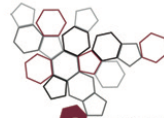


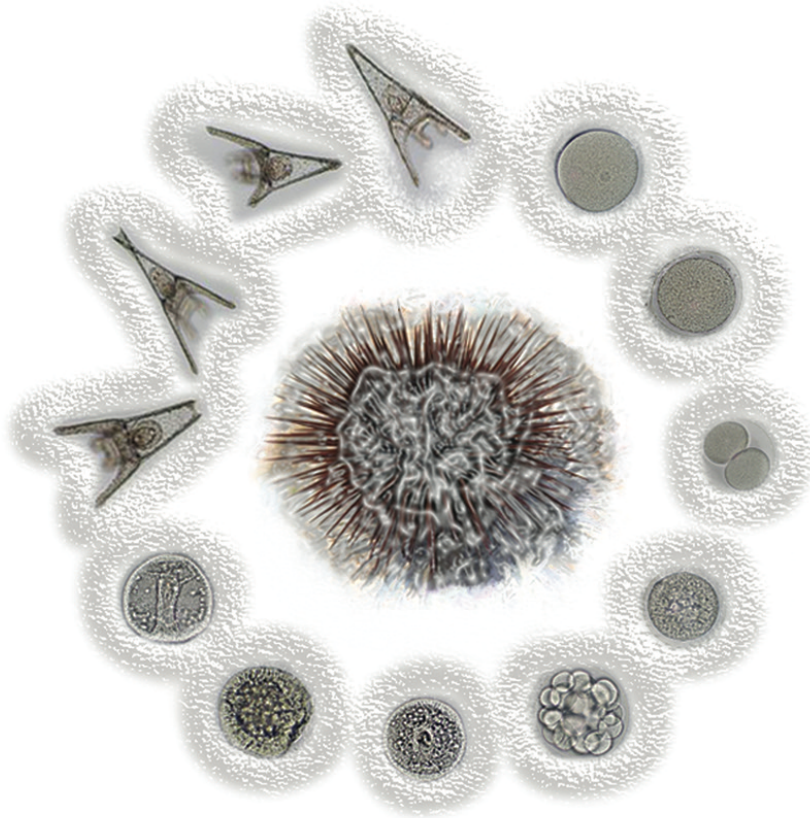


**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale  
per la Protezione  
dell'Ambiente



**SAGGIO DI FECONDAZIONE  
E SAGGIO DI SVILUPPO EMBRIONALE  
CON IL RICCIO DI MARE  
*PARACENTROTUS LIVIDUS* (LAMARCK)  
(ECHINODERMATA: ECHINOIDEA)**

Quaderni di Ecotossicologia

**RICERCA MARINA**



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale  
per la Protezione  
dell'Ambiente

**SAGGIO DI FECONDAZIONE  
E SAGGIO DI SVILUPPO EMBRIONALE  
CON IL RICCIO DI MARE  
*PARACENTROTUS LIVIDUS* (LAMARCK)  
(ECHINODERMATA: ECHINOIDEA)**

Quaderni di Ecotossicologia

### **Informazioni legali**

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

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

ISPRA, Quaderni – Ricerca Marina 11/2017  
ISBN 978-88-448-0870-9

Riproduzione autorizzata citando la fonte

### **Elaborazione grafica**

ISPRA

*Grafica di copertina:* Alessia Marinelli

*Foto di copertina:* [un'idea di] Silvia Giuliani

*Referenze fotografiche:* Lorenzo Morroni e Davide Sartori

### **Coordinamento editoriale:**

Daria Mazzella

**ISPRA** – Settore Editoria

DICEMBRE 2017

**A cura di:**

Simona MACCHIA (ISPRA, CN-COS)  
Davide SARTORI (ISPRA, CN-COS)

**Autori:**

Davide SARTORI (ISPRA, CN-COS)  
Simona MACCHIA (ISPRA, CN-COS)  
Valentina VITIELLO (ISPRA, CN-COS)  
Lorenzo MORRONI (Università Politecnica delle Marche)  
Fulvio ONORATI (ISPRA, CN-LAB)  
David PELLEGRINI (ISPRA, CN-COS)

**Hanno contribuito alla revisione finale del testo:**

Alessandra ARIZZI NOVELLI (ARTA ABRUZZO)  
Tristano LEONI (ARPA MARCHE)  
Samantha LERA (ARPA TOSCANA)  
Francesco REGOLI (Università Politecnica delle Marche)  
Annamaria VOLPI GHIRARDINI (Università di Venezia)

**Un ringraziamento per il supporto editoriale a:**

Cristian MUGNAI (ISPRA, CN-COS)

**Da citare come:**

Sartori D., Macchia S., Vitiello V., Morroni L., Onorati F., Pellegrini D., 2017. ISPRA, Quaderni – Ricerca Marina n. 11/2017. A cura di Macchia S., Sartori D., Roma, pp 60.

A Valeria Matranga,  
ricercatrice del CNR-IBIM di Palermo,  
scomparsa il 23 aprile 2016  
per averci accompagnato in un tratto di strada  
e avvicinato ancor più  
alla conoscenza di questi organismi marini,  
regalandoci la sua approfondita esperienza,  
la sua indimenticabile simpatia e disponibilità.

# INDICE

---

PRESENTAZIONE	p. 7
PREMESSA	p. 8
INTRODUZIONE	p. 9
<b>1. Specie test</b>	<b>p. 10</b>
1.1 Biologia ed ecologia della specie	p. 10
1.1.1 <i>Morfologia ed organizzazione strutturale</i>	p. 10
1.1.2 <i>Distribuzione ed habitat</i>	p. 11
1.1.3 <i>Abitudini alimentari</i>	p. 13
1.1.4 <i>Riproduzione e sviluppo embrionale</i>	p. 14
1.2 Utilizzo dei gameti in ecotossicologia	p. 19
1.3 Campionamento e stabulazione degli organismi	p. 20
1.3.1 <i>Mantenimento in stand-by della maturazione sessuale degli organismi adulti di Paracentrotus lividus</i>	p. 20
1.3.2 <i>Diete per il mantenimento della maturità sessuale</i>	p. 20
<b>2. Matrici ambientali e sostanze da testare</b>	<b>p. 23</b>
<b>3. Soluzioni, strumentazione e materiali</b>	<b>p. 24</b>
3.1 Acqua	p. 24
3.1.1 <i>Acqua di mare artificiale e naturale</i>	p. 24
3.1.2 <i>Acqua dolce</i>	p. 24
3.2 Soluzioni	p. 24
3.3 Strumentazione	p. 25
3.4 Materiali	p. 25
<b>4. Protocollo metodologico</b>	<b>p. 26</b>
4.1 Allestimento dei test di fecondazione e di sviluppo embrionale	p. 26
4.2 Prova con il tossico di riferimento (controllo positivo)	p. 27
4.3 Raccolta dei gameti	p. 29
4.4 Conteggio dei gameti	p. 30
4.5 Parametri da monitorare: salinità, pH, ossigeno disciolto e temperatura	p. 31
4.6 Esecuzione	p. 32
4.6.1 <i>Saggio di fecondazione</i>	p. 32
4.6.2 <i>Saggio di sviluppo embrionale</i>	p. 34
4.7 Lettura dei test di fecondazione e di sviluppo embrionale	p. 35
4.8 Elaborazione dei dati	p. 37
4.9 Validità dei risultati	p. 37

BIBLIOGRAFIA	p. 39
APPENDICE 1 - Conteggio dello sperma	p. 56
APPENDICE 2 - Anomalie nello sviluppo di <i>Paracentrotus lividus</i>	p. 58
APPENDICE 3 - Concentrazione di ammoniaca indissociata (NH <sub>3</sub> ) in soluzione acquosa	p. 59

## PRESENTAZIONE

---

In questi ultimi decenni, anche grazie alle collaborazioni di ISPRA con il mondo scientifico, è cresciuta l'attenzione e l'importanza delle analisi ecotossicologiche per la valutazione biologica degli effetti sugli organismi viventi dovuti alla presenza degli agenti inquinanti nelle diverse matrici ambientali.

Si è assistito ad applicazioni via via crescenti sulle matrici marine, in termini di specie utilizzate e di endpoint misurati ed in particolare sui sedimenti soggetti a movimentazione. Tali applicazioni sono testimoniate anche dalla manualistica prodotta da ISPRA sull'utilizzo di batterie di saggi biologici (Manuali e Linee Guida n. 67 del 2011 e n. 88 del 2013), su un percorso di accreditamento dei saggi ecotossicologici (Manuali e Linee Guida n. 121 del 2015), nonché sul ruolo primario attribuito all'approccio ecotossicologico in normative di settore, quali il DM 173/16 e il DD 8 Giugno 2016.

A seguito dell'inserimento dei saggi biologici nella normativa ambientale, tuttavia, al fine di garantire una maggiore confrontabilità dei risultati, è necessaria la disponibilità di protocolli metodologici standardizzati che garantiscano, unitamente alla significatività scientifica, i requisiti di una elevata rappresentatività ambientale e di una sufficiente manualità esecutiva, da raggiungere e mantenere anche per mezzo di circuiti di interconfronto tra laboratori.

Il sistema SNPA, con la collaborazione di diversi istituti scientifici (CNR, Università, Centri di ricerca pubblici e privati), da tempo lavora sull'argomento con momenti di formazione e approfondimento sulla materia.

All'interno di ISPRA e, più in generale di SNPA, la pubblicazione di questo primo "Quaderno di Ecotossicologia" rappresenta un esempio di interazione sinergica e funzionale tra CN-LAB<sup>1</sup> e CN-COS<sup>2</sup>, dove competenze ed esperienze diverse sono state messe a rete, creando un meccanismo virtuoso che condurrà ad altre proposte metodologiche, per un sempre maggiore impiego dei metodi ecotossicologici.

Maurizio Ferla CN-COS

Anna Maria Cicero CN-LAB

---

<sup>1</sup> Centro Nazionale per la rete nazionale dei laboratori.

<sup>2</sup> Centro Nazionale per la caratterizzazione ambientale e la protezione della fascia costiera, la climatologia marina e l'oceanografia operativa.



## PREMESSA

---

I protocolli per il “saggio di fecondazione” e per il “saggio di sviluppo embrionale” con *Paracentrotus lividus*, descritti nel presente volume, derivano dalle competenze e dalle esperienze del gruppo di lavoro della attuale “Sezione ISPRA per la valutazione del rischio ecologico” di Livorno, maturata a partire dagli anni novanta, anche grazie ad una serie di collaborazioni nell’ambito del “gruppo ad hoc Echinodermi” del Gruppo di Lavoro (GdL) UNICHIM “Tossicità di acque salate/salmastre e sedimenti”, promotore di primi esercizi di interconfronto con *P. lividus* eseguiti negli anni 2004-2009 (Arizzi Novelli et al., 2007b) tra i laboratori di diversi gruppi di ricerca nazionali (Università di Genova, Università di Venezia, ISPRA Livorno, ISPRA Roma, ARPA Marche, ARPA Emilia Romagna, CNR-IBIM Palermo, CNR-ISMAR Taranto, CNR-ISMAR Lesina, ENEA Portici, Thetis Venezia e CIBM Livorno).

Il modello “riccio di mare”, ed in particolare i saggi biologici descritti, rappresentano un primo contributo tecnico-scientifico per l’utilizzo di specie caratteristiche dei nostri mari e con elevata rappresentatività ecologica. L’utilizzo delle fasi embrionali permette, inoltre, di analizzare i processi biologici più sensibili rispetto ad endpoint estremi, quali la letalità, evidenziando un pericolo ambientale precoce per mezzo della misura di effetti subletali.

Questo primo quaderno di ecotossicologia si propone di fornire, oltre agli aspetti metodologici indispensabili per una standardizzazione delle prove, informazioni di base di carattere biologico ed ecologico, con suggerimenti ed indicazioni applicative ed operative riguardanti ad esempio la reperibilità ed il mantenimento degli organismi, nonché alcuni specifici approfondimenti tecnico-scientifici. Tali argomenti sono stati inseriti non solo per poter eseguire prove di interconfronto/intercalibrazione a livello nazionale con popolazioni naturali di organismi e definire una carta di controllo estensibile almeno all’intero SNPA, ma anche per agevolare un buon livello di autonomia del singolo laboratorio e porre le basi per prossimi aggiornamenti che coniughino alta rappresentatività ecologica ed efficace manualità di esecuzione. L’approfondimento delle conoscenze, supportato dalla sperimentazione su larga scala e dall’applicazione nei diversi contesti territoriali, costituisce quindi il presupposto per indispensabili aggiornamenti periodici, in analogia alle revisioni dei protocolli metodologici a diverso titolo normati.

## INTRODUZIONE

---

*Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) è una specie ampiamente diffusa, nonché uno dei principali erbivori della fascia costiera del Mediterraneo. La sua distribuzione geografica comprende parte della costa atlantica e le coste di tutto il Mar Mediterraneo. Vive generalmente nel piano infralitorale, prediligendo fondi rocciosi orizzontali o lievemente inclinati, ma è presente anche su pareti verticali e substrati meno stabili, come le praterie di *Posidonia oceanica* e *Zostera marina*.

La specie *P. lividus* ha trovato larga applicazione in campo ecotossicologico, in particolare nello studio degli effetti di sostanze pure e di effluenti sullo sviluppo embrionale (difetti nello sviluppo e aberrazioni mitotiche).

Le prove di spermiotossicità e di embriotossicità sono incluse nella lista ICES (1997) tra i saggi biologici più attendibili per il monitoraggio dell'inquinamento marino e appartengono ai pochi "short chronic tests" per acque marine ed estuarine per i quali l'USEPA (1994) ha prodotto dei protocolli standardizzati.

Nel presente volume è riportata una metodologia di esecuzione dei saggi biologici di fecondazione e di sviluppo embrionale ampiamente condivisa a livello nazionale.

Il **saggio di fecondazione (spermiotossicità)** prevede l'esposizione di un numero definito di gameti maschili alla soluzione da testare, allo scopo di valutare l'eventuale inibizione della capacità fecondante rispetto ad un controllo negativo. L'influenza delle sostanze tossiche sulla fecondazione delle uova è legata principalmente al loro effetto sulla motilità degli spermatozoi.

Il **saggio di sviluppo embrionale (embriotossicità)** prevede l'esposizione di un numero definito di zigoti alla soluzione da testare, allo scopo di valutare il successo dello sviluppo embrionale fino al raggiungimento dello stadio di pluteo a 4 braccia.

Nel presente volume non vengono trattati altri possibili saggi di sviluppo embrionale (ad esempio quello che considera l'esposizione dei gameti maschili).

## 1. SPECIE TEST

### 1.1 - Biologia ed ecologia della specie

*Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) appartiene al phylum *Echinodermata* (classe *Echinoidea*, ordine *Diademantoida*). Il nome assegnato al gruppo, di derivazione greca, si riferisce al fatto che il corpo di questi animali è frequentemente rivestito di spine.

#### 1.1.1 - Morfologia ed organizzazione strutturale

Gli Echinodermi sono deuterostomi con un celoma ben sviluppato. In Figura 1 è presentata la morfologia e l'organizzazione interna di un echinoide regolare quale è *P. lividus*. Le cavità corporee sono rivestite da peritoneo ed il liquido celomatico svolge un importante ruolo circolatorio.

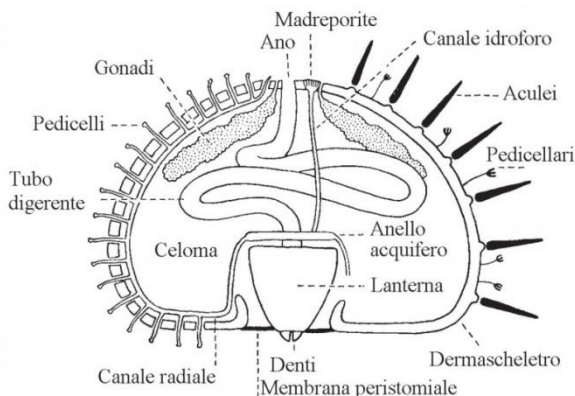


Figura 1: Morfologia ed organizzazione strutturale di un echinoide regolare (Tortonese, 1965; modif.)

Sono organismi marini stenoalini che, essendo dotati di scarsa mobilità, hanno sviluppato un sistema di protezione del corpo che consiste in una sorta di corazza (dermascheletro), costituita da una serie di piastre o ossicoli tetragonali, di natura calcarea. Le piastre sono saldate tra loro in modo rigido e insieme formano una teca che racchiude i visceri (Fig. 1). Il corpo è sferico e appiattito e lo scheletro si proietta all'esterno originando aculei mobili ricoperti da epiderma, lacerato alla punta di ogni aculeo. Questi ultimi non sono particolarmente lunghi, ma acuti e robusti, fitti e distribuiti uniformemente su tutto il corpo (Fig. 2). Il loro colore varia dal violetto al verde, dal rossastro al bruno anche se, come ampiamente documentato in letteratura, la colorazione non risulta essere associata né alle dimensioni né alla profondità dell'habitat (Mortensen, 1943; Cherbonnier, 1956; Tortonese, 1965; Gamble, 1966-1967).

La simmetria è pentamera. Ogni settore è composto da due zone, una radiale e l'altra interradiale: lungo le aree radiali si trovano organuli molto particolari, chiamati pedicelli o podi, che hanno funzione deambulatoria, tattile e in alcuni casi prensile (per questo motivo queste aree sono anche chiamate ambulacrali). Le zone interambulacrali sono invece sprovviste di pedicelli. Sugli ossicoli delle zone ambulacrali e interambulacrali sono presenti dei tubercoli primari di forma mammellonata su cui si impiantano gli aculei.



Figura 2: Esempio di *P. lividus* adulto [foto Morroni]

La bocca e l'ano sono situati ai due poli opposti del corpo (Fig. 1). Si riconosce, infatti, una zona orale sempre rivolta verso il basso, poggiante sul substrato, al centro della quale è posta un'apertura detta peristoma. Questa è ricoperta da una membrana peristomale di piccole dimensioni, rivestita da piastre, al cui interno si trova la bocca, ben riconoscibile per la presenza di un sistema di ossicoli che costituiscono una struttura detta Lanterna di Aristotele (Fig. 1). La bocca si apre in un intestino lungo e semplice che sbocca in un ano. Sul lato opposto della zona orale si trova la zona aborale, costituita da un'area centrale tondeggiante (periprocto), coperta da molte piastre di piccole dimensioni in mezzo alle quali si apre l'ano. Attorno all'area centrale sono ben visibili, in posizione interradiale, 5 piastre genitali, dotate ognuna di un foro in cui sbocca una gonade e 5 piastre terminali, più piccole delle precedenti.

Sono presenti un sistema acquifero (derivato dal celoma e che appartiene unicamente agli echinodermi) e un sistema nervoso non centralizzato, entrambi composti da un anello posizionato intorno alla bocca da cui si sviluppano i canali radiali che diffondono nelle aree ambulacrali. Non esistono sistemi respiratori specializzati. Intorno alla bocca ci sono 5 paia di espansioni celomiche dette "branchie"; il sistema acquifero stesso svolge una importante funzione negli scambi respiratori, soprattutto grazie ai pedicelli che aumentano la superficie di scambio.

Le gonadi sono 5 e occupano le aree interambulacrali e sboccano nelle placche genitali (Fig. 1).

### 1.1.2 - Distribuzione e Habitat

*P. lividus* è un riccio relativamente grande con il diametro della teca (senza gli aculei) che può raggiungere i 7,5 cm (Bonnet, 1925; Boudouresque et al., 1989; Lozano et al., 1995). La distribuzione geografica della specie comprende la costa atlantica che va dall'Irlanda al Marocco, incluse le isole Canarie e Azzorre e le coste di tutto il Mar Mediterraneo (Hayward and Ryland, 1990; San Martín, 1995).

Vive generalmente nella zona infralitorale, prediligendo fondali rocciosi orizzontali o lievemente inclinati (Palacin et al., 1997), ma è presente anche su pareti verticali e substrati meno stabili, come le praterie di *Posidonia oceanica* e *Zostera marina*. La sua quasi totale assenza nelle praterie di *Cymodocea nodosa*, nonostante questa sia un elemento importante nella dieta del riccio, è probabilmente legata a due fattori: l'inadeguatezza per il riccio dal punto di vista deambulatorio dei fondali sabbiosi dove la *Cymodocea* è presente e l'elevata pressione esercitata dai predatori in questi ambienti (Traer, 1980). Sebbene sia rara la presenza di *P. lividus* su fondali sabbiosi, detritici e incoerenti in generale, è frequente osservare i ricci su questo tipo di fondali raggruppati su rocce isolate, grosse conchiglie o residui vari (Zavodnik, 1980). Individui che vivono in ambienti particolarmente esposti al moto ondoso hanno affinato la capacità di

scavare nel substrato (ad esempio arenaria, calcare, basalto, granito) creando delle vere e proprie tane a forma di coppa dove gli organismi vivono. Questo comportamento, oltre ad essere un valido adattamento per ripararsi dal moto ondoso, costituisce anche un meccanismo di protezione contro i predatori.

*P. lividus* può essere presente anche su substrati fangosi e su sabbia grossolana delle lagune litorali (Lagune di Thau e Urbinu nel Mediterraneo; Archachon Bay, Oceano Atlantico, Francia) [Allain, 1975; San Martín, 1987; Fernandez et al., 2003]; tuttavia in questi ambienti, così come nelle pozze di scogliera, le dimensioni degli individui sono di gran lunga inferiori rispetto a quelle degli organismi che vivono in mare aperto. Sebbene sia presente nelle lagune costiere del Mediterraneo e nei "rías" Atlantici, *P. lividus* è sensibile alle alte e basse salinità. Esposizioni per lunghi periodi a salinità inferiori a 15 - 20 ‰ o superiori a 39 - 40 ‰ determinano la morte dell'organismo [Pastor, 1971; Allain, 1975; Le Gall et al., 1989].

*P. lividus* è relativamente insensibile all'inquinamento organico, anzi in taluni contesti la presenza di tali composti ne favorisce la crescita [Tortonese, 1965; Allain, 1975; Zavodnik, 1987; Delmas, 1992]; ad esempio, dense popolazioni di ricci sono presenti nelle inquinate Baia di Brest (Bretagna), nella Laguna di Berre presso Marsiglia e vicino allo scarico dei reflui urbani a Rabat (Marocco). Per contro, esperimenti condotti in laboratorio hanno dimostrato la sensibilità di *P. lividus* all'ammoniaca [Lawrence et al., 2003], sebbene rispetto a concentrazioni riscontrabili solo in impianti di acquacoltura, piuttosto che in ambienti naturali. Inoltre, *P. lividus* è in grado di tollerare alte concentrazioni di metalli pesanti e persino accumularli, sebbene questi possano alterare il tasso di crescita degli organismi [Augier et al., 1989; Delmas, 1992; San Martín, 1995] e lo sviluppo embrio-larvale [Arizzi Novelli et al., 2003a].

