Wall, V., J. London, J.E. Warren, R. Gossett, M.D. Wenzel and S.J. Klaine, 1998. Development of a continuous-flow renewal system for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 1159-1164.
- Ducrot, V., P. Usseglio-Polatera, A.R.R. Péry, J. Mouthon, M. Lafont, M.-C. Roger, J. Garric and J.-F. Féraud, 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.
- ECETOC, 1993. *Aquatic Toxicity Data Evaluation*. ECETOC: 64 pp.
- EN ISO, 2012. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test). EN ISO 6341, 2012
- Environment Canada, 1993. Genotoxicity using the *Escherichia coli* PQ37 bacterium (SOS Chromotest). Montreal, PQ.
- Environmental Bio-detection Products, 1995. *ToxiChromo-Pady—Instructions for Use*, Ver 3.1. Brampton, ON, Canada.
- Forbes, V.E., A. Plamqvist and L. Bach, 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 272-280.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Illies, J., 1978. *Limnofauna Europaea*. G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- ISO, 1994. Water quality - Determination of the prolonged toxicity of substances to freshwater fish - Method for evaluating the effects of substances on the growth rate of rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Teleostei, Salmonidae)]. ISO 10229, 1994.
- ISO, 1999. Water quality - Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish - Semi-static method. ISO, 12890, 1999.
-

- 
- ISO, 2000a. Water quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test. ISO 13829, 2000.
- ISO, 2000b. Water quality - Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). ISO 10706, 2000.
- ISO, 2001. Water quality – Vocabulary. ISO 6107-3, 2001
- ISO, 2005. Water quality — Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods. ISO 16712: 2005.
- ISO, 2006a. Water quality - Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water. ISO 14442, 2006.
- ISO, 2006b. Water quality - Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei - Part 1: Evaluation of genotoxicity using Amphibian larvae. ISO 21427-1: 2006.
- ISO, 2008a. Water quality - Determination of the chronic toxicity to *Brachionus calyciflorus* in 48 h. ISO 20666, 2008.
- ISO, 2008b. Water quality - Determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia*. ISO 20665, 2008.
- ISO, 2010a. Water quality - Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test). ISO 21338, 2010.
- ISO, 2010b. Water quality - Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). ISO 0872, 2010.
- ISO, 2011. Water quality - Determination of the acute toxicity to *Thamnocephalus platyris* (Crustacea, Anostraca) at sublethal and lethal level. ISO 14380, 2011.
- ISO, 2012a. Water quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water - *Salmonella*/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test). ISO 11350, 2012.
- ISO, 2012b. Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO 8692, 2012.
- ISO, 2012c. Water Quality - Determination of fresh water sediment chronic toxicity to *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda). ISO 14371, 2012.
- ISO/CD, 2012. Water quality - Determination of the inhibition of dehydrogenase activity of *Arthrobacter globiformis* - Solid contact test using the redox dye resazurine. ISO 18187, 2012.
- ISO/DIS, 2011. Water quality - Toxicity test based on reproduction inhibition of the green macroalga *Ulva pertusa*. ISO/DIS 13308, 2011.
- ISO/DIS, 2012. Water quality - Determination of the toxic effect of sediment and soil on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum* - *Myriophyllum* test. ISO/DIS 16191, 2012.
- ISO/FDIS, 2012. Water quality - Biochemical and physiological measurements on fish - Part 3: Determination of vitellogenin. ISO/FDIS 23893-3, 2012.
- ISO/TR, 2008. Water quality - Scientific and technical aspects of batch algae growth inhibition tests. ISO 11044, 2008.
- ISO/TS, 2007. Water quality - Biochemical and physiological measurements on fish - Part 2: Determination of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD). ISO/TS 23893-2, 2007.
- 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.
- Kammann, U., J.C. Riggers, N. Theobald, H. Steinhart. 2000. Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. *Mutation Res.*, 467: 161-168.
- Kwan, K.K, 1993. Direct solid phase toxicity testing procedure. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 8: 345–350.