Individui di piccole dimensioni (< 1 - 2 cm) particolarmente soggetti alla predazione vivono costantemente all'interno di buche, fessure nella roccia, sotto ciottoli e massi, tra la "matte" di *Posidonia oceanica* e, talvolta, sotto un fitto manto di organismi fotosintetici pluricellulari (MPOs) [Kempf, 1962; Gamble, 1965, 1966-1967; Kitching and Thain, 1983; Verlaque, 1984, 1987a; Azzolina and Willsie, 1987; Azzolina, 1988; San Martín, 1995].

La densità di *P. lividus* generalmente risulta compresa tra pochi e una dozzina di individui per m<sup>2</sup>; tuttavia densità molto elevate (> 50 - 100 individui per m<sup>2</sup>) si possono ritrovare in ambienti di acque poco profonde, su substrati rocciosi a bassa pendenza, in pozze intertidali [Kempf, 1962; Pastor, 1971; Crapp and Willis, 1975; Harmelin et al., 1981; Delmas and Régis, 1986; Delmas, 1992]. Densità con valori superiori a 1.600 individui per m<sup>2</sup>, fenomeno poco chiaro e ancora oggetto di studio, potrebbero rappresentare una strategia difensiva contro i predatori, un comportamento alimentare e/o una strategia riproduttiva [Mastaller, 1974; Keegan and Könnecker, 1980].

Nonostante sia stato rinvenuto fino ad una profondità di 80 m [Cherbonnier, 1956; Tortonese, 1965], *P. lividus* colonizza prevalentemente fondali superficiali con abbondanze decrescenti all'aumentare della profondità [Bulleri et al., 2002]; è particolarmente frequente in zone dove la temperatura delle acque in inverno varia tra 10 e 15 °C e in estate oscilla tra 18 e 25 °C. Il limite settentrionale e meridionale dell'areale di distribuzione è compreso tra l'isoterma degli 8 °C d'inverno e quella dei 28 °C d'estate. Nel Canale della Manica temperature inferiori a 4 °C e superiori a 29 °C risultano letali per *P. lividus* [Allain, 1975]; tuttavia, nelle lagune del Mediterraneo i ricci di mare possono sopravvivere a temperature superiori a 30 °C, fatto che suggerisce una certa diversità fisiologica tra popolazioni di ambienti diversi. Difficilmente però le rigide temperature invernali possono causare effetti letali per

questa specie. Le basse temperature non risultano un fattore limitante neanche per le sue larve (Mortensen 1943; Tortonese 1965; Le Gall et al. 1990; Fernandez and Caltagirone, 1994; Fernandez, 1996).

Nel Mediterraneo, un mare caratterizzato da basse escursioni di marea, quando nelle giornate di alta pressione il livello del mare scende rapidamente, gli individui di *P. lividus* rimasti "all'asciutto" muoiono velocemente (Gamble 1965; Tortonese 1965; Allain 1975; Régis 1978; Harmelin et al. 1980; Crook et al. 2000)

### 1.1.3 - Abitudini alimentari

La maggior parte delle conoscenze riguardo le preferenze alimentari di *P. lividus* sono state acquisite mediante studi condotti su organismi in acquario. Ulteriori informazioni riguardo la sua dieta derivano dallo studio dei contenuti stomacali e dall'analisi del suo habitat secondo l'indice di Ilev (Ilev, 1961).

Le analisi dei contenuti stomacali indicano che *P. lividus* è sostanzialmente un erbivoro (Mortensen, 1943; Kitching and Ebling, 1961; Kempf, 1962; Ebling et al., 1966; Neil and Larkum, 1966; Neill and Pastor, 1973; Verlaque and Nédélec, 1983b; Verlaque, 1987a, 1987b).

*P. lividus* è un grande consumatore della fanerogama *P. oceanica*, della quale utilizza tutte le parti (foglie vive con e senza epifiti, foglie morte, rizomi e radici). In particolare, nel Mediterraneo le foglie di *P. oceanica* possono arrivare a costituire fino al 40 % del contenuto stomacale di ricci ubicati anche a centinaia di metri di distanza dalle praterie di fanerogame (Verlaque and Nédélec, 1983b; Maggiore et al., 1987; Verlaque, 1987a).

Tra le specie algali preferite nella dieta possiamo menzionare *Rissoella verrucolosa* (*Rhodobionta*), *Cymodocea nodosa* (*Magnoliophyta*) *Cystoseira amentacea*, *Padina pavonica* e *Undaria pinnatifida* (alghe brune); mentre *Asparagopsis armata*, *Gelidium spinosum*, *Anadyomene stellata*, *Caulerpa prolifera*, *Caulerpa taxifolia* e *Flabellia petiolata* risultano specie poco gradite (Traer, 1980; Cuomo et al., 1982; Nédélec, 1982; Kitching and Thain, 1983; Verlaque and Nédélec, 1983a,b; Verlaque, 1984, 1987a,b; Zupi Frantzis et al., 1988; Odile et al., 1988; Fernandez, 1989; Rico, 1989; Boudouresque et al., 1993; Knopffler-Péguy and Nattero, 1996; Lemée et al., 1996; Aubin, 2004). Lo scarso gradimento di *P. lividus* per alcune specie algali è spesso legato alla presenza di metaboliti tossici o repellenti, come nel caso di *C. taxifolia*, che produce grosse quantità di terpeni (Guerriero et al., 1992; Lemée et al., 1996) o dell'alga rossa *Asparagopsis armata* in grado di sintetizzare composti brominati (Codomier et al., 1977). Tuttavia la presenza di questi metaboliti tossici non sempre giustifica la preferenza o meno del riccio verso alcune specie algali. Le alghe brune *Cystoseira compressa* e *Halopteris scoparia* pur contenendo rispettivamente il 23% e il 2% di polifenoli (in relazione al peso secco totale), vengono consumate da *P. lividus* in egual misura laddove entrambe presenti (Frantzis and Gremare, 1992). La presenza di pareti cellulari impregnate di carbonato di calcio è un ulteriore motivo di scarsa appetibilità per alcune alghe (*Litophilum incrustans* e *Amphiroa rigida*), sebbene *P. lividus* si nutra normalmente di alcune corallinacee articolate come *Jania rubens* (Boudouresque and Verlaque, 2007).

In generale, la scelta del cibo risulta fortemente condizionata dalla relativa abbondanza delle alghe presenti. La selettività in condizioni di abbondanza di cibo è molto alta, ma cala rapidamente all'aumentare del *grazing*, fino a scomparire quasi completamente quando il numero di individui e la pressione esercitata sulle comunità algali cresce rapidamente (Verlaque and Nédélec 1983a; Frantzis et al., 1988).

La scelta del cibo risulta tuttavia condizionata oltre che dalle dimensioni del cibo stesso e dalla facilità con la quale questo può essere manipolato, anche dal suo contenuto di

azoto: il consumo di foglie di *P. oceanica* si intensifica quando il loro contenuto di azoto aumenta, cosa che normalmente accade in ambienti inquinati (Ruiz-Fernandez, 2000). Sebbene nell'habitat naturale le alghe e le fanerogame siano gli elementi principali nella dieta, *P. lividus* sembrerebbe avere un comportamento alimentare generalista e opportunista che lo rende capace di sfruttare qualsiasi fonte di cibo, soprattutto in condizioni di limitata disponibilità alimentare, spostandosi da una fonte di cibo gradita ma scarsa verso un'altra poco gradita ma abbondante [*switching*]. Organismi unicellulari fotosintetici, spugne, idrozoi, copepodi ed altri invertebrati possono essere infatti rinvenuti nel contenuto stomacale dei ricci (Mortensen, 1943; Tortonese, 1965; Pastor, 1971; Neill and Pastor, 1973; Régis, 1978; Délmas and Régis, 1986; Fernandez, 1990; Mazzella et al., 1992).

Come per le alghe, anche per le spugne esistono specie più o meno sfruttate dai ricci come fonte di cibo: *Dysidea avara* e *Crambe crambe* sono consumate in modo regolare da *P. lividus* (Uriz et al., 1996).

*P. lividus* può nutrirsi anche di pesci morti trovati sul fondo (Harmelin et al., 1981), mentre in acquario i ricci possono essere alimentati con mitili (Powis de Tenbossche, 1978; Haya and Régis, 1995), alghe (Spirlet et al., 2001; Schlosser et al., 2005), pellet normalmente impiegati in ittiocoltura (Basuyaux and Blin, 1998; Fabbrocini and D'Adamo, 2010; Sartori, 2013), mais (Sartori and Gaion, 2015; Sartori et al., 2015, 2016a), e altri alimenti vegetali quali spinaci (Sartori and Gaion, 2015; Sartori et al., 2015, 2016a) e soia (McBride, 2005; Gibbs et al., 2013).

Seppur di rado possono verificarsi atti di cannibalismo, come testimoniato da residui di riccio rinvenuti nell'intestino di individui in popolazioni con elevata densità. In acquario lo stesso fenomeno può verificarsi a scapito di organismi di 2 - 3 cm di diametro ad opera di individui di dimensioni maggiori (Pastor, 1971).

*P. lividus*, sia nel suo habitat naturale che in acquario, tende a coprire la regione aborale con conchiglie, frammenti di alghe, piccoli sassi, pezzi di plastica (Kempf, 1962; Pastor, 1971; Martinell, 1981; Rico, 1989; Benedetti-Cecchi and Cinelli, 1995). Per Richner and Milinski (2000) il *covering behavior* serve a proteggere l'apertura apicale del sistema acquifero dall'occlusione causata dalla sabbia e da altre particelle in sospensione; inoltre questo comportamento, sembra rivestire un ruolo importante nell'alimentazione, permettendo ai ricci di prendere e trasportare sulla propria teca le alghe e le fanerogame di cui si nutre.

#### 1.1.4 - Riproduzione e sviluppo embrionale

In *P. lividus* i sessi sono separati, anche se non sono evidenti segni di dimorfismo sessuale (Gianguzza et al., 2009). L'ermafroditismo, seppur raro, è stato osservato fin dall'inizio del secolo scorso (Drzewina and Bohn, 1924; Neefs, 1937; Byrne, 1990). L'apparato riproduttore consiste in cinque gonadi (Fig. 3), contenute all'interno dei seni genitali e rivestite da peritoneo, unite da filamenti mesenterici alla superficie interna delle aree interambulacrali, che sboccano nelle placche genitali.

Le estensioni del celoma genitale e dei seni ematici interconnettono tutte le cinque gonadi. Questi seni si proiettano da componenti simili del complesso assiale sotto il madreporite. All'estremità aborale ciascuna gonade si assottiglia fino a dare origine a un corto gonodotto che sbocca all'esterno attraverso il gonoporo delle piastre genitali. Da ogni gonade sporge un singolo gonodotto che si estende dentro i filamenti del seno celomatico aborale, prima di uscire dal guscio attraverso una serie pentagonale di gonopori, situati lungo le piastre genitali che circondano l'ano.



Figura 3: Esempio di *P. lividus* sezionato con in evidenza le gonadi (foto Sartori)

In entrambi i sessi la struttura della parete gonadica è simile e composta da due sacche di tessuto (interna ed esterna), ognuna delle quali è formata da alcuni strati caratteristici (Fig. 4).

Per tutta la gonade il Seno Celomatico Genitale (GSC) separa la sacca esterna da quella interna (Fig. 4); la sacca esterna include un Peritoneo Viscerale (VP) che si affaccia su celoma periviscerale e che è attaccato a uno strato di Tessuto Connettivo (CTL). Anche cellule epiteliali non muscolari delineano il CTL sulla sua superficie opposta verso il GSC. La sacca interna è un seno ematico genitale (GHS), che porta cellule ciliate mioepiteliali sul suo lato esterno che si contraggono ritmicamente durante il rilascio dei gameti. Sulla faccia del lume, il GHS sostiene l'epitelio germinale. Le funzioni principali del sacco interno sono la gametogenesi, un accumulo molto limitato di nutrienti nel GHS e un ampio stoccaggio di nutrienti nei fagociti nutritivi (NP).

Durante il ciclo gonadico le gonadi di entrambi i sessi attraversano una serie di cambiamenti strutturali tra cui: l'accumulo di materiale di riserva (fase di crescita), l'effettivo periodo di emissione (fase di maturazione) e il riassorbimento dei gameti relitti (fase di spesa/rigenerazione). Ciò è ben documentato in *P. lividus* (Byrne et al., 1990; Lozano et al., 1995; Spirlet et al., 1998, Martinez et al., 2003) e anche in altre specie di riccio di mare come *Sthongylocentrotus droebachiensis* (Walker et al., 2005) e *Pseudocentrotus depressus* (Unuma et al., 2010). Questi cambiamenti sono classificati per l'attività di due principali popolazioni di cellule: cellule germinali e cellule somatiche chiamate fagociti nutritivi (NP) che sono presenti in entrambi i sessi (Holland and Holland, 1969; Kobayashi and Koanaka, 1971) e mostrano un trend inversamente proporzionale (Walker et al., 2005, 2013).

Numerosi autori hanno descritto per popolazioni del Mediterraneo nord-occidentale un unico periodo di emissione dei gameti, con durata differente anche tra località vicine (Lozano et al., 1995; Fernandez, 1998; Sánchez-España et al., 2004; Ouréns et al., 2011). Tuttavia il ciclo riproduttivo può essere influenzato da diversi fattori ambientali come la temperatura (Byrne et al., 1990; Lozano et al., 1995), il fotoperiodo (Byrne et al., 1990; Lozano et al., 1995; Shpigel et al., 2004), le condizioni idrodinamiche (Guettaf et al., 2000; Gianguzza et al., 2013), la disponibilità e la qualità del cibo (Regis, 1979; Lozano et al., 1995; Guettaf et al., 2000; Sánchez-España et al., 2004; Gianguzza et al., 2013), le fioriture di fitoplancton (Ouréns et al., 2011) ed è possibile che l'emissione interessi tutto l'anno (Guettaf et al., 2000).



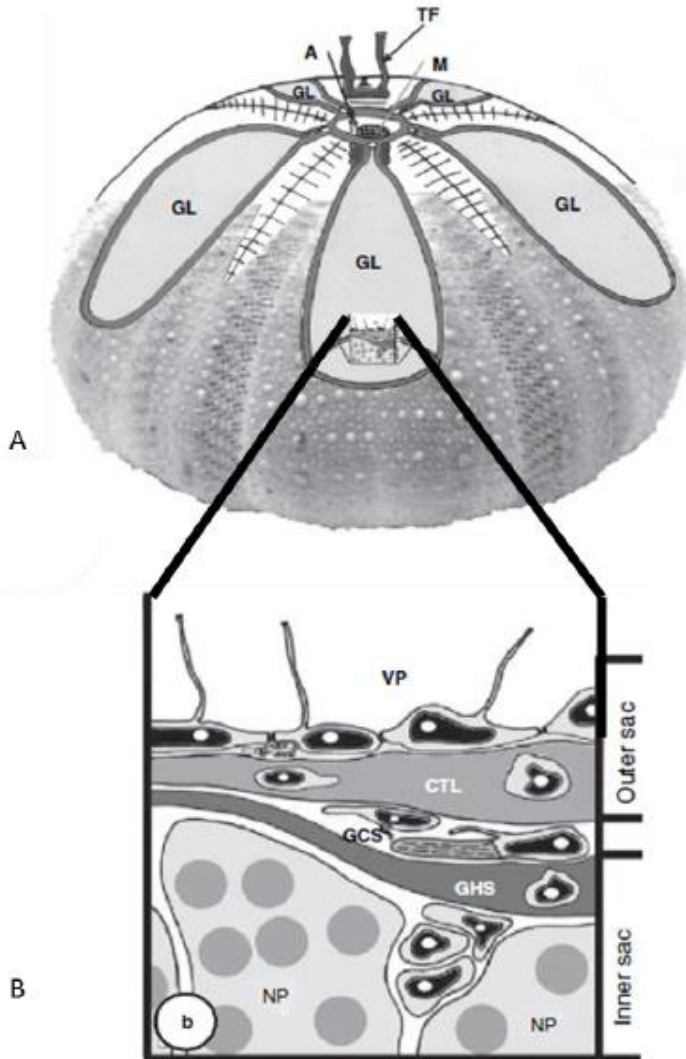


Figura 4: A) Rappresentazione schematica del sistema riproduttivo del riccio di mare dal lato aborale; B) rappresentazione schematica dei tessuti nella parete gonadica del riccio di mare. A - ano; CTL - strato di tessuto connettivo; GL - lumen gonadale; M - madreporite; NP - fagociti nutritivi; GSC - seno celomatico genitale; GHS - seno ematico genitale; TF - pedicelli ambulacrali; VP - peritoneo viscerale [Walker et al., 2007, modif.]

Lungo le coste italiane si assiste a un unico periodo di emissione che generalmente va da ottobre a giugno [Arizzi Novelli et al., 2002], con un massimo all'inizio della primavera, con temperature di circa 13,5 - 18 °C e un breve fotoperiodo, in accordo con altri studi [Byrne et al., 1990; Lozano et al., 1995; Spigel et al., 2004].

Durante la gametogenesi le gonadi femminili contengono uova mature isolecitiche, con un basso contenuto di tuorlo. Le uova completano la divisione meiotica nell'ovario e sono rilasciate nell'acqua di mare come cellule uovo mature aploidi e metabolicamente inerti (Spinelli and Albanese, 1990). Anche gli spermatozoi sono cellule inerti metabolicamente, ma di forma allungata, con una coda e una testa che occupa la maggior parte del volume cellulare e che contiene il vacuolo acrosomiale e alcuni enzimi e proteine.

Nel periodo in cui sono conservati nella gonade, gli spermatozoi sono immobili e non respirano a un tasso significativo, probabilmente a causa del basso pH del liquido seminale (Johnson et al., 1983).

Durante la stagione riproduttiva l'emissione dei gameti avviene per la contrazione ritmica della muscolatura (Okada et al., 1984; Okada and Iwata, 1985), in risposta alla porzione glucidica di glicoproteine prodotte dall'intestino e accumulate nei tessuti aborali ematici (Takahashi et al., 1990, 1991). I nervi interconnessi sincronizzano l'attività delle gonadi durante l'emissione dei gameti (Walker et al., 2005). I maschi emettono per primi e gli spermatozoi sono attivati al contatto con l'acqua di mare che determina un aumento del pH intracellulare. Le uova mature sono quindi rilasciate in una nuvola di spermatozoi che nuotano attivamente. L'attivazione delle uova coinvolge una serie di passaggi di trasduzione del segnale dopo il legame dello sperma a una proteina recettrice sulla superficie, alzando la membrana di fecondazione e dando origine a una risposta elettrica che impone un blocco veloce alla polispermia (Whitaker and Steinhardt, 1985; Giudice, 1986; Mah et al, 2005). La fecondazione è quindi esterna e lo sviluppo embrionale avviene nel plancton.

La segmentazione è oblastica a simmetria radiale. In particolare, le prime divisioni cellulari sono regolari (Fig. 5A-C), dal quarto stadio lo schema diventa più complesso e la divisione non è più sincrona. I blastomeri al polo animale si dividono in modo disuguale producendo grandi macromeri e piccoli micromeri localizzati al polo vegetale della cellula (Fig. 5D). Gli 8 mesomeri al polo animale formano 8 file di 8 cellule ciascuna, precursori dell'ectoderma. Gli 8 macromeri al polo vegetale vanno incontro prima a una divisione meridiana che produce uno strato di 8 cellule che successivamente si dividono equatorialmente formando due strati di 8 cellule ciascuno. I micromeri dopo 2 divisioni generano 8 cellule che restano quiescenti per un lungo periodo. Le ulteriori divisioni (Fig. 5E), sempre racchiuse dalla membrana di fecondazione, portano l'embrione allo stadio di morula (Fig. 5F).

Sei ore dopo la fecondazione l'embrione di riccio di mare entra nello stadio di blastula precoce con una cavità centrale vuota, detta blastocele. Le cellule iniziano a formare le ciglia sulla superficie esterna dell'embrione per formare una blastula natante (Fig. 5G). Circa 4-6 ore dopo la medio-blastula (formata da 600 cellule) si schiude dall'involucro di fecondazione. Al polo animale le ciglia sono più lunghe ma non battono (Fig. 5H). Questo ciuffo apicale fornisce la direzione al moto e gli embrioni si muovono quasi sempre con la regione del ciuffo apicale in avanti. In questo stadio il destino delle cellule è completamente definito, con l'espressione di geni territorio-specifici (Davidson et al., 1998).

Nella fase tardiva della blastula l'embrione si ispessisce al polo vegetativo formando la piastra vegetativa, dopodiché 32 cellule, che discendono dai micromeri e che sono situate al centro della regione della piastra vegetativa che sporge nella parte basale, entrano nel blastocele e iniziano a vagare con movimenti ameboidi.

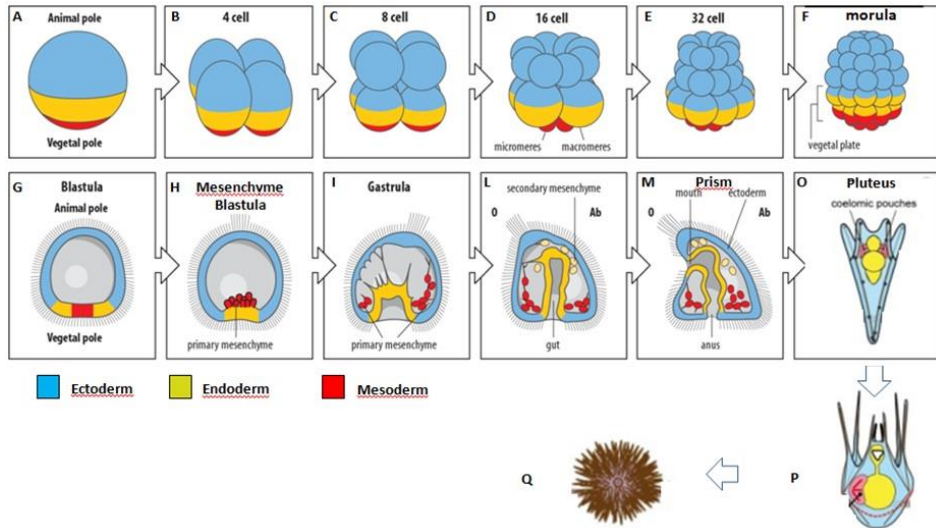


Figura 5: Fase iniziali dello sviluppo del riccio di mare *Paracentrotus lividus*. In ogni riquadro è rappresentato uno stadio di sviluppo. A) uovo; B) 4 cellule; C) 8 cellule; D) 16 cellule; E) 32 cellule; F) morula; G) blastula; H) blastula con mesenchima primario; I) gastrula precoce; L) gastrula tardiva; M) prisma; O) pluteo a 4 braccia; P) echinopluteo; Q) riccio di mare alla fine della metamorfosi

[[http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO\\_06/ch06f19.jpg](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_06/ch06f19.jpg), modif.]

Queste cellule si differenziano nelle cellule del mesenchima primario (PMC) dando origine allo stadio di blastula con mesenchima (Fig. 5H). Poco dopo si verifica la gastrulazione con la formazione dell'archenteron (Fig. 5I). Nel frattempo, le cellule vegetative continuano ad entrare per formare l'archenteron guidate da filopodia che si estendono dalle cellule del mesenchima secondario (SMC) (Fig. 5I-L). L'embrione inizia ad appiattirsi e l'area di contatto delle cellule del SMC nel polo animale inizia a invaginarsi formando la bocca (*stomodeum*), così viene raggiunto lo stadio di prisma (Fig. 5M). In seguito si differenzia la larva echinopluteo, o semplicemente pluteo. La regione circumorale dà origine a quattro espansioni lobate, le braccia, sostenute da spiccole scheletriche calcaree [pluteo a 4 braccia; Fig. 5O]. A questo stadio gli embrioni sono diventati larve che iniziano a cibarsi e che sono dotate di uno scheletro pienamente differenziato, di un apparato digerente, di cellule contrattili e nervose. I plutei (Fig. 5P) possono nuotare ruotando su se stessi grazie ai battiti delle ciglia, collocate sia sulle braccia sia nella regione circumorale, coordinate da una specie di sistema nervoso (Garner et al., 2016). La larva, che si completa in due giorni dalla fecondazione, possiede una simmetria bilaterale che evolverà, al momento della metamorfosi, verso una simmetria pentaradiale.

La durata della vita planctonica della larva di *P. lividus* è stata stimata *in situ* di 23 - 29 giorni (Lozano et al., 1995); dopo questo periodo gli embrioni fissati al substrato vanno incontro alla metamorfosi che genera l'adulto del riccio di mare (Fig. 5Q). Nel Mar Mediterraneo, sebbene l'emissione sia continua da ottobre a maggio gli insediamenti bentonici avvengono di solito nella tarda primavera (maggio - giugno), a quanto sembra indipendentemente dalle caratteristiche del substrato (Lozano et al., 1995; Hereu et al., 2004; Tomas et al., 2004).

## 1.2 – Utilizzo dei gameti in ecotossicologia

Nonostante gli adulti di *P. lividus* siano relativamente poco sensibili all'inquinamento organico (Tortonese, 1965; Allain, 1975; Zavodnik, 1987; Delmas, 1992) e ai metalli in traccia (Augier et al., 1989; Delmas, 1992; San Martín, 1995), lo stesso non si può dire per i gameti. Confrontati con altre specie, i gameti di *P. lividus* sono risultati sensibili alla maggior parte degli inquinanti ambientali, come i composti organici, i metalli in traccia e gli organometallici (Arizzi Novelli et al., 2002, 2003a; Beiras et al., 2003b; Bellas et al., 2005; Manzo et al., 2014), dimostrando la loro capacità potenziale di rispondere alla presenza di importanti contaminanti negli ecosistemi costieri e lagunari.

Difatti, oltre ad essere molto utilizzati in campo fisiologico, biochimico e embriogenetico, i gameti di questa specie hanno trovato ampia applicazione anche in campo tossicologico ed ecotossicologico.

In particolare, vengono impiegati nella valutazione degli effetti sulla fecondazione e sullo sviluppo embrionale in seguito all'esposizione a sostanze pure, stimando una curva dose - risposta (Pagano et al., 1988; Bressan et al., 1991; Pieroni e Falugi, 1992; Graillet et al., 1993; Arizzi Novelli et al., 2002, 2003a,b; Russo et al., 2003; Losso et al., 2004; Angelini et al., 2005, Schröder et al., 2005). I test, che in questo caso sarebbe meglio definire "saggi biologici", vengono inoltre condotti esponendo il materiale biologico a matrici ambientali contenenti quantità non note di inquinanti, spesso presenti in miscele complesse, al fine di rilevare possibili effetti ecotossici. In questo contesto il saggio con *P. lividus* è largamente impiegato per la valutazione di acque e sedimenti marini (Pagano et al., 1993, 2001; Pinto et al., 1995; Volpi Ghirardini et al., 1999, 2003, 2005a,b; Giuliani et al., 2002), come ben documentato nelle review di Pagano et al. (2017).

I test di fecondazione e di sviluppo embrionale con echinodermi sono inoltre inclusi nella lista dei saggi biologici più attendibili per il monitoraggio dell'inquinamento marino redatta dall'International Council for the Exploitation of the Sea (ICES, 1997). Essi appartengono ai pochi "short chronic tests" per acque marine ed estuarine per i quali l'USEPA abbia prodotto dei Protocolli standardizzati (USEPA, 1994) e sono da tempo utilizzati nei programmi di monitoraggio ambientale (Kobayashi and Konaka, 1971; Dinnel et al., 1988; Pagano et al., 1988; Kobayashi 1991; His et al., 1999; Beiras et al., 2003a; Kobayashi and Okamura, 2004; Volpi Ghirardini et al., 2005a; Cesar et al., 2009; Khosrovyan et al., 2013; Picone et al., 2016).

I gameti di *P. lividus* presentano numerosi vantaggi per l'utilizzo in campo ecotossicologico, tra i quali:

- ✓ biologia dello sviluppo ed ecologia ben conosciuti;
- ✓ appartenenza dell'organismo a un livello avanzato della scala evolutiva degli invertebrati (Arizzi Novelli et al., 2001);
- ✓ facilità di mantenimento in laboratorio e di raccolta dei gameti da utilizzare nei test;
- ✓ elevata sensibilità, facilità e velocità di esecuzione del test;
- ✓ possibilità di analizzare, tramite diversi end-points, la tossicità di sostanze pure e di matrici ambientali quali acque e sedimenti (Pagano et al., 1993; Pinto et al., 1995; Giuliani et al., 2002);
- ✓ disponibilità di numerosi protocolli internazionali standardizzati quali Environment Canada (1991, 1992), EPA (USEPA, 1994) e ASTM (1995).

Normalmente il saggio viene condotto in condizioni controllate di laboratorio, ma alcuni autori hanno provato a eseguire il saggio anche *in situ* (Beiras et al., 2001; Salamanca et al., 2009; Morroni, 2011). Le condizioni di campo, infatti, possono fornire uno

scenario di esposizione più realistico rispetto alle condizioni di laboratorio, integrando le principali variabili ambientali naturali (Allain et al., 2006; Crane et al., 2007; Wharfe et al., 2007). Per tale approccio sono in corso approfondimenti di carattere sperimentale per la messa a punto di specifici protocolli (Morrone et al., 2018a).

### **1.3 - Campionamento e stabulazione degli organismi**

La zona costiera per il campionamento degli animali deve essere scelta accuratamente, lontana da contaminazioni antropiche.

Nel Mediterraneo le condizioni ambientali ottimali per il campionamento si riscontrano dalla stagione autunnale all'inizio di quella primaverile, durante la quale le popolazioni naturali di *P. lividus* sono sessualmente mature (Byrne, 1990; Giambartolomei, 1990). Tuttavia, l'esperienza di raccolta degli organismi in ambito nazionale evidenzia la possibilità di trovare individui maturi fin quasi all'inizio dell'estate, in relazione alle temperature dell'acqua.

Al di là del periodo di maturità, durante o subito dopo le mareggiate gli individui possono risultare stressati ed aver già emesso i gameti in mare; inoltre non è infrequente che l'emissione avvenga durante il trasporto o al momento del trasferimento in acquario.

Gli animali devono essere trasportati avvolti in carta assorbente bagnata con acqua di mare e posti in contenitori isolati termicamente al fine di mantenere la temperatura di campo, evitando aumenti repentini che potrebbero indurre un'emissione indesiderata dei gameti.

Gli animali devono essere stabulati in acquari di vetro provvisti di sistema di aerazione, filtrazione e refrigerazione. La temperatura dell'acqua delle vasche di stabulazione in questa prima fase deve essere mantenuta uguale a quella presente nel sito di prelievo al fine di evitare shock termici. Per il successo della stabulazione è consigliato un numero limite di 20 animali per 100 litri e il mantenimento di un fotoperiodo mediante lampade a neon o a LED (Par. 1.3.1).

Per i primi cinque giorni è preferibile mantenere gli organismi a temperatura costante privi di alimentazione (Fernandez and Pergent, 1998) e con un fotoperiodo naturale (ad es. 8 h L:16 h D). Giornalmente devono essere rimossi i pellet fecali presenti sul fondo di ogni vasca attraverso sifonatura e gli eventuali organismi morti (con la relativa registrazione). Ogni 24 h devono essere monitorati la temperatura, la salinità (35 - 38 ‰), il pH (7,8 - 8,2), l'ossigeno disciolto (alla saturazione), l'ammoniaca e i nitrati (che devono risultare assenti).

#### *1.3.1 - Mantenimento in stand-by della maturazione sessuale degli organismi adulti di *Paracentrotus lividus**

Una volta acclimatati per 5 giorni alla temperatura del sito di prelievo e in assenza di alimentazione, gli organismi devono essere alimentati per le successive due settimane con alghe prelevate dal luogo di campionamento, variando la temperatura dell'acqua di 1 °C ogni 5 giorni fino al raggiungimento delle condizioni idonee di allevamento (14 °C), e aumentando giornalmente il fotoperiodo di circa 10 minuti, fino al raggiungimento di un fotoperiodo di 10 h L:14 h D (Sartori et al., 2015). Una volta terminata questa prima fase di condizionamento, gli organismi possono essere allevati con una dieta idonea al mantenimento della maturità sessuale.

#### *1.3.2 - Diete per il mantenimento della maturità sessuale*

Per il mantenimento della maturità sessuale delle gonadi può essere impiegata una dieta composta per il 50 % da mais, alimento ricco di carotenoidi (per un approfondimento sull'argomento si veda il BOX 1), ridotto in granelli di pochi millimetri e per il restante 50 % da alghe prelevate dal sito di campionamento degli organismi.

La composizione delle alghe, in quantità variabili a seconda della disponibilità e del periodo di campionamento, può comprendere le seguenti specie:

- ✓ *Dyctiopteris sp.*
- ✓ *Padina pavonica*
- ✓ *Dyctiota sp.*
- ✓ *Ulva lattuga*
- ✓ *Halopteris scoparia*
- ✓ *Flabellia petiolata*
- ✓ *Laurencia sp.*
- ✓ *Corallina elongata*
- ✓ *Codium sp.*

La dieta deve essere somministrata due volte a settimana in quantitativi tali da non fare mai mancare il cibo. Prima della somministrazione della dieta da ogni vasca devono essere rimossi, oltre ai pellet fecali, le alghe e il mais non consumati nei giorni precedenti, avendo cura di rimuovere dalla superficie aborale dei ricci i frammenti di mais e alghe senza danneggiare gli organismi (Sartori, 2013; Sartori and Gaion, 2015; Sartori et al., 2015, 2016a).

Una valida alternativa alla somministrazione delle alghe prelevate *in situ* è la sostituzione con foglie di spinaci freschi sminuzzate (Sartori and Gaion, 2015; Sartori et al., 2015, 2016a).

#### **BOX 1 – I carotenoidi nella dieta dei ricci di mare**

Nel caso di *P. lividus*, un alimento base da impiegare nell'allevamento in vasca, che permetta di coniugare un buon apporto energetico oltre a specifici vantaggi nutrizionali, è il mais sia per il suo alto valore nutrizionale, determinato dall'elevato contenuto di carboidrati e al discreto apporto proteico, sia per la massiccia presenza di carotenoidi sotto forma di zeaxantina (Tsushima et al., 1997; Kawakami et al., 1998).

Come per il mais, anche gli spinaci (*Spinacia oleracea* L.) sono da sempre considerati un alimento con un elevato valore nutrizionale e rappresentano una ricca fonte di carotenoidi (giallo, arancione o rosso), seppur mascherati dalla presenza di clorofilla verde, oltre ad essere ricchi di antiossidanti e polifenoli (Bunea et al., 2008; Lester et al., 2010) in grado di proteggere i tessuti dallo stress ossidativo (Golden et al., 2002; Lizarazo et al., 2010).

I carotenoidi sono una gamma di composti ampiamente distribuiti in natura, generalmente di colore rosso, arancione o giallo (Goodwin, 1980; Goodwin, 1984; Matsuno e Hirao, 1989) e possono essere suddivisi in due grandi gruppi, i caroteni e le xantofille. Si presentano non solo come forme libere, ma anche come esteri, glicosidi, solfati e caroteno-proteine.

I carotenoidi sono presenti ubiquitariamente nelle piante, nelle alghe e in numerosi microrganismi.

In generale gli animali non sintetizzano carotenoidi *ex novo* ma li assimilano mediante la dieta o li ottengono a partire da altri precursori tramite reazioni metaboliche.

Il  $\beta$ -echinenone (4-oxo- $\beta,\beta$ -carotenoide), insieme all' $\alpha$ -echinenone, è il principale carotenoide presente nelle gonadi di molti ricci di mare edibili (Griffiths and Perrott, 1976; Matsuno and Tsushima, 2001). Esso è sintetizzato a partire dal  $\beta$ -carotene assunto mediante la dieta (Griffiths and Perrott, 1976; Matsuno and Tsushima, 2001) ed è trasferito e immagazzinato nelle gonadi, dove gioca un ruolo fondamentale nella riproduzione (durante la produzione e sviluppo degli oociti) e nella risposta immunitaria dei ricci di mare (Matsuno, 1991; Bendich, 1994; Krinsky, 1994; Tsushima et al., 1997).

In *Strongylocentrotus droebachiensis* l'assunzione di  $\beta$ -carotene determina un incremento della crescita gonadica, del tasso di sviluppo larvale e un miglioramento della qualità delle uova (de Jong-Westman et al., 1995a,b), testimoniando come queste sostanze, in particolare  $\beta$ -carotene e  $\beta$ -echinenone, esercitino un'influenza positiva significativa sulla produzione di uova e sullo sviluppo larvale dei ricci di mare.

In *Pseudocentrotus depressus* la fucoxantina assunta mediante dieta non si accumula nella gonade, ma influisce positivamente sulla qualità delle uova e sul successo dello sviluppo larvale (Kawakami et al., 1998). Per George et al. (2001) la presenza di luteina e zeaxantina nella dieta di individui adulti di *Lytechinus variegatus* determina una qualità delle uova superiore a confronto di individui la cui dieta risulta ricca di  $\beta$ -carotene. In ultima analisi una dieta ricca di xantofille come fucoxantina, luteina e zeaxantina sono determinanti per garantire la produzione in echinocultura di larve con un elevato tasso di sopravvivenza.

Inoltre, i carotenoidi aiutano i processi di fotoprotezione nella difesa contro i radicali liberi (Cao et al., 1997) e gli effetti dannosi delle radiazioni UV (Lamare and Hoffman, 2004), oltre a ciò svolgono un importante ruolo nella modulazione della risposta immunitaria (Matsuno, 1991; Bendich, 1994; Krinsky, 1994; Kawakami et al., 1998).

Il ruolo essenziale di questa classe di composti è confermato dalle evidenze riscontrate in esemplari di *P. depressus* alimentati con una dieta povera di carotenoidi, dove la perdita di spine frequentemente osservata e la presenza di gonadi poco sviluppate risulta legata ad un calo delle difese immunitarie (Kawakami et al., 1998), sebbene ad oggi non esistano rilevanzze degli effetti dei carotenoidi nelle risposte immunitarie di altri invertebrati.

## 2. MATRICI AMBIENTALI E SOSTANZE DA TESTARE

---

Le più comuni tipologie di campioni da testare con il saggio biologico di fecondazione e con il saggio di sviluppo embrionale sono generalmente le seguenti:

- ✓ campioni liquidi di ambienti marini o salmastri (acqua della colonna ed effluenti di scarico);
- ✓ campioni liquidi derivati da sedimenti di ambienti marini o salmastri (acqua interstiziale ed elutriati);
- ✓ soluzioni acquose di sostanze chimiche, preparati solubili, preparati che possono essere mantenuti in sospensione o dispersione stabile nelle condizioni di prova.

L'elutriato è la matrice acquosa nella quale è presente la porzione solubile delle sostanze estraibili dal sedimento (ASTM, 1994) e che meglio simula gli effetti legati alle movimentazioni dei fondali e ai dragaggi (USEPA/USACE, 1991; Onorati and Volpi Ghirardini, 2001), attività recentemente normate in Italia nell'ambito dell'Allegato Tecnico al DM 173/2016.

Salvo specifiche indicazioni del metodo adottato, l'elutriato (come l'acqua interstiziale) deve essere preparato entro 10 giorni dal sedimento tal quale conservato a 4° C al buio e, se non saggiato entro le 24 h dalla preparazione, conservato a -20 °C fino al momento dell'analisi.

In letteratura sono presenti differenti metodologie per la preparazione dell'elutriato (USEPA/USACE, 1991; USEPA, 2001) in funzione della natura degli ambienti (Volpi Ghirardini et al., 2005b; Arizzi Novelli et al., 2006, 2007a) e della finalità dell'impiego (USACE, 2003; Allegato Tecnico al DM 173/2016).

Nel presente Quaderno per la preparazione dell'elutriato si fa riferimento al protocollo standard USEPA (2001), combinando quattro volumi di acqua di mare filtrata (o acqua marina artificiale) con una parte in peso di sedimento (peso secco). La sospensione così ottenuta viene posta in agitazione per 1 h a 400 giri/min; la fase liquida viene quindi raccolta e centrifugata a 4 °C per 20 min a 1200 x g. Subcampioni di surnatante possono essere immediatamente impiegati nell'allestimento del saggio e/o congelati e utilizzati in un secondo momento. Il congelamento infatti non altera in modo significativo le caratteristiche dei nutrienti (NO<sub>3</sub> e PO<sub>4</sub>) della fase liquida (Clementson and Wayte, 1992) e uno studio condotto da Carr e Chapman (1995) ha permesso di verificare l'assenza di differenze significative tra la tossicità di campioni di matrici acquose appena estratte o congelate.

Ulteriori matrici ambientali che possono essere considerate in particolari condizioni sono l'acqua sovrantante e gli estratti con solventi. Mentre l'acqua sovrantante può dare informazioni utili circa gli effetti su tutti gli organismi non bentonici, gli estratti con solventi sono meno rilevanti ecologicamente, in quanto conducono spesso ad una sovrastima dei possibili effetti tossici *in situ* (McCready et al., 2004); tuttavia l'uso di determinati solventi organici consente di ottenere specifiche informazioni sulle potenzialità tossiche di particolari composti difficilmente solubili o insolubili in acqua. In questo caso, il solvente impiegato per caratteristiche e concentrazione deve avere una tossicità "tollerabile" per la specie-target da utilizzare nei test.



## 3. SOLUZIONI, STRUMENTAZIONE E MATERIALI

---

### 3.1 - Acqua

#### 3.1.1 - Acqua di mare naturale e artificiale

Per la preparazione dei controlli negativi, dei controlli positivi, delle soluzioni della sostanza da sottoporre alla prova e per la raccolta e/o diluizione dei gameti, è possibile utilizzare acqua di mare naturale o artificiale purchè vengano garantiti effetti misurati non superiori al 20 % nel controllo negativo (Par. 4.8).

Generalmente è preferibile utilizzare acqua di mare naturale prelevata da un'area lontana da impatti antropici e filtrarla a 0,45 µm (FSW) (Buono et al., 2012; Morroni et al., 2018b; Sartori et al., 2016b). In alternativa può essere utilizzata acqua marina artificiale, ad esempio preparata secondo la ricetta ASTM (1998) o con altri sali commerciali, verificando con attenzione la risposta dei controlli.

#### 3.1.2 - Acqua dolce

Per la determinazione della densità spermatica, lo sperma raccolto viene diluito in acqua dolce, che provoca la perdita della motilità dei gameti.

L'acqua impiegata per la preparazione della soluzione madre della sostanza tossica di riferimento (controllo positivo) deve essere acqua deionizzata.

### 3.2 - Soluzioni

I reagenti elencati di seguito e utilizzati per la preparazione delle soluzioni di prova e di controllo devono essere di grado analitico:

- ✓ soluzione di KCl 0,5 M;
- ✓ soluzione madre standard (1000 mg/L) di rame in acido nitrico 0,5 M/L come tossico di riferimento;
- ✓ soluzione di formaldeide 37 – 40 % tamponata in metanolo al 10 % o in tetraborato di sodio e filtrata con carta da filtro o altro fissativo (BOX 5).

Una delle sostanze tossiche di riferimento più utilizzate come controllo positivo è il nitrato di rame  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (BOX 8). L'uso di una sostanza tossica di riferimento è necessario per valutare in condizioni standard il potere fecondante dello sperma (nel saggio di fecondazione lo sperma viene esposto al tossico prima di far avvenire la fecondazione) e gli effetti (anomalie dello sviluppo) sul normale sviluppo della larva. Ciò permette inoltre di ottenere informazioni sulla precisione del metodo e sulla riproducibilità intralaboratorio, attraverso il confronto con apposite carte di controllo per garantire che venga stimato correttamente l'effetto misurato nel saggio (Box 3).

### 3.3 - Strumentazione

In aggiunta alle usuali apparecchiature da laboratorio sono necessari:

- ✓ acquari dotati di un appropriato sistema di filtraggio ed areazione per l'acclimatazione degli organismi;
- ✓ ambiente termostato a  $18 \pm 1$  °C;
- ✓ pompa a vuoto per la filtrazione dell'acqua;
- ✓ strumento per la determinazione della salinità;
- ✓ termometro;
- ✓ pH-metro;
- ✓ ossimetro;
- ✓ microscopio ottico per il controllo e la conta dei gameti e per la lettura dei campioni (obiettivi 4x, 10x e 40x);
- ✓ emocitometro per il conteggio dello sperma (ad esempio Neubauer, Thoma, Fuchs-Rosenthal o Bürker);
- ✓ conta-cellule;
- ✓ micropipette automatiche e/o manuali graduate da 0,010 ml a 10,00 ml;
- ✓ micropipetta per liquidi viscosi, dotata di puntali del tipo *capillary pistons*.