- 
- 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.
- McCready, S., G. Spyrikis, 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.
- Moriarty, F. 1990. *Ecotoxicology. The Study of Pollutants in Ecosystems*. Academic Press: 289 pp.
- Nendza, M., 2002. Inventory of marine biotest methods for the evaluation of dredged material and sediments. *Chemosphere*, 48: 865-883.
- 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.
- OECD, 1984. 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. OECD 203 1992.
- OECD, 1992c. Fish, Early-life Stage Toxicity Test, OECD 210 1992.
- OECD, 1997. Guideline for the Testing of Chemicals: Bacteria Reverse Mutation Test, Guideline 471.
- OECD, 1998. Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. OECD 212, 1998.
- OECD, 1998. *Daphnia magna* Reproduction Test. OECD, 211, 1998.
- OECD, 2000. Fish, Juvenile Growth Test. OECD 215, 2000.
- OECD, 2003. Terrestrial Plant Test: OECD 208: Seedling Emergence and Seedling Growth Test.
- OECD, 2004a. *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test, OECD, 202, 2004.
- OECD, 2004b. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*). OECD, 222, 2004.
- OECD, 2004c. Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment. OECD, 218, 2004.
- OECD, 2004d. Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water. OECD, 219, 2004.
- OECD, 2006a. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD 201.
- OECD, 2006b. *Lemna* sp. Growth Inhibition Test.
- OECD, 2007. Sediment - Water *Lumbriculus* Toxicity Test Using Spiked Sediment. OECD, 225, 2007.
- OECD, 2010. Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment. OECD, 233, 2010.
- OMS, 2004. Guideline for safe recreational waters: Volume 1. Coastal and fresh water.
- OSPAR, Commission, 2002. Survey on Genotoxicity Test Methods for the Evaluation of Waste Water within Whole Effluent Assessment.
- OSPAR, 2003a. Survey of the use of effect related methods to assess and monitor wastewater discharges. Testing of endocrine effects.
- OSPAR Commission, 2003a. *JAMP*, Guidelines for contaminant-specific biological effects monitoring. OSPAR Commission, Ref. No. 2003-10).
- OSPAR Commission, 2005. Whole effluent assessment report. 89pp.
- Pierce, R.H. and G.J. Kirkpatrick, 2001. Innovative techniques for harmful algal toxin analysis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 107-114.
- Power, E.A. and R.S. Boumphrey, 2004. International Trends in Bioassay Use for Effluent Management. *Ecotoxicology*, 13: 377-398

- 
- 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.
- Power E.A. and P.M. Chapman, 1992. Assessing Sediment Quality. In: Burton G.A. (Ed.). *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publ.: 1-18.
- Ramade, F. 1977. *Ècotoxicologie*. Masson: 205 pp.
- Stronkhorst, J., M.E. Schot, M.C. Dubbeldam and K.T. Ho, 2003. A toxicity identification evaluation of silty marine harbor sediments to characterize persistent and non-persistent constituents. *Mar. Pollut. Bull.*, 46: 56-64.
- 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.
- Thursby GB, Heltshe J, Scott KJ, 1997. Revised approach to toxicity test acceptability criteria using a statistical performance assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1322-1329.
- UNICHIM, 2003. Qualità dell'acqua – Determinazione dell'inibizione della germinazione e allungamento radicale *Cucumis sativus* L. (Cetriolo), *Lepidium sativum* L. (Crescione), *Sorghum saccharatum* Moench (Sorgo) (Saggio di tossicità cronica breve). MU N. 1651, Edizione 2003.
- UNI EN ISO, 1999a. Qualità dell'acqua - Prova di inibizione della crescita di *Pseudomonas putida* (prova di inibizione di moltiplicazione di cellule di *Pseudomonas*). UNI EN ISO 10712, 1999.
- UNI EN ISO, 1999b. Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità della *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Prova di tossicità acuta. EC 1-2004, UNI EN ISO 6341, 1999.
- UNI EN ISO, 2000. Qualità dell'acqua - Determinazione della tossicità letale acuta di sostanze su pesce di acqua dolce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Parte 1: Metodo statico – Parte 2: Metodo semistatico – Parte 3: Metodo in flusso continuo. UNI EN ISO 7346-1, 2000.
- UNI EN ISO, 2006. Qualità dell'acqua - Determinazione dell'effetto tossico di costituenti dell'acqua e dell'acqua di scarico su lenti d'acqua (*Lemna minor*) - Saggio di inibizione della crescita di lenti d'acqua. UNI EN ISO 20079, 2006.
- UNI EN ISO, 2009a. Qualità dell'acqua - Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di *Vibrio fischeri* (prova su batteri luminescenti) - Parte 1: Metodo con batteri preparati di fresco – Parte 2: Metodo con batteri disidratati – Parte 3: Metodo con batteri liofilizzati. UNI EN ISO 11348-1, 2009.
- UNI EN ISO, 2009b. Qualità dell'acqua - Determinazione della tossicità acuta delle acque reflue per le uova di pesce zebra (*Danio rerio*). UNI EN ISO 15088, 2009.
- UNI EN ISO, 2009c. Qualità dell'acqua - Valutazione della genotossicità per mezzo della misurazione dell'induzione di micronuclei - Parte 2: Metodo a popolazione mista che utilizza la linea delle cellule V79. UNI EN ISO 21427-2, 2009.
- 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.
- USEPA/ACS. 2000. 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, 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, Fifth Edition, EPA-821-R-02-012.
- Van Beelen P., 2003. A review on the application of microbial toxicity tests for deriving sediment quality guidelines. *Chemosphere*, 53: 795-808.

---

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.

Vighi, M. e E. Bacci (a cura di), 1998. *Ecotossicologia*. UTET, Torino: 237 pp.