### 3.4 - Materiali

- ✓ contenitori per il trasporto degli organismi;
- ✓ vassoi/vaschette per usi generali di laboratorio;
- ✓ carta bibula;
- ✓ vetrini da orologio o piastre Petri;
- ✓ piastre sterili per coltura in polistirene a sei pozzetti con coperchio;
- ✓ pipette Pasteur in plastica da 2 ml;
- ✓ pipette Pasteur in vetro 7 x 230 mm;
- ✓ beakers in vetro borosilicato da 50, 100 e 1000 ml;
- ✓ vetrini portaoggetto;
- ✓ tubi da centrifuga da 1,5 ml (tipo Eppendorf®);
- ✓ tubi da centrifuga da 50 ml (tipo Falcon®);
- ✓ siringhe da insulina da 1 ml;
- ✓ spatola;
- ✓ filtro in nitrocellulosa con porosità di 0,45  $\mu\text{m}$ , oppure sistema di filtrazione a bicchiere monouso con filtro da 0,45  $\mu\text{m}$  per il filtraggio dell'acqua di mare;
- ✓ filtri in nylon con porosità da 85 e 100  $\mu\text{m}$ ;
- ✓ Parafilm®.

## 4. PROTOCOLLO METODOLOGICO

---

### 4.1 - Allestimento dei test di fecondazione e di sviluppo embrionale

Durante l'esecuzione dei test, la temperatura di ogni soluzione acquosa deve essere mantenuta a  $18 \pm 1$  °C.

Per l'esecuzione dei test devono essere allestite almeno 3 repliche per ognuno dei seguenti campioni:

- ✓ il controllo negativo;
- ✓ il controllo positivo, rappresentato da concentrazioni crescenti della sostanza tossica di riferimento;
- ✓ la matrice ambientale o altre soluzioni da testare.

Nel caso della matrice ambientale, l'allestimento minimale del saggio biologico finalizzato al calcolo di una Concentrazione di Effetto (EC) prevede 3 diluizioni del campione (ad esempio 100 %, 50 % e 25 %); nel caso di un test di tossicità su sostanze pure o specifici prodotti la prova dovrà essere organizzata con una scansione di diluizioni presumibilmente superiore, in funzione degli esiti di una prova preliminare.

Se la prova è effettuata con una adeguata scansione di diluizioni, qualora il campione sia sufficientemente tossico, possono essere calcolate la EC50 e, se richiesto, altre ECx. Allorché debbano essere individuati valori di NOEC (No Observed Effect Concentration) e LOEC (Lowest Observed Effect Concentration), ovvero rispettivamente la più alta concentrazione in corrispondenza della quale non sono misurabili effetti e la più bassa concentrazione alla quale sono osservati effetti, occorre procedere con diluizioni ulteriori, in modo da poter misurare il reale effetto-non effetto in corrispondenza di tali concentrazioni.

Se i risultati ottenuti vengono invece elaborati mediante l'applicazione dei criteri ponderati ed integrati con quelli di altri saggi ecotossicologici per la stima del pericolo complessivo della batteria, ciascun campione può essere analizzato ad un'unica diluizione con un minimo di 3 repliche (Box 2).

#### ***BOX 2 - Indicazioni per l'applicazione del saggio di sviluppo nei criteri di integrazione ponderata***

Qualora vengano utilizzati criteri di integrazione ponderata nel calcolo del pericolo ecotossicologico di una batteria (Benedetti et al., 2011; Piva et al., 2011), la prova per ciascun saggio può essere effettuata con una sola diluizione (su almeno 3 repliche) del campione. Ciò risulta particolarmente vantaggioso in casi di elevata numerosità campionaria, in quanto consente una notevole semplificazione logistica nell'allestimento simultaneo di saggi per l'analisi di più campioni.

Inoltre, in riferimento all'applicazione dei medesimi criteri di integrazione ponderata, quali quelli utilizzati nel software Sediquale 109.0<sup>®</sup> indicato nell'Allegato Tecnico al DM 173/16, riguardo la matrice elutriato, si suggerisce di effettuare il saggio di sviluppo embrionale utilizzando una diluizione pari al 50 % rispetto all'elutriato tal quale. Tale indicazione deriva da evidenze sperimentali che indicano come l'elutriato "tal quale", nelle condizioni di preparazione convenzionalmente accettate in questo contesto [1:4 peso/volume], non sia la "diluizione" più rappresentativa per la valutazione della effettiva tossicità mediante questo saggio. Infatti, lo sviluppo embrionale risulta spesso sensibile agli elutriati non diluiti anche in assenza di sostanze tossiche e come effetto di altri "fattori di confusione", non sempre efficacemente misurabili; in questo senso, la diluizione dell'elutriato al 50 % consente di discriminare

meglio gli effetti di campioni molto tossici e poco tossici, garantendo anche una maggiore confrontabilità dei risultati di embriotossicità ottenuti con altre specie. La sperimentazione su larga scala e l'applicazione nei diversi contesti territoriali, costituisce comunque il presupposto per aggiornamenti periodici del presente Quaderno, incluse le indicazioni operative sopra riportate.

#### 4.2 - Prova con il tossico di riferimento (controllo positivo)

La prova del controllo positivo prevede la preparazione delle soluzioni di ciascuna sostanza tossica di riferimento secondo un'appropriata scansione delle concentrazioni, diluendo con acqua di mare (naturale o artificiale) volumi idonei di una soluzione madre concentrata.

Nel caso del nitrato di rame ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) le concentrazioni comunemente utilizzate ed idonee alla individuazione di un EC50 sia per il saggio di fecondazione che per quello di sviluppo embrionale sono: 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96  $\mu\text{g}/\text{L}$  (Arizzi Novelli et al., 2007b).

Alla prova occorre aggiungere il controllo negativo in acqua di mare filtrata a 0,45  $\mu\text{m}$  (FSW), corrispondente alla concentrazione 0  $\mu\text{g}/\text{L}$ .

#### BOX 3 - Costruzione ed uso delle carte di controllo

La carta di controllo costituisce un metodo grafico per valutare l'affidabilità delle condizioni in cui è stato eseguito un saggio ecotossicologico, in quanto prevede la registrazione cronologica e grafica dei valori ottenuti e quelli della sua variabilità. Le carte di controllo rappresentano uno strumento immediato, di facile attuazione, statisticamente rigoroso e universalmente riconosciuto, poiché si basano sulle norme internazionali della serie UNI ISO 7870 [2014a-e]. In ecotossicologia le carte di controllo permettono di verificare se la risposta di un modello biologico in un saggio di tossicità è confrontabile con quella normalmente riscontrata nei saggi dello stesso tipo effettuati in precedenza nello stesso laboratorio di prova con lo stesso protocollo metodologico.

All'interno di una procedura analitica sono presenti due tipi di variabilità:

1) la **variabilità naturale o accidentale** che indica l'effetto cumulato di un gran numero di piccole cause inevitabili ed incontrollabili;

2) la **variabilità sistematica** che indica distorsioni nella procedura che possono essere dovute a macchine non regolari, materie prime difettose, errori degli operatori, ecc.

L'obiettivo è quello di individuare la presenza di variabilità sistematica, poiché la variabilità naturale è impossibile da eliminare e non influenza particolarmente il risultato; se, infatti, all'interno di una procedura analitica è presente solo una variabilità naturale, la si definisce in controllo, mentre in presenza di variabilità sistematica il saggio è da considerarsi fuori controllo.

Graficamente la carta di controllo presenta una linea centrale (**Central Line - CL**) che rappresenta il valore attorno al quale le misurazioni dovrebbero trovarsi se nel processo fosse presente solo una variabilità naturale (Fig. 6).

Oltre alla linea centrale nella carta sono presenti due limiti (Fig. 6), uno inferiore (**Lower Control Limit - LCL**) ed uno superiore (**Upper Control Limit - UCL**) che sono determinati tramite procedure statistiche.

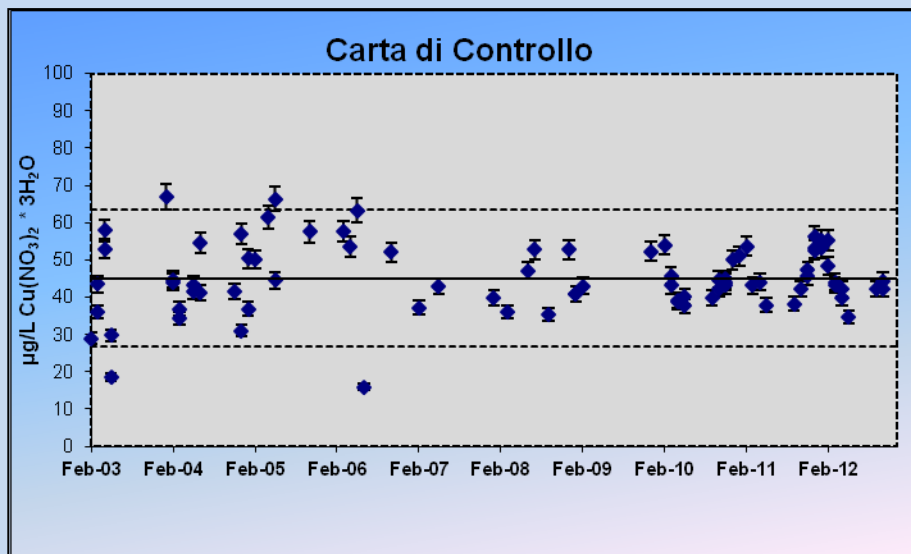
Tipicamente una carta di controllo stabilisce dei limiti che si collocano a  $\pm 3$  scarti quadratici medi dalla misura statistica di interesse (media, proporzione, range, ecc.) (UNI ISO, 2014a). Quindi in generale per costruire una carta possiamo seguire la seguente semplice regola (indicando con *W* una statistica campionaria generica):

$CL = E[W]$ ;

$UCL = E[W] + 3 [\text{Var}[W]]^{1/2}$ ;

$LCL = E[W] - 3 [\text{Var}[W]]^{1/2}$ .

Una volta definiti i limiti di controllo, plottando i dati all'interno del grafico, la carta ci consente di individuare eventuali andamenti sistematici (*pattern*) dei valori che i processi ottengono nel tempo e di stabilire se ciascun punto cade all'interno o all'esterno dei limiti.



*Figura 6: Esempio di rappresentazione grafica della carta di controllo per il saggio di fecondazione con *Paracentrotus lividus* del laboratorio ISPRA di Livorno*

Se nell'esecuzione del saggio è presente una variabilità sistematica, e quindi qualcosa che determina errori nella produzione nei risultati, uno o più punti verranno plottati all'esterno dell'area delimitata dai limiti di controllo.

Questo segnale permetterà di scoprire un errore e rimuoverlo velocemente dalla valutazione dei risultati.

Il sistematico uso delle carte di controllo offre dunque un potente strumento statistico per verificare che le prestazioni del laboratorio di prova siano consistentemente accettabili.

Per i saggi ecotossicologici è necessario realizzare le opportune carte di controllo tanto per i controlli negativi che per i controlli positivi. Quelle per i controlli negativi consentono di verificare il rispetto dei criteri di validità spesso indicati dal metodo [ad esempio, densità minima da raggiungere al termine del saggio algale, sopravvivenza minima nel controllo negativo in un saggio di tossicità letale, oppure percentuale minima accettabile di uova fecondate/embrioni normali]. Le carte relative ai controlli positivi permettono di accertare che venga stimato correttamente l'effetto valutato dal saggio [ad esempio, la EC<sub>x</sub> o la percentuale di effetto osservata per una determinata concentrazione di un tossico di riferimento].

Per un approfondimento sull'argomento si rimanda al paragrafo 4.4. del Manuale di Ecotossicologia ISPRA 121/2015.

### 4.3 - Raccolta dei gameti

Il recupero degli animali dagli acquari deve avvenire con molta cautela, evitando di danneggiare i pedicelli ambulacrali. Una volta recuperati, gli organismi devono essere posti in un ampio contenitore rivestito con carta bibula bagnata con acqua di mare, per evitare che gli animali si attacchino al recipiente.

E' consigliabile individuare almeno 6 esemplari, 3 maschi e 3 femmine, e l'impiego di due operatori distinti per la raccolta indipendente dei gameti maschili e femminili, onde evitare una fecondazione accidentale delle uova.

Nel caso non siano disponibili due operatori, è necessario porre una particolare attenzione nel recupero dei gameti, separando repentinamente i maschi dalle femmine e utilizzando materiali differenti (es. guanti) per maneggiare gli individui dei due sessi.

L'emissione dei gameti viene provocata tramite iniezione, effettuata con una siringa da insulina, di 0,5 ml di KCl 0,5 M attraverso la membrana peristomale. Come accortezza per cercare di non forare l'apparato digerente, l'iniezione viene effettuata con l'ago inclinato verso l'esterno al fine di rilasciare la soluzione salina nella cavità celomatica. Se dopo la prima iniezione i gameti non sono emessi, è possibile effettuarne una seconda. L'emissione può essere anche facilitata scuotendo l'animale per alcuni secondi. Il trattamento meccanico infatti, oltre a stimolare già di per sé l'emissione, aiuta la distribuzione del KCl in tutte le gonadi.

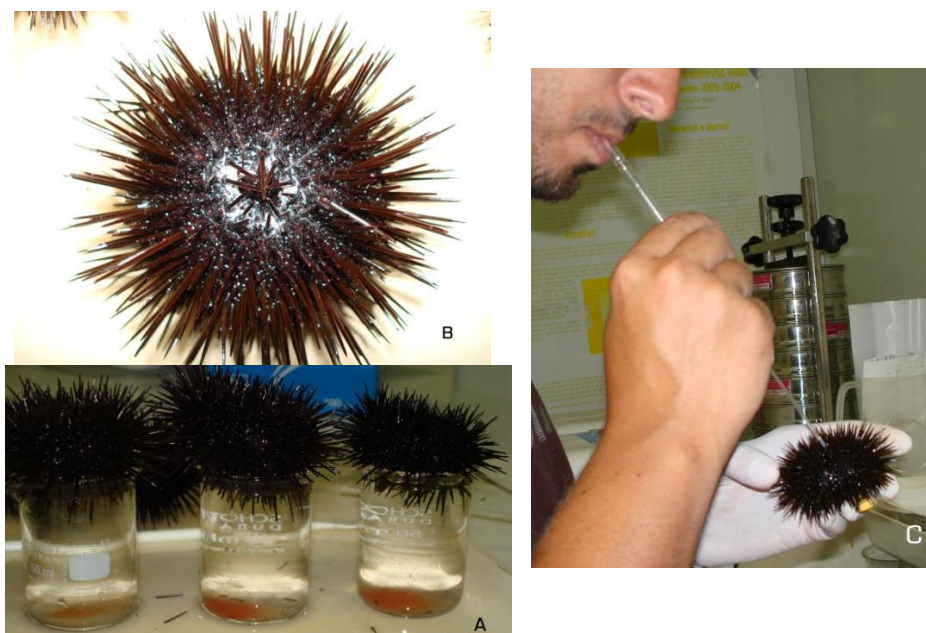
Una volta iniziata l'emissione, i gameti devono essere immediatamente raccolti in maniera separata. Gli animali devono essere lasciati emettere per un periodo non superiore ai 30 minuti per assicurare una migliore qualità dei gameti.

Le uova possono essere recuperate in beakers di vetro da 100 ml riempiti con acqua di mare, posizionando la femmina con il poro genitale rivolto verso l'acqua (è opportuno che il livello dell'acqua arrivi a lambire il corpo dell'animale; Fig. 7A). Le uova depositate sul fondo del beaker possono essere recuperate facilmente con una pipetta Pasteur di plastica.

Lo sperma deve essere recuperato "a secco" direttamente dai gonopori dell'animale tramite aspirazione con una pipetta Pasteur di vetro (Fig. 7B e Fig. 7C) e conservato a 4 °C in un tubo da 1,5 ml (tipo Eppendorf®).

In caso di scarsa emissione è possibile recuperare i gameti direttamente dalle gonadi. Il riccio viene dissezionato rimuovendo prima l'intera superficie orale e subito dopo l'intestino, lavando la cavità celomatica con acqua di mare filtrata (FSW). Le gonadi vengono successivamente prelevate con una spatola: quelle maschili vengono adagiate su piastre Petri e lo sperma viene raccolto a secco; quelle femminili sono invece immerse in FSW, per poi essere filtrate a 85 µm in modo da rimuovere pezzi di tessuto e recuperare solo le uova (Morrioni et al., 2016). Questa operazione richiede una certa esperienza manuale da parte dell'operatore e la qualità delle uova di solito risulta più bassa rispetto a quella ottenuta con l'emissione indotta con KCl, in quanto lo *stripping* delle gonadi aumenta la percentuale di raccolta di uova immature. Per i motivi sopra esposti e per evitare la morte dell'animale, questa soluzione viene consigliata solo come *extrema ratio*.

In entrambi i casi, le uova devono essere preliminarmente osservate al microscopio per valutarne la qualità: una piccola quantità di uova prelevata con una pipetta Pasteur in plastica deve essere posizionata su un vetrino da orologio ed osservata al microscopio (obiettivi 4x e 10x). Sono da scartare le uova che ad un controllo ottico a campione appaiono vacuolate, irregolari o piccole.



*Figura 7: Recupero dei gameti di P. lividus. A: emissione delle uova; B: emissione dello sperma; C: raccolta dello sperma (foto Sartori)*

Viene effettuata inoltre una prova di fecondazione aggiungendo ad ogni subcampione di uova, rappresentativo di ciascun gruppo emesso da ogni singolo esemplare, una piccola quantità di sperma diluito in acqua di mare. Se un gruppo di uova non viene interamente fecondato in breve tempo (entro 1 minuto), viene scartato.

I gruppi di uova risultati idonei vengono uniti assieme e trasferiti in un beaker di vetro da 1 L contenente FSW mediante pipette Pasteur in plastica. Le uova vengono lasciate decantare per 15 minuti circa, al termine dei quali metà dell'acqua contenuta nel beaker viene rimossa molto lentamente, consentendo così l'eliminazione anche di uova deformi, danneggiate o immature (che generalmente galleggiano) e l'accumulo sul fondo del beaker di quelle in buone condizioni. Si suggerisce di effettuare almeno 3 lavaggi aggiungendo ogni volta, con delicatezza, acqua di mare filtrata. Per eliminare impurità grossolane (pellets fecali, pedicelli, ecc.) si può procedere anche alla filtrazione delle uova tramite filtro da 100  $\mu\text{m}$ .

Durante e dopo i lavaggi le uova devono essere conservate a  $18 \pm 1$  °C.

#### **4.4 - Conteggio dei gameti**

Per l'esecuzione del saggio di fecondazione è essenziale il conteggio numerico dei gameti. Per il saggio di sviluppo embrionale basato sull'esposizione degli zigoti, una volta acquisita una discreta manualità, possono essere utilizzati sistemi alternativi, come meglio riportato al paragrafo 4.6.2.

La densità delle uova viene determinata in una piastra Petri o in un vetrino da orologio su un'aliquota di 0,1 ml della sospensione ottenuta.

La conta viene effettuata mediante un microscopio ottico (obiettivo 10x), ripetendo questa operazione almeno 5 volte, al fine di ottenere una stima relativamente accurata della concentrazione delle uova presenti in soluzione. In base a tale conteggio la

sospensione di partenza viene concentrata o diluita fino al raggiungimento di una densità di 1.000 uova/ml.

La densità spermatica viene determinata in un tubo da centrifuga tipo Falcon® da 50 ml aggiungendo a 50 µl di sperma 25 ml di acqua dolce. Si ottiene in questo modo una diluizione di 500 volte (FD = 500).

Il prelievo dello sperma dalla Eppendorf® per la determinazione della densità spermatica costituisce una fase piuttosto delicata, a causa del materiale biologico denso e disomogeneo in essa presente. Al fine di ridurre le differenze tra i prelievi si suggerisce di:

- ✓ utilizzare una micropipetta per liquidi viscosi, dotata di puntali del tipo “*capillary pistons*”;
- ✓ immergere il puntale della micropipetta nella sospensione spermatica concentrata e agitarla per alcuni secondi, muovendo il puntale con movimenti rotatori;
- ✓ iniziare lentamente ad aspirare, cercando di evitare la formazione di bolle d'aria o il prelievo di frammenti di aculei che possono essere presenti, continuando a ruotare il puntale;
- ✓ estrarre il puntale dalla soluzione e pulirne con cura la superficie esterna;
- ✓ assicurarsi che tutto lo sperma venga trasferito dal puntale nella soluzione del tubo Falcon®, svuotando e riempiendo più volte il puntale con l'acqua di diluizione;
- ✓ chiudere il tubo Falcon® e agitare bene la sospensione;
- ✓ prelevare una quantità di sospensione spermatica con la micropipetta;
- ✓ porre una goccia lungo il bordo superiore del vetrino della camera di conta emocitometrica (Appendice 1), in modo tale che la sospensione spermatica diffonda all'interno per capillarità (nel caso della camera Neubauer 1 goccia per 2 siti di lettura), attendere circa 15 minuti (meglio se a 4 °C) per consentire alle cellule di sedimentare e successivamente effettuare il conteggio mediante microscopio ottico (obiettivo 40x).

In base a tale conteggio diluire lo sperma in acqua di mare filtrata in modo che nella fase successiva del test si possa raggiungere il rapporto sperma-uova di 15.000:1. Per ulteriori indicazioni operative relative al conteggio dello sperma si veda l'Appendice 1.

#### **4.5 - Parametri da monitorare: salinità, pH, ossigeno disciolto e temperatura**

Alcuni parametri ambientali nelle matrici da analizzare possono costituire dei fattori di confusione e devono quindi essere controllati prima dell'allestimento dei saggi al fine di evitare interferenze nei risultati.

La temperatura dell'acqua nelle camere di prova deve essere mantenuta a  $18 \pm 1$  °C (Volpi Ghirardini and Arizzi Novelli, 2001; Arizzi Novelli et al., 2002, 2003; Sartori et al., 2015, 2016a), mentre la salinità dovrebbe essere mantenuta nel range di  $35 \pm 1$  ‰ (Saco-Álvarez et al., 2010; Carballera et. al, 2011; Sartori et. al, 2016a; Morroni et. al, 2018a).

Camere e/o incubatori ad alto volume di ventilazione devono essere usati con cautela, poiché la ventilazione forzata potrebbe causare forti oscillazioni della salinità.

L'utilizzo di piastre multi-pozzetto munite di coperchio può aiutare a prevenire l'evaporazione delle soluzioni di prova.

L'aerazione può influenzare la tossicità del campione e dovrebbe essere utilizzata solo come ultima soluzione, per mantenere la concentrazione di ossigeno disciolto (DO) possibilmente prossima alla saturazione (DO = 7,5 mg/L a 18 °C e salinità a 35 ‰) e comunque non inferiore a 4,0 mg/L. La concentrazione di DO deve essere misurata



all'inizio della prova (prima dell'allestimento delle camere test), insieme al pH che deve oscillare nell'intervallo 7,8 - 8,3.

#### BOX 4 - Fattori di confusione

Prima dell'esposizione, la salinità, il pH e l'ossigeno disciolto del campione devono essere controllati ed eventualmente corretti entro valori ottimali per *Paracentrotus lividus*.

Tuttavia, i principali responsabili di falsi positivi nei test effettuati su elutriati di sedimenti marini sono l'ammoniaca indissociata e altri composti ridotti (Cardwell et al., 1976; Matthiesen et al., 1998). Poiché i livelli di questi composti tendono generalmente ad aumentare con il tempo di conservazione, per i campioni di sedimento si consiglia un periodo massimo di stoccaggio di una settimana al buio e a 4° C.

È importante sottolineare come l'ammoniaca disciolta negli elutriati incida significativamente sullo sviluppo larvale di *P. lividus*, in letteratura Saco-Álvarez et al. (2010) riportano un valore di NOEC di 40 mg/L mentre Losso et al. (2007) riportano una LOEC relativa all'ammoniaca totale di 0,5 mg/L, e una EC50 = 4,2 mg/L. Questo parametro non sembra però condizionare il processo di fecondazione, il quale risulta esclusivamente subordinato alla concentrazione della sospensione spermatica (Byrne et al., 2010). Persino a basse densità spermatiche l'acidificazione del mezzo (pH 7,1 - 7,4) e l'incremento della pCO<sub>2</sub> (2.000 - 10.000 ppm CO<sub>2</sub>) non riducono il tasso di fecondazione (Bay et al., 1993; Kurihara and Shirayama, 2004; Carr et al., 2006; Havenhand and Schlegel, 2009), così come l'aumento della temperatura non sembra favorirlo (Rupp, 1973; O'Connor and Mulley, 1977; Mita et al., 1984; Fujisawa, 1989; Chen and Chen, 1992; Sewell and Young, 1999; Davis, 2000; Lee et al., 2004; Negri et al., 2007; Byrne et al., 2009).

La concentrazione di ammoniaca non ionizzata in un campione è funzione della temperatura e del pH ed è calcolata in base al valore percentuale ottenuto da Tabella 1 di Appendice 3 (alle condizioni di pH e temperatura appropriate) e moltiplicandolo per la concentrazione di ammoniaca totale nel campione (mg/L).

Anche l'idrogeno solforato (H<sub>2</sub>S) può essere causa di falsi positivi, soprattutto per quanto riguarda lo sviluppo larvale (NOEC = 0,1 mg/L; Losso et al., 2004); tuttavia, a differenza dell'NH<sub>3</sub>, l'H<sub>2</sub>S può essere facilmente rimosso aerando dolcemente il campione.

#### 4.6 - Esecuzione

È consigliabile effettuare la prova il giorno stesso della raccolta dei gameti, fatta salva la verifica della qualità degli stessi.

##### 4.6.1 - Saggio di fecondazione

Il saggio di fecondazione viene eseguito aggiungendo 0,1 ml di sospensione di sperma (preparata secondo quanto descritto al paragrafo 4.4) alle diverse diluizioni della soluzione test secondo il seguente schema:

Diluizione	Esposizione dello sperma (1 h)				Fecondazione (20 min)	
	SW (ml)	Campione (ml)	Sperma (ml)	Volume (ml)	Uova (ml)	Volume finale (ml)
100%	-	8,90	0,10	9	1	10
50%	4,45	4,45	0,10	9	1	10
25%	6,70	2,20	0,10	9	1	10

Lo sperma (0,10 ml) viene esposto alle soluzioni da testare per 1 h alla temperatura di  $18 \pm 1$  °C, dopo di che viene aggiunto 1 ml di soluzione finale di uova ottenendo un volume finale di 10 ml.

Per aggiungere il numero corretto di uova ad ogni camera test, occorre mantenere in sospensione le uova presenti nella soluzione stock (densità 1.000 uova/ml), agitandola dolcemente con una bacchetta. Le uova devono essere prelevate con una pipetta automatica.

Il rapporto sperma : uova da adottare nel presente protocollo è di 15.000:1, con 1.000 uova in 10 ml di soluzione test (densità finale nella camera test 100 uova/ml).

Nel Box 5 è riportata una panoramica generale sulle alternative proposte in letteratura per quanto riguarda il numero di uova da impiegare nell'esecuzione dei due saggi.

#### **BOX 5 - Il numero di uova da impiegare nel saggio di sviluppo embrionale e di fecondazione**

Per entrambe le tipologie di saggio il numero di uova impiegato, sulla base di quanto riportato in letteratura, risulta essere una componente piuttosto variabile. Tuttavia, come riportato in Lera et al. (2006) nel caso del saggio di fecondazione, esso può influenzare la sensibilità della risposta.

La concentrazione di uova impiegata per il saggio di fecondazione riportata in letteratura per *P. lividus* varia da 20 uova per ml (Kozinkova et al., 2003) a 30 uova per ml (Giuliani et al., 2002; Lera and Pellegrini, 2006), fino a 100 (Lera et al., 2006), o 200 uova per ml (Volpi Ghirardini and Arizzi Novelli, 2001; Lera et al., 2006).

Analogamente a quanto riportato per il saggio di spermiotossicità, in quello di embriotossicità il numero di uova impiegato, sulla base di quanto riportato in letteratura, risulta essere una componente piuttosto variabile. Molti autori per evitare fenomeni di "*overcrowding*" che potrebbero inficiare il corretto sviluppo del pluteo lavorano con concentrazioni relativamente basse di embrioni (20 - 30 embrioni per ml) (His et al., 1999; Fernandez and Beiras, 2001; Lorenzo et al., 2002; Phillips et al., 2003; Bellas et al., 2005; Casado Martinez et al., 2006; De Nicola et al., 2007; Salamanca et al., 2009); tuttavia, sono presenti lavori dove la concentrazione della sospensione iniziale di uova impiegata nel test è ben più elevata: Agnello et al. (2006, 2007) riportano concentrazioni di 5.000 uova per ml, mentre altri autori hanno utilizzato una concentrazione di 1.000 uova per ml (Gaion et al., 2013; Sartori et al., 2015, 2016a).

Trascorsi 20 minuti, la fecondazione viene bloccata mediante aggiunta di 2-3 gocce di formaldeide o di un fissativo alternativo (BOX 6) e le piastre coperte, impilate e conservate a 4 °C fino alla lettura al microscopio.

#### **BOX 6 - Proposte alternative all'uso della formaldeide come fissativo**

La formaldeide o aldeide formica, gas di odore pungente e irritante, viene prodotta e commercializzata normalmente sotto forma di soluzione acquosa, con il nome di formalina. Questo prodotto viene utilizzato come fissativo per la conservazione di campioni biologici, con lo scopo di preservare la morfologia dei tessuti o degli organismi da conservare. Tuttavia, a partire dal 2004 la formalina è stata inserita dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (AIIRC) nell'elenco delle sostanze accertate cancerogene per la specie umana. Anche a livello normativo comunitario ne è stata riconosciuta la cancerogenicità. Infatti, il Regolamento (UE) n. 605/2014 ha classificato la formaldeide come un cancerogeno di Categoria 1B/2 (può provocare il cancro ed è sospettata di provocare alterazioni genetiche), mentre in precedenza era stata classificata come un cancerogeno di Categoria 2/3 (sospetta di provocare il cancro) dal Regolamento (CE) n. 1272/2008.

Da qui nasce l'esigenza di sperimentare fissativi alternativi per la conservazione di alcuni tipi di campioni e conseguentemente ridurre i costi di gestione dei campioni. Alcuni ricercatori (Oselladore et al., 2012), hanno sperimentato tre fissativi alternativi alla formalina per la conservazione di campioni di macrozoobenthos marino: il FineFIX diluito in etanolo, il Gliossale e l'Etanolo al 90 %. I primi due composti erano stati già sperimentati in ambito istochimico (Iesurum et al., 2006; Stanta et al., 2006; Buesa, 2008). Il loro studio ha dimostrato che la soluzione contenente FineFIX al 40 % ed Etanolo al 60 % è risultata la migliore per la conservazione di Policheti e Crostacei. Un fissativo molto utilizzato per la conservazione dei campioni di fitoplancton è la "soluzione di Lugol" (soluzione di iodio e potassio ioduro) il cui pH può essere modificato per ottimizzarne le performance aggiungendo un 10 % di acido acetico. La soluzione di Lugol risulta poco tossica per l'osservatore e i campioni di fitoplancton così trattati possono essere conservati fino a 12 mesi. Lo iodio tuttavia tende ad ossidarsi riducendo, quindi, le sue proprietà fissative. Il Lugol è fotosensibile e i campioni da conservare andrebbero preservati al riparo dalla luce, ricambiando periodicamente la soluzione. Inoltre i campioni trattati con Lugol non possono essere letti con il microscopio a scansione e a epifluorescenza.

In commercio esistono anche altri fissativi (liquido di Carnoy, metanolo, acido acetico, ecc) che possono essere testati ed utilizzati in funzione delle necessità dei vari laboratori.

Ciò premesso, i laboratori ISPRA di Livorno da tempo utilizzano come fissativo per il saggio di fecondazione e di sviluppo embrionale con *P. lividus* la soluzione di Lugol forte (soluzione di iodio al 5 % che contiene 130 mg di iodio per millilitro). Per bloccare il saggio è sufficiente aggiungere poche gocce di soluzione di Lugol forte in ogni pozzetto.

#### **4.6.2 - Saggio di sviluppo embrionale**

Il saggio di embriotossicità consiste nella misura della frazione di plutei regolarmente sviluppata dopo esposizione degli zigoti per 72 h al campione da saggiare.

Gli zigoti da impiegare nel saggio biologico vengono ottenuti dall'unione della sospensione spermatica con la sospensione di uova, in un rapporto volumetrico spermatozoi : uova di 10:1 (ad esempio 1 ml di sospensione spermatica preparata secondo quanto indicato al paragrafo 4.4 e 10 ml di sospensione di uova con densità 1000 uova/ml, o volumi diversi a seconda del numero di prove da allestire). La fecondazione avviene lasciando il beaker contenente i gameti maschili e femminili nel giusto rapporto a  $18 \pm 1$  °C per almeno 20 minuti.

Un'alternativa alla preparazione della sospensione spermatica indicata nel paragrafo 4.4, apparentemente più semplice ma che richiede esperienza da parte dell'operatore

nella valutazione del volume idoneo di sperma per ottenere la fecondazione delle uova, consiste nel far avvenire la fecondazione aggiungendo 5 µl di sperma prelevato a secco a 300 ml di sospensione di uova (con densità 1000 uova/ml) (Morrone et al., 2016). Considerando la variabilità della densità delle cellule spermatiche raccolte a secco, i volumi sopra indicati garantiscono comunque una concentrazione di circa 50 cellule spermatiche per cellula uovo, rapporto più che sufficiente per determinare il successo della fecondazione. È opportuno comunque effettuare la verifica del processo di fecondazione al microscopio. Una volta verificata l'avvenuta fecondazione, viene effettuato un lavaggio per sedimentazione, allo scopo di eliminare parte degli spermatozoi in eccesso.

Il beaker contenente gli embrioni viene incubato a  $18 \pm 1$  °C per almeno 20 minuti prima di esporre gli embrioni alle soluzioni test.

Il saggio di embriotossicità viene eseguito esponendo 1 ml di soluzione di zigoti a 9 ml della soluzione test (densità finale 100 zigoti/ml) per un volume finale di 10 ml. Prima di iniziare l'incubazione nella piastra, la sospensione di zigoti deve essere agitata dolcemente con una paletta per mantenere gli embrioni in sospensione, assicurando in questo modo una densità omogenea in ogni pozzetto. Dopo l'inoculazione, le piastre vanno poi mantenute in cella termostatica al buio a  $18 \pm 1$  °C per 72 h.

Normalmente gli zigoti si sviluppano e raggiungono lo stadio larvale in 48 h; tuttavia il periodo di esposizione di 72 h scelto per il test garantisce il raggiungimento dello stadio di pluteo da parte di tutti gli zigoti presenti nel controllo negativo.

Al termine del periodo di esposizione il test viene concluso fissando il campione con 2-3 gocce di formaldeide tamponata o con un fissativo alternativo (vedi BOX 6).

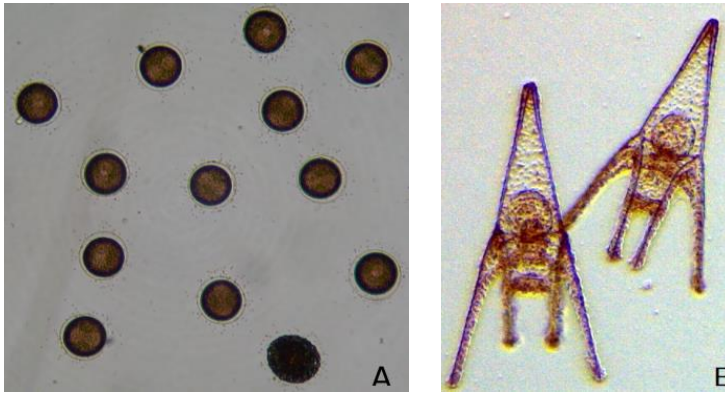
#### **4.7 – Lettura dei test di fecondazione e di sviluppo embrionale**

Per effettuare la corretta lettura dei test/saggi, precedentemente fissati con 2-3 gocce di formaldeide tamponata o con un fissativo alternativo (Parag. 4.6), per ogni camera test devono essere contate almeno 200 uova per il saggio di fecondazione (Lera et al., 2006; Volpi Ghirardini et al., 2005b) e almeno 100 larve per il saggio di sviluppo embrionale (Sartori et al., 2016a; Volpi Ghirardini et al., 2005b). Le letture vengono effettuate direttamente nelle camere test (pozzetti delle piastre) con obiettivo da 4x a 10x.

Per il test di fecondazione viene valutata la percentuale delle uova fecondate, ovvero le uova con la membrana di fecondazione completamente o parzialmente visibile (Fig. 8A e Fig. 10A). Non sono considerate nel conteggio le uova immature o quelle danneggiate.

Per il saggio di sviluppo viene determinata la frazione di larve sviluppate normalmente allo stadio di pluteo (Fig. 8B e Fig. 10N).

Per ottenere una stima più accurata degli effetti embriotossici possono essere identificate diverse categorie di anomalie dello sviluppo distinguendo tra plutei malformati, cioè larve sviluppate ma che presentano malformazioni scheletriche e/o dell'apparato digerente, e fasi pre-larvali di blastula, gastrula, prisma e pluteo precoce bloccate prima del raggiungimento del completo sviluppo (vedi BOX 7 e Appendice 2).



*Figura 8: Uova fecondate (A), con membrana di fecondazione ben visibile, e plutei normoformati (B) di P. lividus (foto Sartori)*

#### **BOX 7 - Endpoint alternativi del test di sviluppo embrionale**

L'endpoint del saggio di sviluppo embrionale (percentuale di embrioni normoformati calcolata allo stadio di pluteo 4 braccia) è stato scelto perché utilizza uno stadio di sviluppo sensibile alla contaminazione, con tempi d'incubazione e aspetto dell'embrione che risultano pratici per l'operatore. Tuttavia presenta anche alcune limitazioni, tra queste la principale è che impedisce di discriminare tra malformazioni e ritardo nello sviluppo in assenza di malformazioni, considerando "anormale" qualsiasi tipologia di embrione pre-pluteo e dando lo stesso peso a un'ampia varietà di effetti tossici.

Per approfondire questa problematica alcuni autori hanno utilizzato end-point alternativi. Ad esempio Fernandez e Beiras [2001], Saco-Alvarez [2010], Beiras et al. [2012] hanno proposto la valutazione dell'inibizione della crescita, calcolata a partire dalla dimensione degli embrioni, considerando l'EC10. Questo criterio permette una maggiore discriminazione degli effetti tossici rispetto al criterio standard, in particolare quando gli embrioni si trovano tra gli stadi di gastrula e quello di pluteo, aumentando così la sensibilità del test. Tuttavia, a causa della diversa pendenza della curva dose-risposta, la situazione sembra invertirsi considerando l'EC50 (Morrone, 2016).

Un differente approccio, proposto da Carballeira et al. [2012], si basa sulla assegnazione degli embrioni a 4 classi con tossicità crescente in funzione della gravità delle malformazioni scheletriche. Per quanto sia un criterio più sensibile non discrimina quantitativamente le diverse malformazioni.

Con l'obiettivo di aumentare ulteriormente la sensibilità del saggio di embriotoxicità, Morrone et al. [2016, 2018b] hanno messo a punto un indice di tossicità integrato (ITI) calcolato combinando la frequenza degli embrioni anomali con la gravità delle anomalie. La scala di tossicità proposta prevede che le anomalie dello sviluppo vengano classificate come ritardi nello sviluppo con o senza ulteriore alterazione morfologica. La scala di tossicità va da un minimo di 0 a un massimo di 10, in funzione della gravità e dello stadio in cui appaiono gli embrioni dopo 24 h [Gastrula] o 48 - 72 h dalla fecondazione [Pluteo]. I punteggi più bassi sono attribuiti agli embrioni con ritardo dello sviluppo, mentre i più alti agli embrioni con ritardo associato a malformazioni, morfotipi questi ultimi che hanno le minori capacità di recupero. Rispetto agli altri approcci, l'indice ITI richiede un maggior tempo per le letture e una buona preparazione dell'operatore nella discriminazione delle tipologie di malformazioni.

#### 4.8 - Elaborazione dati

Al fine di compensare nel calcolo finale del risultato le possibili variazioni misurate nel controllo negativo in termini di uova non fecondate o embrioni non normoformati, viene apportata la cosiddetta "correzione di Abbott", mediante la seguente formula:

$$\text{Abbott} = (X - Y) / (100 - Y) \cdot 100$$

dove:

X = % di effetto nel campione testato;

Y = % di effetto nel controllo.

uova non fecondate e embrioni non normoformati

In tal modo si ottiene una normalizzazione delle percentuali di effetto dovute alla sostanza tossica o al campione ambientale testato rispetto al controllo negativo; i valori ottenuti vengono utilizzati nel calcolo del valore di EC50 tramite il metodo di Trimmed Spearman-Kärber (TSK)<sup>3</sup>.

Oltre al TSK per il calcolo dell'EC50 può essere utilizzato l'Epa Probit Analysis Program (<https://www.epa.gov/bmds/download-benchmark-dose-software-bmds-model-executables>), che fornisce oltre al valore di EC50 anche i valori di EC1, EC5, EC10, EC15, EC85, EC90, EC95, EC99. In alternativa, qualora si voglia determinare oltre al valore di EC50 anche il valore di EC20, può essere utilizzato il Comprehensive Environmental Toxicity Information System™ (CETIS) della Tidepool Scientific Software.

Nel caso di utilizzo dei criteri di integrazione ponderata di cui al DM 173/2016, non viene calcolata la EC50 o la EC20, ma l'effetto percentuale al netto del controllo negativo, utilizzando una sola concentrazione del campione.

#### 4.9 - Validità dei risultati

Affinché la prova sia considerata valida, la percentuale nel controllo negativo di uova fecondate nel saggio di fecondazione e di plutei normoformati nel saggio di sviluppo deve essere maggiore dell'80 % (Gaion et al., 2013; Sartori et al., 2016b).

Inoltre, il valore dell'EC50 con il tossico di riferimento deve ricadere nella carta di controllo del laboratorio (BOX 8).

Nel caso in cui queste condizioni non siano rispettate è consigliabile ripetere la prova con gameti raccolti da altri esemplari.

La deviazione standard delle repliche di uno stesso campione non dovrebbe essere maggiore del 5 %. Se ciò dovesse accadere, è possibile scartare la replica che si discosta maggiormente dalla media.

---

<sup>3</sup> Qualora venga utilizzata la versione Trimmed Spearman-Kärber 1.5, inserire nel programma le medie dei dati grezzi, poiché tale versione effettua automaticamente la correzione di Abbott.

### **BOX 8 - Esempio di carta di controllo**

Nei laboratori della Sezione ISPRA di Livorno i limiti della carta di controllo ottenuta da più operatori, in diversi anni (dal 2003 al 2017 per il saggio di fecondazione e dal 2005 al 2017 per quello di sviluppo embrionale) usando come tossico di riferimento  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  varia:

- per il saggio di fecondazione tra 21,69 (LCL) - 68,18 (UCL)  $\mu\text{g}/\text{L}$ , in accordo con i dati riportati in letteratura (Nacci et al., 1986; Dinnel et al., 1987; Volpi Ghirardini and Arizzi Novelli, 2001; Lera and Pellegrini, 2006);

- per il saggio di sviluppo embrionale tra 22,60 (LCL) - 68,34 (UCL)  $\mu\text{g}/\text{l}$ ; per questo saggio in letteratura si trovano valori che variano tra 20 e 110  $\mu\text{g}/\text{L}$  (His et al., 1999; Fernández and Beiras, 2001; Arizzi Novelli et al., 2002, 2003a; Anderson et al., 2004).

## BIBLIOGRAFIA

---

- Agnello M., Filosto S., Scudiero R., Rinaldi A.M., Roccheri M.C., 2006. Cadmium accumulation induces apoptosis in *P. Lividus* embryos. *Caryologia* 59(4): 403-408.
- Agnello M., Filosto S., Scudiero R., Rinaldi A.M., Roccheri M.C., 2007. Cadmium induces an apoptotic response in sea urchin embryos Cell Stress Chaperones 12 (1): 44-50
- Allain J.Y., 1975. Structure des populations de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata, Echinoidea) soumises à la pêche sur les côtes Nord de Bretagne. *Rev Trav Inst Pêches Marit* 39 (2): 171-212.
- Allain J.Y., Vrana B., Greenwood R., Mills G.A., Roig B., Gonzalez C., 2006. A toolbox for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta*. 69: 302-322.
- Anderson B., Nicely P., Gilbert K., Kosaka R., Hunt J., Phillips B., 2004. Overview of freshwater and marine toxicity tests: a technical tool for ecological risk assessment. California Environmental Protection Agency. <http://oehha.ca.gov/ecotox/pdf/marinetox3.pdf>.
- Angelini C., Aluigi M.G., Sgro M., Trombino S., Thielecke H., Falugi C., 2005. Cell signalling during sea urchin development: a model for assessing toxicity of environmental contaminants. *Prog Mol Subcell Biol* 39: 45-70.
- Arizzi Novelli A. Volpi Ghirardini A, Giuliani S, Falugi C, Pagano G, Iaccarino M, 2001 Valutazione della tossicità di acque e sedimenti costieri su gameti ed embrioni di specie autoctone di ricci di mare utilizzando metodiche differenziate. *Biol Mar Medit* 8: 41-59.
- Arizzi Novelli A., Argese E., Tagliapietra D., Bettiol C., Volpi Ghirardini A., 2002. Toxicity of tributyltin and triphenyltin to early life-stages of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Environ Toxicol Chem* 21(4): 859-864
- Arizzi Novelli A., Losso C., Ghetti P.F., Volpi Ghirardini A., 2003a. Toxicity of heavy metal using sperm cell and embryo toxicity with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): comparison with exposure concentration in the lagoon of Venice, Italy. *Environ Toxicol Chem* 22(6): 1295-1301.
- Arizzi Novelli A., Picone M., Losso C., Volpi Ghirardini A., 2003b. Ammonia as con-founding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk). *Toxicol and Environ Chem* 85(4-6):183-191.
- Arizzi Novelli A., Losso C., Libralato G., Tagliapietra D., Pantani C. and Volpi Ghirardini A., 2006. Is the 1:4 elutriation ratio reliable? Ecotoxicological comparison of four different sediment: water proportions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65: 306-313.
- Arizzi Novelli A., Losso C., Libralato G., Volpi Ghirardini A., 2007a. Valutazione delle metodologie di elutriazione mediante saggi di tossicità. *Biologia Marina Mediterranea*, 14 (1): 87-89.
- Arizzi Novelli A. Losso C. Falugi C., Giuliani S., Kozinkova L., Lera S., Leoni T., Manzo S., Mazziotti C., Pellegrini D., Picone M., Volpi Ghirardini A., 2007b. Il test di fecondazione con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* (LMK) *Biologia Marina Mediterranea* 14 (1): 43-47.
- ASTM, 1994. Standard Guide for Designing Biological Tests With Sediments. ASTM E1525: 22 pp.
- ASTM, 1995. Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests With Echinoid Embryos. ASTM E1563: 20 pp.



ASTM, 1998. Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. ASTM E724-98: 21 pp.

Aubin G., 2004. Régime alimentaire des deux oursins réguliers *Paracentrotus lividus* et *Sphaerechinus granularis* dans une zone colonisée par *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* (Sonder) Verlaque, Huiman et Boudoursque du golfe de Marseille. Rapport stage Maîtrise, Univ Aix-Marseille 2.

Augier H., Ramonda G., Rolland J., Santimone M., 1989, Teneurs en métaux lourds des oursins comestibles *Paracentrotus lividus* (Lamarck) prélevés dans quatre secteurs tests du littoral de Marseille [Méditerranée, France]. Vie Mar HS 10: 226–239.

Azzolina J.F., Willsie A., 1987. Abondance des juvéniles de *Paracentrotus lividus* au sein de l'herbier à *Posidonia oceanica*. In: Boudouresque CF (ed.) Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. GIS Posidonie, Marseilles, pp 159–167.

Azzolina J.F., 1988. Contribution à l'étude de la dynamique des populations de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Lmck.). Croissance, recrutement, mortalité, migrations. Thèse Doct, Univ Aix-Marseille 2.

Basuyaux O., Blin J.L., 1998. Use of maize as a food source for sea urchins in a recirculating rearing system. Aquac Int 6: 233–247.

Bay S., Burgess R., Nacci D., 1993. Status and applications of echinoid (Phylum Echinodermaata) toxicity test methods, in: Landis WG, Hughes JS, Lewis MA (eds), Environmental toxicology and risk assessment. American society for testing and materials, Philadelphia, pp. 281-302.

Beiras R., Vázquez E., Bellas J., Lorenzo J.I., Fernández N., Macho G., Marino J.C., Casas L., 2001. Sea-urchin embryo bioassay for in situ evaluation of the biological quality of coastal seawater. Estuar. Coast Shelf. Sci. 52: 29–32.

Beiras R., Fernandez N., Bellas J., Besada V., Gonzalez-Quijano A., Nunes, T., 2003a. Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. Chemosphere. 52: 1209–1224.

Beiras R., Bellas J., Fernandez N., Lorenzo J.I., Cobelo-Garcia A., 2003b. Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels [*Mytilus galloprovincialis*] versus embryo–larval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. Mar. Environ. Res. 56: 531–553.

Beiras R., Durán I., Bellas J., Sánchez-Marín P., 2012. Biological effects of contaminants: *Paracentrotus lividus* sea urchin embryo test with marine sediment elutriates. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences No. 51, 13 pp.

Bellas J., Beiras R., Mariño-Balsa J., Fernández N., 2005. Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: a comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. Ecotoxicology 14(3): 337–353.

Bendich A., 1994. Recent advances in clinical research involving carotenoids. Pure Appl Chem 66: 1017–1024.

Benedetti M., Ciaprini F., Piva F., Onorati F., Fattorini D., Notti A., Ausili A., Regoli F., 2011. A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environment International*, 38: 17-28.

Benedetti-Cecchi L., Cinelli F., 1995. Habitat heterogeneity, sea urchin grazing and distribution of algae in littoral rock pools on the west coast of Italy (western Mediterranean). *Mar Ecol Prog Ser* 126: 203-212.

Bonnet A., 1925. Documents pour servir à l'étude des variations chez les Echinides. *Bull Inst Oceanogr (Monaco)* 462: 1-28.

Boudouresque C.F., Verlaque M., Azzolina J.F., Meinesz A., Nédélec H., Rico V., 1989. Evolutions des populations de *Paracentrotus lividus* et d'*Arbacia lixula* (Echinoidea) le long d'un transect permanent à Galeria (Corse). *Trav Sci Parc Nat Rég Rés Nat Corse* 22: 65-82.

Boudouresque C.F., Rodríguez-Prieto C., Arrighi F., 1993. Place de *Caulerpa prolifera* (Chlorophyta) dans les preferences alimentaires de l'oursin *Paracentrotus lividus*. *Trav Sci Parc Nat Rég Rés Nat Corse* 41: 41-51.

Boudouresque C.F., Verlaque M., 2007. Ecology of *Paracentrotus lividus* In *Edible sea urchins: biology and ecology*, Second edition, Lawrence J, eds., Elsevier Press 2007, Amsterdam, pp. 243-285.

Bressan M., Marin M.G., Brunetti R., 1991. Effects of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on skeletal development of sea urchin embryos [*Paracentrotus lividus* LMK]. *Water Res* 25: 613-616.

Buesa R.J., 2008. Histology without formalin? *Annals of Diagnostic Pathology*, 12: 387-396.

Bulleri F., Bertocci I., Micheli F., 2002. Interplay of encrusting coralline algae and sea urchins in maintaining alternative habitats. *Mar Ecol Progr Ser* 243: 101-109.

Bunea A., Andjelkovic M., Socaciu C., Bobis O., Neacsu M., Verhe R., Van Camp J., 2008. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach [*Spinacia oleracea* L.]. *Food Chem* 108: 649-656. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.056>.

Buono S., Manzo S., Maria G., Sansone G., 2012. Toxic effects of pentachlorophenol, azinphos-methyl and chlorpyrifos on the development of *Paracentrotus lividus* embryos. *Ecotoxicology* 21:688-697

Byrne M., 1990. Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Mar Biol* 104: 275-289.

Byrne M., Ho M., Selvakumaraswamy P., Ngyuen H., Dworjanyan S.A., Davis A.R., 2009. Temperature, but not pH, compromises sea urchin fertilization and early development under near-future climate change scenarios. *Proc R Soc Med B* 276: 1883-1888.

Byrne M., Soars N., Selvakumaraswamy P., Dworjanyan S.A., Davis A.R., 2010. Sea urchin fertilization in a warm, acidified and high pCO<sub>2</sub> ocean across a range of sperm densities. *Mar Environ Res* 69(4): 234-239.

Cao G., Sofic E., Prior R., 1997. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J Agric Food Chem* 44: 3426-3431.

Carballeira C., Martin-Diaz L., DelValls T.A., 2011. Influence of salinity on fertilization and larval development toxicity tests with two species of sea urchin, *Mar. Environ. Res.* 72:196-203

Carballeira C., Ramos-Gómez J., Martin-Diaz L., DelValls T.A., 2012. Identification of specific malformations of sea urchin larvae for toxicity assessment: applications to marine pisciculture effluents. *Mar. Environ. Res.* 77, 12-22.

Cardwell R.D., Woelke C.E., Carr M.I., Sanborn E.W., 1976. Sediment and elutriate toxicity to oyster larvae. In : Proceedings of the speciality conference on dredging and its environmental effects. American Society of Civil Engineers, New York pp. 684-718.

Carr R.S., Chapman D.C, 1995. Comparison of methods for conducting marine and estuarine sediment porewater toxicity tests: Extraction, storage and handling techniques. Arch Environ Contam Toxicol 28: 69-77.

Carr R.S., Biedenbach J.M., Nipper M., 2006. Influence of potentially confounding factors on sea urchin porewater toxicity tests. Arch Environ Contam Toxicol 51: 573-579.

Casado-Martínez M.C., Fernández N., Lloret J., Marín A., Martínez- Gómez C., Riba I., Beiras R., Saco-Álvarez L., DelValls T.A., 2006. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. III. Bioassay using embryos of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Cienc Mar 32(1B): 139-147.

Cesar A., Marín A., Marín-Guirao L., Vita R., Loret J., Del Valls T.A., 2009. Integrative ecotoxicological assessment of sediment in Portmán Bay (Southeast Spain). Ecotox. Environ. Safe. 72: 1832-1841.

Chen C.P., Chen B.Y., 1992. Effects of high-temperature on larval development and metamorphosis of *Arachnoides placenta* (Echinodermata, Echinoidea). Mar Biol 112: 445-449.

Cherbonnier G., 1956. Les Echinodermes de Tunisie. Bull Stati océanogr Salammbô 53: 1-23.

Clementson, L. A. and Wayte, S. E., 1992. 'The effects of frozen storage of open-ocean seawater samples on the concentration of dissolved Phosphate and Nitrate', Wat Res 26(9): 1171 – 1176.

Codomier L., Bruneau Y., Combaut G., Teste J., 1977. Etude biologique et chimique d'*Asparagopsis armata* et de *Falkenbergia rufolanosa* [Rhodophycées, Bonnemaisoniales]. CR Acad Sci Paris 284 D: 1163-1165.

Crane M., Burton G.A., Culp J.M., Greenberg M.S., Munkittrick K.R., Ribeiro R., Salazar M.H., St-Jean S.D., 2007. Review of aquatic in situ approaches for stressor and effect diagnosis. Integr. Environ. Assess. Manage. 3: 234–245.

Crapp G.B., Willis M.E, 1975. Age determination in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) with notes on the reproductive cycle. J Exp Mar Biol Ecol 20: 157–178.

Crook A.C., Long M., Barnes D.K.A., 2000. Quantifying daily migration in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. J Mar Biol Ass UK 80: 177–178

Cuomo V., Vanzanella F., Fresi E., Mazzella L., Scipione M.B., 1982. Microflora delle fanerogame marine dell'isola d'ischia: *Posidonia oceanica* (L.) Delile e *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers. Boll Mus Ist Biol dell' Univ Genova suppl 50: 162-166.

Davidson E. H., Cameron R. A., Ransick A., 1998. Specification of cell fate in the sea urchin embryo: summary and some proposed mechanisms. Development. 125: 3269–3290.

Davis M., 2000. The combined effects of temperature and salinity on growth, development, and survival for tropical gastropod veligers of *Strombus gigas*. J Shellfish Res 19, 883-889.

de Jong-Westman M., March B.E., Carefoot T.H., 1995a. The effect of different nutrient formulations in artificial diets on gonad growth in the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. Can J Zool 73: 1495–1502.

de Jong-Westman M., Qian P-Y, March B.E., Carefoot T.H., 1995b. Artificial diets in sea urchin culture: effects of dietary protein level and other additives on egg quality, larval morphometrics,

and larval survival in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. Can J Zool 73: 2080–2090.

De Nicola E., Meric S., Gallo M., Iaccarino M., Della Rocca C., Lofrano G., Russo T., Pagano G., 2007. Vegetable and synthetic tannins induced hormesis/toxicity in sea urchin early development and in algal growth. Environ. Pollut. 146: 46–54.

Delmas P., Régis M.B., 1986. Données préliminaires sur le contenu digestif de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Lamarck) soumis à l'influence d'effluents domestiques. Mar Environ Res 20: 197–220.

Delmas P., 1992. Etude des populations de *Paracentrotus lividus* (Lam.) (Echinodermata: Echinoidea) soumises à une pollution complexe en Provence nord-occidentale: densités, structure, processus de détoxification (Zn, Cu, Pb, Cd, Fe). Thèse Doct, Univ Aix-Marseille 3.

Dinnel P.A., Pagano G., Ossida P.S., 1988. A sea urchin test system for marine environmental monitoring. In: Echinoderm biology. Proceedings of the sixth international Echinoderm conference. Burke, R.D., Mladenov, P.V., Parsley, R.L. Balkem (Eds.). Rotterdam. 611-619.

Dinnel P.A., Link J.M., Stober Q.J. 1997. Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. Arch Environ Contam Toxicol 16: 23-32.

Drzewina, A. and Bohn, G. 1924. Un nouveau cas d'hermaphrodisme chez l'oursin, *Strongylocentrotus lividus*. CR. Acad. Sci. Paris. 178: 662–663.

Ebling F.J., Hawkins A.D., Kitching J.A., Muntz L., Pratt W.M., 1966. The ecology of Lough Ine. XVI. Predation and diurnal migration in *Paracentrotus* community. J Anim Ecol 35:559–566.

Emerson K., Russo R.C., Lund R.E. and Thurston R.V., 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculation: Effect of pH and temperature. J. Fish. Bd Can. 32, 2379-2383, 10.1139/f74-208.

Environment Canada, 1991. Fertilization assay with echinoids (sea urchin and sand dollars). Environmental Protection Series, EPS 1/RM, Ottawa, Canada.

Environment Canada, 1992. Biological test method: fertilization assay using Echinoids (sea urchins and sand dollars). Environmental Protection Series, EPS 1/RM/27, Ottawa, Canada.

Fabbrocini A., D'Adamo R., 2010. Gametes maturation and gonad growth in fed and starved sea urchin *Paracentrotus lividus*. J Shellfish Res 29(4): 1051-1059.

Fernandez C., 1989. Contribution à l'élaboration des bases scientifiques de l'aquaculture de l'oursin *Paracentrotus lividus*. Mém Maîtrise Sci Techn, Univ Corse.

Fernandez C., 1990. Recherches préliminaires à la mise en place d'un pilote d'aquaculture de l'oursin *Paracentrotus lividus* dans un étang corse. Dipl Etudes approf Océanol, Univ Aix-Marseille 2.

Fernandez C., 1996. Croissance et nutrition de *Paracentrotus lividus* dans le cadre d'un projet aquacole avec alimentation artificielle. PhD Thesis, Université de Corse, France.

Fernandez C., 1998. Season changes in the biochemical composition of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in a lagoonal environment. Mar. Ecol. 19 (1): 1– 11.

Fernandez N. and Beiras R., 2001. Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. Ecotoxicology 10: 263–271.

- Fernandez C. and Caltagirone A., 1994. Growth rate of adult sea urchins, *Paracentrotus lividus* in a lagoon environment: The effect of different diet types. In Echinoderms through time, David B, Guille A, Féral JP & Roux M, eds., AA Balkema Press 1994, Rotterdam, pp. 655-660.
- Fernandez C., Pasqualini V., Johnson M., Ferrat L., Caltagirone A., Boudouresque C.F., 2003. Stock evaluation of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in a lagoonal environment. In: Féral JP, David B (eds) Echinoderm research 2001. AA Balkema, Lisse, pp 319–323.
- Fernandez C. and Pergent G., 1998. Effect of different formulated diets and rearing conditions on growth parameters in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. J Shellfish Res 17:1571-1581.
- Forbes V.E., Forbes T.L., 1994. Ecotoxicology in theory and practice. London: Chapman & Hall.
- Frantzis A., Berthon J.F., Maggiore F., 1988. Relations trophiques entre les oursins *Arbacia lixula* et *Paracentrotus lividus* (Echinoidea Regularia) et le phytobenthos infralittoral superficiel dans la baie de Port-Cros (Var, France). Sci Rep Port-Cros Nation Park 14: 81-140.
- Frantzis A., Grémare A., 1992. Ingestion, absorption, growth rate of *Paracentrotus lividus* [Echinodermata: Echinoidea] fed different macrophytes. Mar Ecol Prog Ser 95: 169–183.
- Fujisawa H., 1989. Differences in temperature dependence of early development of sea urchins with different growing seasons. Bioll Bull 176: 96-102.
- Gaion A., Scuderi A., Pellegrini D., Sartori D., 2013. Arsenic exposure affects embryo development of sea urchin, *Paracentrotus lividus* [Lamarck, 1816]. Bull Environ Contam Toxicol 9: 565–570.
- Gamble J.C., 1965. Some observations on the behaviour of two regular echinoids. In: Lythgoe JN, Woods JD (eds) Symposium underwater association. Underwater Ass., Malta, pp 47–50.
- Gamble J.C., [1966-1967]. Ecological studies on *Paracentrotus lividus* [Lmk.]. In Underwater Association Report. TGW Industrial & Research Promotion Press 1966-1967, Carshalton, England, pp. 47-50.
- Garner S., Zysk I., Byrne G., Kramer M., Moller D., Taylor V., Burke R.D., 2016. Neurogenesis in sea urchin embryos and the diversity of deuterostome neurogenic mechanisms. Development. 143(2): 286-297.
- George S.B., Lawrence J.M., Lawrence A.L., Smiley J., Plank L., 2001. Carotenoids in the adult diet enhance egg and juvenile production in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. Aquaculture 199: 353–369.
- Giambartolomei F.M., 1990. Nuove acquisizioni sul test di fertilità dello sperma di riccio di mare *Paracentrotus lividus*, Thesis, University of Padova, Italy.
- Gianguzza P., Badalamenti F., Bonaviri C., Riggio S., 2009. The operational sex ratio of the sea urchins *Paracentrotus lividus* population: the case of the Mediterranean marine protected area of Ustica Island (Tyrrhenian Sea Italy). Mar. Ecol. 30:125-132.
- Gianguzza P., Bonaviri C., Prato E., Fanelli G., Chiantore M., Privitera D., Luzzu F., Agnetta D., 2013. Hydrodynamism and its influence on the reproductive condition of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus*. Mar. Environ. Res. 85: 29-33.
- Gibbs V.K., Powell M.L., Hammer H.S., Jones W.T., Watts S.A., Lawrence A.L., Lawrence J.M., 2013. Evaluation of the effects of menhaden oil and soybean oil levels in purified diets on growth and gonad production in adult sea urchin *Lytechinus variegatus*. N Am J Aquacult 75(2): 277-284.

- Giudice G., 1986. The sea urchin embryo: a developmental biological system. Springer-Verlag, Berlin.
- Giuliani S., Ennas C., Pellegrini D., Kozinkova L., 2002. The bioassay with sea urchin *Paracentrotus lividus*: different end-points to be applied to different environmental studies. *Fres Environ Bull* 11(10): 806–809.
- Giuliani S., Lera S., Kozinkova L., De Ranieri S., Pellegrini D., 2004. Sensibilità del saggio di fecondazione con gameti di *Paracentrotus lividus* (Lamarck) al variare di alcune condizioni sperimentali *Biol Mar Medit* 11(2): 330–333.
- Golden T., Hinerfeld D.A., Melov S., 2002. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell* 1:117–123. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1474-9728.2002.00015.x>.
- Goodwin T.W., 1980. The biochemistry of the carotenoids. Vol. 1. Plants. Chapman and Hall, London.
- Goodwin T.W., 1984. The biochemistry of the carotenoids. Vol. 2. Animals. Chapman and Hall, London.
- Graillet C., Pagano G., Girard J.P., 1993. Stage-specific effects of teratogens on sea urchin embryogenesis. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 130: 1-14.
- Griffiths M., Perrott P., 1976. Seasonal changes in the carotenoids of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Comp Biochem Physiol* 55B: 435–441.
- Guerriero A., Meinez A., D'ambrosio M., Pietra F., 1992. Isolation of toxic and potentially toxic sesqui- and monoterpenes from the tropical green seaweed *Caulerpa taxifolia* which has invaded the region of Cap Martin and Monaco. *Helv Chim Acta* 75: 689-695.
- Guettaf M., San Martn G.A., Francour P., 2000. Interpopulation variability of the reproductive cycle of *Paracentrotus lividus* in the South-Western Mediterranean. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 80: 899–907.
- Harmelin J.G., Bouchon C., Duval C., Hong J.S., 1980. Les échinodermes des substrats durs de l'île de Port-Cros, Parc National (Méditerranée Nord-occidentale). *Trav Sci Parc Nation Port-Cros* 6: 25–38.
- Harmelin J.G., Bouchon C., Hong J.S., 1981. Impact de la pollution sur la distribution des échinodermes des substrats durs en Provence (Méditerranée Nord-occidentale). *Téthys* 10 (1): 13–36.
- Havenhand J.N., Schlegel P., 2009. Near-future levels of ocean acidification do not affect sperm motility and fertilization kinetics in the oyster *Crassostrea gigas*. *Biogeosci Discuss* 6: 4573-4586.
- Haya D., Regis M.B., 1995. Comportement trophique de *Paracentrotus lividus* (Lam.) (Echinodermata: Echinoidea) soumis à six régimes alimentaires dans des conditions expérimentales. *Mésogée* 54: 35-42.
- Hayward P.J., Ryland J.S., 1990. The Marine Fauna of British Isles and North-West Europe, 2. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Hereu M., Zabala M., Linares C., Sala E., 2004. Temporal and spatial variability in settlement of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the NW Mediterranean. *Mar. Biol.* 144: 1011–1018.
- His E., Heywang I., Geffard O., De Montaudouin X., 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassay for toxicological studies. *Water Res* 33(7):1706–1718.

Holland N.D. and Holland L.Z., 1969. Annual cycles in germinal and non-germinal cell populations in the gonads of the sea urchin *Psammechinus microtuberculatus*. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*. 37: 394–404.

ICES, 1997. Report of the ICES Advisory Committee on the Marine Environment.

Ilesurum A., Balbi T., Vasapollo D., Cicognani A., Ghimenton C., 2006. Microwave Processing and Ethanol-Based Fixation in Forensic Pathology. *Am J Foren Med Path* 27 (2): 178-182.

ISPRA, 2011. Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre. *Manuli e Linee Guida* 67/2011, 141 pp.

ISPRA, 2013. Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti e acque interne salmastre. *Manuli e Linee Guida* 121/2015, 78 pp.

ISPRA, 2015. Criticità nel percorso di accreditamento dei saggi ecotossicologici. *Manuli e Linee Guida* 88/2013, 56 pp.

Ivlev V.S., 1961. Experimental ecology of the feeding of the fishes. Yale University Press 1961, New Haven.

Johnson C.H., Clapper D.L., Winkler M.M., Lee H.C., Epel D., 1983. A volatile inhibitor immobilizes sea urchin sperm in semen by depressing the intracellular pH. *Develop. Biology*. 98: 493-501.

Kawakami T., Tsushima M., Katabami Y., Mine M., Ishida A., Matsuno T., 1998. Effect of  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -echinenone, astaxanthin, fucoxanthin, vitamin A and vitamin E on the biological defense of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *J Exp Mar Biol Ecol* 226: 165–174.

Keegan B.F., Könnecker G., 1980. Aggregation in echinoderms on the West coast of Ireland. An ecological perspective. In: Jangoux M (ed.) *Echinoderms: present and past*. AA Balkema, Rotterdam, p. 199.

Kempf M., 1962. Recherches d'écologie comparée sur *Paracentrotus lividus* (Lmk.) et *Arbacia lixula* (L.). *Rec Trav Stat Mar Endoume* 25 (39): 47–116.

Kitching J.A., Ebling F.J., 1961. The ecology of Lough Ine. Cl. The control of algae by *Paracentrotus lividus* (Echinoidea). *J Anim Ecol* 30: 373–383.

Kitching J.A., Thain V.M., 1983. The ecological impact of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in Lough Ine, Ireland. *Phil Trans Roy Soc London B* 300: 513–552.

Khosrovyan A, Rodríguez-Romero A., Salamanca M.J., Del Valls T.A., Riba I., Serrano F., 2013. Comparative performances of eggs and embryos of sea urchin (*Paracentrotus lividus*) in toxicity bioassays used for assessment of marine sediment quality. *Mar. Poll. Bull.* 70: 204-209.

Knoepffler-Péguy M., Maggiore F., Boudouresque C.F., Dance C., 1987. Compte Rendus d'une expérience sur les préférences alimentaires de *Paracentrotus lividus* (Echinoidea) à Banyuls-sur-Mer. In *Colloque international sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles*, Boudouresque CF, eds., GIS Posidonie Publication 1987, Marseilles, pp. 59-64.

Knoepffler-Péguy M., Nattero M.J., 1996. Comportement de *Paracentrotus lividus* en présence de la souche de *Caulerpa taxifolia* du port de St Cyprien (Fr. Pyr. Or.) In *Second International workshop on Caulerpa taxifolia*, Ribera MA, Ballesteros E, Boudouresque CF, Gómez A & Gravez V, eds., Publ Univ Barcellona (Spain) 1996, pp. 309-314.

Kobayashi N. and Konaka K., 1971. Studies on periodicity of oogenesis of sea urchin I. Relation between the oogenesis and the appearance and disappearance of nutritive phagocytes detected by some histological means. *Sci. Eng. Rev. Doshisha Univ.* 12: 131–149.

- Kobayashi N., 1991. Marine pollution bioassay by using sea urchin eggs in the Tanabe Bay, Wakayama Prefecture, Japan, 1970–1987. *Mar. Poll. Bull.* 23: 709–713.
- Kobayashi N. and Okamura H., 2004. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects. *Chemosphere*. 55:1403–1412.
- Kozinkova L., Ennas C., Giuliani S., Pellegrini D., 2003. Valutazione della qualità dei gameti di *Paracentrotus lividus* (Lamarck) utilizzando  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  come tossico di riferimento su animali stabulati e non stabulati. *Biol Mar Medit* 10 (2): 1101–1104.
- Krinsky N.I., 1994. The biological properties of carotenoids. *Pure Appl Chem* 66: 1003–1010.
- Kurihara H., Shirayama Y., 2004. Effects of increased atmospheric  $\text{CO}_2$  on sea urchin early development. *Mar Ecol Prog Ser* 274: 161-169.
- Lamare M.D., Hoffman J., 2004. Natural variation of carotenoids in the eggs and gonads of the echinoid genus, *Strongylocentrotus*: implications for their role in ultraviolet radiation photoprotection. *J Exp Mar Biol Ecol* 312: 215–233.
- Lawrence J.M., McBride S.C., Plank L.R., Shpigel M., 2003. Ammonia tolerance of the sea urchins *Lytechinus variegatus*, *Arbacia punctulata*, *Strongylocentrotus franciscanus*, and *Paracentrotus lividus*. In: Féral JP, David B (eds) *Echinoderm research 2001*. AA Balkema, Lisse, pp 233–236.
- Lawrence J.M., Montoya R., McBride S.B., Harris L.G., 2004. Carotenoid concentrations and profiles in testes, ovaries and eggs of the sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Strongylocentrotus franciscanus* and *Lytechinus variegatus*. In: Lawrence JM, Guzmán O (eds) *Sea urchins: fisheries and ecology*. DEStech Publications, Lancaster, pp 173–178
- Le Gall P., Bucaille D., Dutot P., 1989. Résistance aux variations de salinité chez *Paracentrotus* et *Psammechinus*. *Vie Mar HS* 10: 83–84.
- Lee C.H., Ryu T.K., Choi J.W., 2004. Effects of water temperature on embryonic development in the northern Pacific asteroid, *Asterias amurensis*, from the southern coast of Korea. *Invertebr Reprod Dev* 45: 109-116.
- Lemée R., Boudouresque C.F, Gobert J., Malestroit P., Mari X., Meinesz A., Ménager V., Ruitton S., 1996. Feeding behaviour of *Paracentrotus lividus* et *Psammechinus miliaris*. In *Echinoderm research*, De Ridder C, Dubois P, Lahaye MC & Jangoux M, eds., AA Balkema Press 1996, Rotterdam, pp 183-188.
- Lera S. and Pellegrini D., 2006. Evaluation of the fertilization capability of *Paracentrotus lividus* sea urchin stored gametes by the exposure to different aqueous matrices. *Environ Monit Assess* 119: 1–13. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-005-9000-0>.
- Lera S., Macchia S., Pellegrini D., 2006. 'Standardizing the methodology of sperm cell test with *Paracentrotus lividus*. *Environ Monit Asses*: 122: 101-109.
- Lester G.E., Makus D.J., Hodges D.M., 2010. Relationship between fresh-packaged spinach leaves exposed to continuous light or dark and bioactive contents: effects of cultivar, leaf size, and storage duration. *J Agric Food Chem* 58(5): 2980–2987.
- Lizarazo K., Fernández-Marín B., Becerril J.M., García-Plazaola J.I., 2010. Ageing and irradiance enhance vitamin E content in green edible tissues from crop plants. *J Sci Food Agric* 90:1994–1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.4043>.
- Lorenzo J.I., Nieto O., Beiras R., 2002. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. *Aquat Toxicol* 58(1/2): 27-41.



Losso C., 2004. Valutazione dell'applicabilità all'ambiente lagunare e validazione di saggi tossicologici che utilizzano specie autoctone. Tesi di dottorato. Università Ca' Foscari di Venezia, Dipartimento di Scienze Ambientali.

Losso C., Arizzi Novelli A., Picone M., Volpi Ghirardini A., Ghetti P.F., Rudello D., Ugo P., 2004. Sulfide as a confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus*: comparisons with chemical analysis data. *Environ Toxicol Chem* 23(2): 396-401.

Losso C., Arizzi Novelli A., Picone M., Marchetto D., Pantani C., Ghetti P. F., Ghirardini A. V., 2007. Potential role of sulfide and ammonia as confounding factors in elutriate toxicity bioassays with early life stages of sea urchins and bivalves. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(2): 252–7.

Lozano J., Galera J., Lopez S., Turon X., Palacin C., Morera G., 1995. Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Mar Ecol Prog Ser* 122: 179-19.

Maggiore F., Berthon J.F., Boudouresque C.F., Lawrence J., 1987. Données préliminaires sur les relations entre *Paracentrotus lividus*, *Arbacia lixula* et le phytobenthos dans la baie de Port-Cros (Var, France, Méditerranée). In: Boudouresque CF (ed.) Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. GIS Posidonie, Marseille, pp 65–82.

McBride S.C., 2005. Sea Urchin Aquaculture. *American Fisheries Society Symposium* 46:179–208.

McCready S, Spyraakis G, Creely CR, Birch GF, Long ER. 2004. Toxicity of surficial sediments from Sydney harbour and vicinity, Australia. *Environ Monit Assess* 96:53–83. doi:10.1023/B:EMAS.0000031716.34645.71.

Mah S.A., Swanson W.J., Vacquier V.D.. 2005. Positive selection in the carbohydrate recognition domains of sea urchin sperm receptor for egg jelly (suREJ) proteins. *Mol. Biol. Evol.* 22(3): 533-341.

Manzo S., Schiavo S., Aleksí P., Tabaku A., 2014. Application of a toxicity test battery integrated index for a first screening of the ecotoxicological threat posed by ports and harbors in the Southern Adriatic Sea (Italy). *Environ. Monit. Assess.* 186: 7127–7139.

Martinell J., 1981. Actividad erosiva de *Paracentrotus lividus* (Lmk.) (Echinodermata, Echinoidea) en el litoral gerundense. *Oecol Aquat* 5: 219-225.

Martinez I., Garcia F.J., Sanchez A.I., Daza J.L., Del Castillo F., 2003. Biometric parameters and reproductive cycle of *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in three habitats of Southern Spain. In: Echinoderm research. Feral, J.P., David, B. (Eds.). AA Balkema, Lisse. 281–287.

Mastaller M., 1974. Zerstörung des Makrophytals an der nordadriatischen Küste durch intensives Abweiden durch Seeigel; eine Untersuchung über populationsstrukturen, nahrung und Fressverhalten bei dem Echinoiden *Paracentrotus lividus* (Lmrck). Dipl Arbeit, Zool Inst Univ München.

Matsuno T., Hirao S., 1989. Marine carotenoids. In: Ackman RG (ed.) *Marine biogenic lipids, fats, and oils*. Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 251–388.

Matsuno T., 1991. Xanthophylls as precursors of retinoids. *Pure Appl Chem* 63: 81–88.

Matsuno T., Tsushima M., 2001. Carotenoids in sea urchins. In: Lawrence JM (ed.) *Edible sea urchins: biology and ecology*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp 115–138.

- Matthiessen P., Bifield S., Jarret F., Kirby M.F., Law R.J., McMinn W.R., Sheahan D.A., Thain J.E., Whale G.F., 1998. An assessment of sediment toxicity in the river Tyne estuary, UK, by means of bioassays. *Mar Environ Res* 45: 1 – 15.
- Mazzella L., Buia M.C., Gambi M.C., Lorenti M., Russo G.F., Scipione M.B., Zupo V., 1992 Plant-animal relationship in the marine benthos. Oxford Science, Oxford, pp. 165-187.
- Mita M., Hino A., Yasumasu I., 1984. Effect of temperature on interaction between eggs and spermatozoa of sea urchin. *Biol Bull* 166: 68-77.
- Morrison G., Torello E., Comoleo R., Walsh R., Kuhn A., Burgess R., Tagliabue M., Greene W., 1989. Intralaboratory precision of saltwater short-term chronic toxicity tests. *J Water Poll Control Fed* 61: 1707–1710.
- Morroni L., 2011. Saggi biologici in situ con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* per lo studio della qualità ambientale delle acque marino-costiere. Tesi di laurea specialistica, corso di laurea in Biologia Marina presso la Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali, Università di Pisa. [<https://etd.adm.unipi.it/theses/available/etd-03282011-190223/>].
- Morroni L., 2016. Toxicological effects of metals on embryo development in sea urchin: applicative perspectives for ecotoxicological assessment criteria in harbor areas. Tesi di dottorato in scienze, 14° ciclo, curriculum Biologia ed Ecologia Marina presso l'Università Politecnica delle Marche.
- Morroni L., Pinsino A., Pellegrini D., Regoli F., Matranga V., 2016. Development of a new integrative toxicity index based on an improvement of the sea urchin embryo toxicity test. *Ecotoxicol Environ Saf.* 123: 2-7.
- Morroni L., Giuliani S., Pellegrini D., Sartori D., 2018a. In situ embryo toxicity test with sea urchin: Development of exposure chamber for test execution. *Chemosphere.* 196: 354–360.
- Morroni L., Pinsino A., Pellegrini D., Regoli F., 2018b. Reversibility of metal induced malformations in sea urchin embryos. *Ecotoxicol Environ Saf* 148C: 923-929.
- Mortensen T., 1943. A monograph of the Echinoidea, III.3 Camarodonta. II. Echinidae, Strongylocentrotidae, Paraseleniidae, Echinometridae. CA Reitzel, Copenhagen.
- Nacci D., Jackim E., Walsh R., 1986. Comparative evaluation of three rapid marine toxicity tests: sea urchin early embryo growth test, sea urchin sperm cell toxicity test and Microtox. *Environ Toxicol Chem* 5: 521 – 525.
- Nédélec H., 1982. Ethologie alimentaire de *Paracentrotus lividus* dans le baie de Galeria [Corse] et son impact sur les peuplements phytobenthiques. Thèse Doct 3° cycle, Univ Aix-Marseille 2.
- Neefs Y., 1937. Sur divers cas d'hermaphrodisme fonctionnel chez l'oursin *Strongylocentrotus lividus*. *CR. Acad. Sci. Paris.* 204 [11]: 901–902.
- Negri A.P., Marshall P.A., Heyward A.J., 2007. Differing effects of thermal stress on coral fertilization and early embryogenesis in four Indo Pacific species. *Coral Reefs* 26: 759-763.
- Neill S.R.S.J., Larkum H., 1966. Ecology of some echinoderms in Maltese waters. In: Lythgoe JN, Woods JD (eds) Symposium underwater association. Underwater Ass, Malta, pp 51–55.
- Neill F.X., Pastor R., 1973. Relaciones tróficas de *Paracentrotus lividus* [Lmk.] en la zona litoral. *Invest Pesq* 37 [1]: 1–7.
- Norberg-King T. J., 2005. Toxicity reduction and toxicity identification evaluations for effluents, ambient waters, and other aqueous media. Setac, ISBN: 1880611643.

O'Connor C., Mulley J.C., 1977. Temperature effects on periodicity and embryology, with observations on the population genetics, of the aquacultural echinoid *Heliocidaris tuberculata*. *Aquaculture* 12: 99-114.

Odile F., Boudouresque C.F., Knoepffler-Péguy M., 1988. Etude expérimentale des preferenda alimentaires de *Paracentrotus lividus* (Echinoidea). In: Régis MB (ed.) Actes du 6<sup>e</sup> Séminaire international sur les Echinodermes, Ile des Embiez (Var - France), p 85.

Okada Y., lwata K.S., Yanagihara M., 1984. Synchronized rhythmic contractions among five gonadal lobes in the shedding sea urchin: coordinative function of the aboral nerve ring. *Biol. Bull.* 166: 228-236.

Okada Y. and lwata K.S., 1985. A substance inhibiting rhythmic contraction of the gonad in the shedding sea urchin. *Zool. Sci.* 2: 805-808.

Onorati F. and Volpi Ghirardini A., 2001. Informazioni fornite dalle diverse matrici da testare con i saggi biologici: applicabilità di *Vibrio fischeri*. *Biol. Mar. Mediterr.*, 8(2): 31-40.

Oselladore F., Antonini C., Cornello M., Boscocolo Brusá R., 2012. Sperimentazione preliminare di fissativi alternativi alla formalina per la conservazione di campioni di macrozoobenthos marino. *Biol Mar Mediterr* 19 (1): 184-185.

Ouréns R., Fernández L., Freire J., 2011. Geographic, population, and seasonal patterns in the reproductive parameters of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Mar. Biol.* 158: 793-804.

Pagano G., Cipollaro M., Corsale G., Esposito A., Ragucci E., Giordano G.G., Trieff N.M., 1985. Comparative toxicities of chlorinated biphenyls on sea urchin egg fertilization and embryogenesis. *Mar Environ Res* 17: 240-244.

Pagano G., Cipollaro M., Corsale G., Esposito A., Giordano G.G., Ragucci E., Trieff N.M., 1988. Comparative toxicities of benzene, chlorobenzene and dichlorobenzene to sea urchin embryos and sperm. *Bull Environ Contam Toxicol* 40: 481-488.

Pagano G., Anselmi B., Dinnel P.A., Esposito A., Guida M., Iaccarino M., Melluso G., Pascale M., Trieff N.M., 1993. Effects on sea urchin fertilization and embryogenesis of water and sediment from two rivers in Campania, Italy. *Arch Environ Contam Toxicol* 25: 20-26.

Pagano G., Korkina L.G., Iaccarino M., De Biase A., Deeva I.B., Doronin Y.K., Guida M., Melluso G., Meriç S., Oral R., Trieff N.M., Warnau M., 2001. Developmental, cytogenetic and biochemical effects of spiked or environmentally polluted sediments in sea urchin bioassays. In: Garrigues P, Walker CH, Barth H (Eds). *Biomarkers in Marine Ecosystems: A Practical Approach*. Elsevier, Amsterdam.

Pagano G., Thomas P., Guida M., Palumbo A., Romano G., Oral R., Trifuoggi M., 2017. Sea Urchin Bioassays in Toxicity Testing: II. Sediment Evaluation. *Expert Opin Environ Biol*, 6:1.

Palacin C., Giribert G., Turon X., 1997. Patch recolonization through migration by the echinoid *Paracentrotus lividus* in communities with high algal cover and low echinoid densities. *Cah Biol Mar* 38: 267-271.

Pastor R., 1971. Distribución del erizo de mar, *Paracentrotus lividus* (Lmk), en la Ría de Vigo. *Publ Técn Dir Gen Pesca Marít, Spain* 9: 255-270.

Phillips B.M., Nicely P.A., Hunt J.W., Anderson B.S., Tjeerdema R.S., Palmer S.E., Palmer F.H., Puckett H.M., 2003. Toxicity of cadmium-copper-nickel-zinc mixtures to larval purple sea urchins. *Bull Environ Contam Toxicol* 70: 592-599.

Picone M., Bergamin M., Losso C., Delaney E., Arizzi Novelli A. and A. Volpi Ghirardini, 2016. Assessment of sediment toxicity in the Lagoon of Venice (Italy) using a multi-species set of bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 123: 32-44 [ISSN 0147-6513].

Pieroni M., Falugi C., 1992. Effects of cholinergic drugs on cell interactions during fertilization and early development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Boll Soc It Biol Sper* 68: 16-22.

Pinto B., Pellegrini D., Gabellini M., Ausili A., 1995. Harbour and coastal sediments chemistry and toxicology: a preliminary study in dredging activities. *J Aquat Ecosyst Health* 4: 1-17.

Piva F., Ciaprini F., Onorati F., Benedetti M., Fattorini D., Ausili A., Regoli F., 2011. Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: A practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere*, 83: 475-485.

Powis de Tenbossche T., 1978. Comportement alimentaire et structures digestives de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata - Echinoidea). Mém Licence Sci biol, Univ libre Bruxelles.

Régis M.B., 1978. Croissance de deux échinoïdes du golfe de Marseille (*Paracentrotus lividus* [Lmk] et *Arbacia lixula* L.). Aspects écologiques de la microstructure du squelette et de l'évolution des indices physiologiques. Thèse Doct Sci, Univ Aix-Marseille 3.

Régis M.B., 1979. Analyse des fluctuations des indices physiologiques chez deux échinoïdes (*Paracentrotus lividus* Lmk et *Arbacia lixula* L.) du golfe de Marseille. *Tethys*. 9 (2): 167 - 181.

REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 353/1 del 31.12. 2008.

REGOLAMENTO (UE) N. 605/2014 DELLA COMMISSIONE del 5 giugno 2014 recante modifica, ai fini dell'introduzione di indicazioni di pericolo e consigli di prudenza in croato e dell'adeguamento al progresso tecnico e scientifico, del regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 167/36 del 6.6.2014.

Richner H., Milinski M., 2000. On the functional significance of masking behaviour in sea urchins - an experiment with *Paracentrotus lividus*. *Mar Ecol Progr Ser* 205: 307 - 308

Rico V., 1989. Contribution à l'étude des preferenda alimentaires et du comportement moteur de l'oursin régulier *Paracentrotus lividus*. Dipl Études Approf en Océanogr, Univ Aix-Marseille 2.

Ruiz-Fernández J.M., 2000. Respusta de la fanerógama marina *Posidonia oceanica* (L.) Delle a perturbaciones antrópicas. Tesis Biología Univ Murcia, Spain.

Rupp J.H., 1973. Effects of temperature on fertilization and early cleavage of some tropical echinoderms, with emphasis on *Echinometra mathaei*. *Mar Biol* 23, 183-189.

Russo R.C., Smith C. E., Thurston R.V., 1974. Acute Toxicity of Nitrite to Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) *J. Fish. Bd Can.* 31 (10), 1653-1655, 10.1139/f74-208

Russo R., Bonaventura R., Zito F., Schröder H.C., Müller I., Müller W.E.G., Matranga V., 2003. Stress to cadmium monitored by metallothionein gene induction in *Paracentrotus lividus* embryos. *Cell Stress & Chaperones* 8: 232-241.

- Saco-Álvarez L., Durán I., Lorenzo J.I. and Beiras R., 2010. Methodological basis for the optimization of marine sea-urchin embryo test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. *Ecotoxicology and Environmental Safety* *Ecotoxicol Environ Safety*, 73: 491 – 499.
- Salamanca M.J., Fernández N., Cesar A., Antòn N., Lopez P., Del Valls T.A., 2009. Improved sea-urchin embryo bioassay for in situ evaluation of dredged material. *Ecotoxicology*. 18: 1051–1057.
- San Martín G.A., 1987. Comportement alimentaire de *Paracentrotus lividus* (Lmk) [Echinodermata: Echinidae] dans l'étang de Thau (Hérault, France). In: Boudouresque CF (ed.) Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. GIS Posidonie, Marseilles, pp 37–57.
- San Martín G.A., 1995. Contribution à la gestion des stocks d'oursins: etude des populations et transplantations de *Paracentrotus lividus* à Marseille (France, Méditerranée) et production de *Loxechinus albus* à Chiloe (Chili, Pacifique). Ph. D. Thesis, Université d'Aix – Marseille, 166 pp.
- Sanchez-Espana A.I., Martinez-Pita I., Garcia F.J., 2004. Gonadal growth and reproduction in the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) [Echinodermata: Echinoidea] from souther Spain. *Hydrobiologia* 519: 61–72.
- Sartori D., 2013. Echinocultura: allevamento di *Paracentrotus lividus* a circuito chiuso. Sperimentazioni di diete artificiali per la maturazione sessuale. Ph. D. Thesis, Università degli Studi di Napoli « Federico II », 77 pp.
- Sartori D., Gaion A., 2015. Can sea urchins benefit from an artificial diet? Physiological and histological assessment for echinoculture feasibility Evaluation. *Aquac. Nutr.* <http://dx.doi.org/10.1111/anu.12326>.
- Sartori D., Scuderi A., Sansone G., Gaion A., 2015. Echinoculture: the rearing of *Paracentrotus lividus* in a recirculating aquaculture system—experiments of artificial diets for the maintenance of sexual maturation. *Aquacult Int* 23: 111-125.
- Sartori D., Pellegrini D., Macchia S., Gaion A., 2016a. Can echinoculture be a feasible and effective activity? Analysis of fast reliable breeding conditions to promote gonadal growth and sexual maturation in *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture* 451: 39-46.
- Sartori, D., Pellegrini, D., Gaion, A., 2016b. Analysis of variability in Embryological response of two sea urchin species to spatial and temporal features-can these factors influence responses in standardized Ecotoxicological assays? *Expert Opin. Environ. Biol.* <https://doi.org/10.4172/2325-9655.S1-002>. S1.
- Schlosser S.C., Lupatsch I., Lawrence J.M., Lawrence A.L., Shpigel M., 2005. Protein and energy digestibility and gonad development of the European sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) fed algal and prepared diets during spring and fall. *Aquac Res* 36: 972-982.
- Schröder H.C., Di Bella G., Janipour N., Bonaventura R., Russo R., Müller W.E.G., Matranga V., 2005. DNA damage and developmental defects after exposure to UV and heavy metals in sea urchin cells and embryos compared to other invertebrates. *Prog Mol Subcell Biol* 39: 111-37.
- Sewell M.A., Young C.M., 1999. Temperature limits to fertilization and early development in the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*. *J Exp Mar Biol Ecol* 236: 291-305.
- Shepherd S.A., 1987. Grazing by the sea-urchin *Paracentrotus lividus* in Posidonia beds at Banyuls, France. In: Boudouresque CF (ed.) Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. GIS Posidonie, Marseilles, pp 83–96.

Shina A., Gross J., Lifshitz A., 1978. Carotenoids of the invertebrates of the red sea (Eilat shore)- II. Carotenoid pigments in the gonads of the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Echinodermata). *Comp Biochem Physiol* 61B: 123-128

Shpigel M., McBride S.C., Marciano S., Lupatsch I., 2004. The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of the European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*. 232: 343-355.

Spinelli G. and Albanese I., 1990. Echinodermata: Molecular and Cellular Biology of the sea urchin embryo. In *Reproductive Biology of invertebrates*. Adiyodi K.G., Adiyodi R. (Eds.). John Wiley & sons. 283-391.

Spirlet C., Grosjean P., Jangoux M., 1998. Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus*: analysis by means of maturity index. *Invert. Reprod. Develop.* 34(1): 69-81.

Spirlet C., Grosjean P., Jangoux M., 2001. Cultivation of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) on extruded feeds: digestive efficiency, somatic and gonadal growth. *Aquacult Nutr* 7: 91-99.

Stanta G., Pozzi Mucelli S., Petrera F., Bonin S., Bussolati G., 2006. A Novel Fixative Improves Opportunities of Nucleic Acids and Proteomic Analysis in Human Archive's Tissues. *Diagn Mol Pathol* 15 (2): 115-123.

Takahashi N., Sato N., Ohtomo N., Kondo A., Takahashi M., Kikuchi K., 1990. Analysis of the contraction inducing factor for gonadal smooth muscle contraction in sea urchin. *Zool. Sci.* 7: 861-869.

Takahashi N., Sato N., Hayakawa Y., Takahashi M., Miyake H., Kikuchi K., 1991. Active component of the contraction factor on smooth muscle contraction of the gonad wall in sea urchin. *Zool. Sci.* 8: 207-210.

Tomas F., Romero J., Turon X., 2004. Settlement and recruitment of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in two contrasting habitats in the Mediterranean. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 282: 173-184.

Tortonese E., 1965. *Fauna d'Italia; Echinodermata*. Edizioni Calderini, pp. 422. Bologna.

Traer K., 1980. The consumption of *Posidonia oceanica* Delile by Echinoids at the Isle of Ischia. In *Echinoderms: present and past*, Jangoux M, eds., AA Balkema Press 1980, Rotterdam, pp. 241-244.

Tsushima M., Kawakami T., Mine M., Matsuno T., 1997. The role of carotenoids in the development of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Invert Reprod Develop* 32: 149-153.

UNI ISO 7870-1, 2014a. Carte di controllo - Parte 1: Linee guida generali.

UNI ISO 7870-2, 2014b. Carte di controllo - Parte 2: Carte di controllo di Shewart.

UNI ISO 7870-3, 2014c. Carte di controllo - Parte 3: Carte di controllo per accettazione.

UNI ISO 7870-4, 2014d. Carte di controllo - Parte 4: Carte a somme cumulate.

UNI ISO 7870-5, 2014e. Carte di controllo - Parte 5: Carte di controllo speciali.

Unuma T., Nakamura A., Yamano K., Yokota Y., 2010. The sea urchin major yolk protein is synthesized mainly in the gut inner epithelium and the gonadal nutritive phagocytes before and during gametogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 77(1): 59-68.

- Uriz M.J., Turon X., Becerro M.A., Galera J., 1996. Feeding deterrence in sponges. The role of toxicity, physical defense, energetic contents, and life-history stages. *J Exp Mar Biol Ecol* 205: 187-204.
- USACE, 2003. "Evaluation of dredged material proposed for disposal at island, nearshore, or upland confined disposal facilities - Testing Manual," Technical Report ERDC/EL TR-03-1, U.S. Army Engineer Research and Development Center, Vicksburg, MS.
- USEPA, 1994. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. Klemm D.J., Morrison G.E., Norberg-Ring J.J., Peltier W.H., Heber M.A., U.S. Environmental Protection Agency. Report EPA-600/4-91/003, Cincinnati, OH : 483 pp.
- USEPA, 2001. Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual. EPA 823-B-01-002. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC.
- USEPA/USACE, 1991. Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal: Testing manual. EPA-503/8-91/001, Office of Water, Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS.
- Verlaque M., 1987a. Relations entre *Paracentrotus lividus* (Lamarck) et le phytobenthos de Méditerranée occidentale. In: Boudouresque CF (ed.) Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. GIS Posidonie, Marseille, pp 5-36.
- Verlaque M., 1987b. Contribution à l'étude du phytobenthos d'un écosystème photophile thermophile marin en Méditerranée occidentale. Etude structurale et dynamique du phytobenthos et analyse des relations faune-flore. Thèse Doct, Univ Aix-Marseille 2.
- Verlaque M., Nédélec H., 1983a. Relations entre *Paracentrotus lividus* (Lamarck) et le phytobenthos de Méditerranée occidentale. In Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles, Boudouresque CF, eds., GIS Posidonie Publication, Marseille, pp. 5-36.
- Verlaque M., Nédélec H., 1983b. Biologie de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) sur substrat rocheux en Corse (Méditerranée, France): alimentation des adultes. *Vie Milieu* 33 (3-4): 191-201.
- Verlaque M., 1984. Biologie des juvéniles de l'oursin herbivore *Paracentrotus lividus* (Lamarck): sélectivité du broutage et impact de l'espèce sur les communautés algales de substrat rocheux en Corse (Méditerranée, France). *Bot Mar* 27 (9): 401-424.
- Verling E., Crook A.C., Barnes D.K.A., 2002. Covering behaviour in *Paracentrotus lividus*: is light important? *Mar Biol* 140: 391-396.
- Volpi Ghirardini A., Birkemeyer T., Arizzi Novelli A., Pavoni B., Ghetti P.F., 1999. An integrated approach to sediment quality assessment: the Venice lagoon as a case study. *Aquatic Ecosyst Health* 2: 435-447.
- Volpi Ghirardini A. and Arizzi Novelli A., 2001. A sperm cell toxicity test procedure for the Mediterranean species *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Environ Technol* 22: 439-445.
- Volpi Ghirardini A., Arizzi Novelli A., Losso C., Ghetti PF., 2003. Sea urchin toxicity bioassays for sediment quality assessment in the Lagoon of Venice (Italy). *Chem Ecol* 19(2-3): 99-111.
- Volpi Ghirardini A., Arizzi Novelli A., Tagliapietra D., 2005a. Sediment toxicity assessment in the Lagoon of Venice (Italy) using *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fertilization and embryo bioassays. *Environ Int* 31: 1065-1077.

Volpi Ghirardini A., Arizzi Novelli A., Losso C., Ghetti P.F., 2005b. Sperm cell and embryo toxicity tests using the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk) In: Techniques in Aquatic Toxicology, vol.II, Cap. 8, G.Ostrander (Ed) CRC press. pp. 147-168.

Walker C.W., Harrington L.M., Lesser M.P., Fagerberg W.R., 2005. Nutritive phagocyte incubation chambers provide a structural and nutritive microenvironment for germ cells of *Strongylocentrotus droebachiensis*, the green sea urchin. Biol. Bull. 209(1): 31–48.

Walker C.W., Unuma T., Lesser M. P., 2007. Gametogenesis and reproduction of sea urchins. Dev Aquac Fish Sci, 37: 11 - 33.

Walker C.W., Lesser M..P., Unuma T., 2013. Sea urchin gametogenesis - Structural, functional and molecular/genomic biology. Developments in Aquaculture and Fisheries Science Volume 38: 25-43.

Wharfe J., Adams W., Apitz S.E., Barra R., Bridges T.S., Hickey C., Irelan, S., 2007. In situ methods of measurement an important line of evidence in the environmental risk framework. Integr. Environ. Assess. Manage. 3:268–274.

Whitaker H.R., Steinhart, R.A., 1985. Ionic signaling in the sea urchin egg at fertilization. In: Biology of fertilization. C.M. Metz and A. Monroy (Eds.). Academic press, Orlando, pp 167-221.

Zavodnik D., 1980. Distribution of Echinodermata in the north Adriatic insular region. Acta Adriat 21 (2): 437-468.

Zavodnik D., 1987. Synopsis of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in the Adriatic Sea. In: Boudouresque CF (ed.) Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. GIS Posidonie, Marseilles, pp 221–240.

Zupi V., Fresi E., 1984. A study of the food web of the *Posidonia oceanica* ecosystem: analysis of the gut contents of echinoderms. In International workshop on *Posidonia oceanica* beds, Boudouresque CF, Jeudy de Grissac A & Olivier J, eds., GIS Posidonie Publication 1984, Marseille, pp. 373-379.



## APPENDICE 1 - Conteggio dello sperma

Per la conta dei gameti è consigliato l'impiego di una Camera di Thoma a doppio reticolo.

La base piatta dello speciale vetro ottico possiede la medesima dimensione della slitta del microscopio.

La camera presenta due set di reticoli incisi per il conteggio, separati da un canale, la cui profondità è di 0,1 mm, per cui, quando un vetrino coprioggetto è posto al di sopra, rimane uno spazio di 0,1 mm tra il vetro e la camera centrale. Ogni reticolo presenta 16 campi quadrati con lato di 0,2 mm, a sua volta divisi in 16 mini-quadrati con area di 0,0025 mm<sup>2</sup> (Fig. 9).

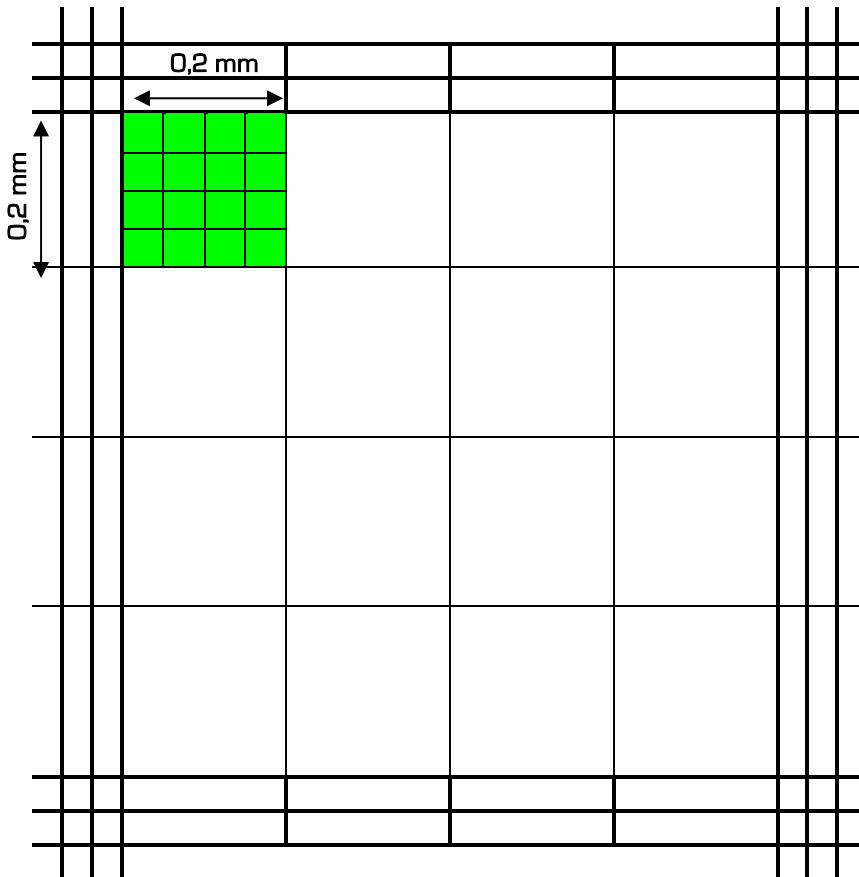


Figura 9: Rappresentazione schematica di un campo del reticolo della camera di Thoma

Per la fase di conta dei gameti procedere come segue:

- diluire 0,05 ml (50  $\mu$ l) di sperma concentrato in 24,95 ml di acqua dolce (FD 1:500) in un cilindro;
- porre una goccia della sospensione lungo il bordo del vetrino superiore della camera di conta, in modo tale che la sospensione spermatica diffonda all'interno per capillarità;

- attendere circa 15 minuti (meglio se a 4° C) per consentire alle cellule di sedimentare;
- effettuare il conteggio mediante microscopio ottico (obiettivo 40x) degli spermatozoi presenti in 5 campi e determinarne il valore medio per campo.

Poiché il volume di ogni campo risulta essere pari a:

$$[V] = 0.2 * 0.2 * 0.1 = 0.004 = 4 * 10^{-3} \text{ mm}^3$$

il numero di spermatozoi/mm<sup>3</sup> sarà dato dal seguente calcolo:

$$N^{\circ} \text{ spermatozoi in } 1 \text{ mm}^3 [x] = (M \times 1) / (V)$$

dove

- ✓ M è la media di spermatozoi per campo;
- ✓ V è il volume di un singolo campo del reticolo della camera di Thoma.

Il numero di spermatozoi nella soluzione di partenza viene pertanto così determinato:

$$N^{\circ} \text{ spermatozoi nella soluzione di partenza } [Y] = x \times 1.000 \times \text{FD}$$

dove

- ✓ x è il numero di spermatozoi nella soluzione di partenza;
- ✓ FD è il fattore di diluizione (nel caso specifico FD = 500).

Il fattore di diluizione da utilizzare per preparare una sospensione spermatica con rapporto sperma uovo 15.000:1 viene determinata dalla seguente formula:

$$\text{Fattore diluizione sperma (FD)} = Y / (15 \times 10^6) \times 0,1$$

dove

- ✓ 15x10<sup>6</sup> è il numero di spermatozoi da introdurre in ciascuna camera test in modo tale che il rapporto finale sperma/uova sia 15.000:1;
- ✓ 0,1 = 0,1 ml di soluzione finale di sperma da introdurre in ciascuna provetta.

## APPENDICE 2 – Anomalie nello sviluppo di *Paracentrotus lividus*

Vengono di seguito illustrati alcuni esempi delle principali anomalie che è possibile riscontrare nella lettura del saggio di sviluppo embrionale con *P. lividus* (Fig. 10).



Figura 10: Anomalie e malformazioni embrionali: A: uovo fecondato; B-F: embrioni anormali con ritardo nello sviluppo [B: morula; C: gastrula precoce; D: gastrula tardiva; E: Prisma; F: pluteo precoce]; G-M: Embrioni anormali con malformazioni [G: morula malformata; H: Blastula malformata con blastocele pieno di cellule; I: Blastula con mesenchima malformata; L: pluteo malformato con anomalia delle braccia e spicole incrociate all'apice; M: pluteo malformato con spicole separate all'apice]; N: Pluteo normoformato. (Morrioni et al., 2016, 2018b)

## APPENDICE 3 – Concentrazione di Ammoniaca indissociata (NH<sub>3</sub>) in soluzione acquosa

Tabella 1: Percentuale di ammoniaca non ionizzata in soluzione acquosa: temperatura 15-26 °C, pH 6,0-8,9

Tabella fornita da Teresa Norberg-King, Environmental Research Laboratory, Duluth, Minnesota. Si veda anche Emerson et al. (1975), Thurston et al. (1974) e Norberg-King T. J. (2005).

pH	T (°C)											
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
6,00	0,0274	0,0295	0,0318	0,0343	0,0369	0,0397	0,0427	0,0459	0,0493	0,0530	0,0568	0,0610
6,10	0,0345	0,0372	0,0400	0,0431	0,0464	0,0500	0,0537	0,0578	0,0621	0,0667	0,0716	0,0768
6,20	0,0434	0,0468	0,0504	0,0543	0,0584	0,0629	0,0676	0,0727	0,0781	0,0901	0,0901	0,0966
6,30	0,0546	0,0589	0,0634	0,0683	0,0736	0,0792	0,0851	0,0915	0,0983	0,1134	0,1134	0,1216
6,40	0,0687	0,0741	0,0799	0,0860	0,0926	0,0996	0,107	0,115	0,124	0,133	0,143	0,153
6,50	0,0865	0,0933	0,1005	0,1083	0,1166	0,1254	0,135	0,145	0,156	0,167	0,180	0,193
6,60	0,109	0,117	0,127	0,136	0,147	0,158	0,170	0,182	0,196	0,210	0,226	0,242
6,70	0,137	0,148	0,159	0,171	0,185	0,199	0,214	0,230	0,247	0,265	0,284	0,305
6,80	0,172	0,186	0,200	0,216	0,232	0,250	0,269	0,289	0,310	0,333	0,358	0,384
6,90	0,217	0,234	0,252	0,271	0,292	0,314	0,338	0,363	0,390	0,419	0,450	0,482
7,00	0,273	0,294	0,317	0,342	0,368	0,396	0,425	0,457	0,491	0,527	0,566	0,607
7,10	0,343	0,370	0,399	0,430	0,462	0,497	0,535	0,575	0,617	0,663	0,711	0,762
7,20	0,432	0,466	0,502	0,540	0,581	0,625	0,672	0,722	0,776	0,833	0,893	0,958
7,30	0,543	0,586	0,631	0,679	0,731	0,786	0,845	0,908	0,975	1,05	1,12	1,20
7,40	0,683	0,736	0,793	0,854	0,918	0,988	1,061	1,140	1,224	1,31	1,41	1,51
7,50	0,858	0,925	0,996	1,07	1,15	1,24	1,33	1,43	1,54	1,65	1,77	1,89
7,60	1,08	1,16	1,25	1,35	1,45	1,56	1,67	1,80	1,93	2,07	2,21	2,37
7,70	1,35	1,46	1,57	1,69	1,82	1,95	2,10	2,25	2,41	2,59	2,77	2,97
7,80	1,70	1,83	1,97	2,12	2,28	2,44	2,62	2,82	3,02	3,24	3,46	3,71
7,90	2,13	2,29	2,46	2,65	2,85	3,06	3,28	3,52	3,77	4,04	4,32	4,62
8,00	2,66	2,87	3,08	3,31	3,56	3,82	4,10	4,39	4,70	5,03	5,38	5,75
8,10	3,33	3,58	3,85	4,14	4,44	4,76	5,10	5,46	5,85	6,25	6,68	7,14
8,20	4,16	4,47	4,80	5,15	5,52	5,92	6,34	6,78	7,25	7,75	8,27	8,82
8,30	5,18	5,56	5,97	6,40	6,86	7,34	7,85	8,39	8,96	9,56	10,2	10,9
8,40	6,43	6,90	7,40	7,93	8,48	9,07	9,69	10,3	11,0	11,7	12,5	13,3
8,50	7,97	8,54	9,14	9,78	10,45	11,16	11,90	12,7	13,5	14,4	15,2	16,2
8,60	9,83	10,5	11,2	12,0	12,8	13,6	14,5	15,5	16,4	17,4	18,5	19,5
8,70	12,07	12,9	13,8	14,7	15,6	16,6	17,6	18,7	19,8	21,0	22,2	23,4
8,80	14,7	15,7	16,7	17,8	18,9	20,0	21,2	22,5	23,7	25,1	26,4	27,8
8,90	17,9	19,0	20,2	21,4	22,7	24,0	25,3	26,7	28,2	29,6	31,1	32,6

