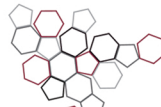
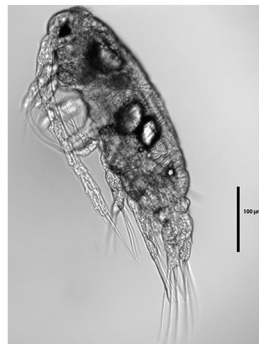
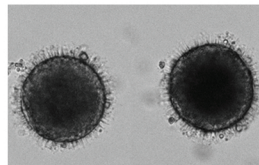




**ISPRA**  
Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale



**Sistema Nazionale  
per la Protezione  
dell'Ambiente**



# SAGGIO DI SVILUPPO LARVALE IN PRESENZA DI SEDIMENTO CON IL COPEPODE CALANOIDE PLANCTONICO *ACARTIA TONSA* (DANA, 1848)

Quaderni di Ecotossicologia

**RICERCA MARINA**



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale  
per la Protezione  
dell'Ambiente

**SAGGIO DI SVILUPPO LARVALE  
IN PRESENZA DI SEDIMENTO  
CON IL COPEPODE CALANOIDE  
PLANCTONICO *ACARTIA TONSA*  
(DANA, 1848)  
Quaderni di Ecotossicologia**

## **Informazioni legali**

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), insieme alle 21 Agenzie Regionali (ARPA) e Provinciali (APPA) per la protezione dell'ambiente, a partire dal 14 gennaio 2017 fa parte del Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell'Ambiente (SNPA), istituito con la Legge 28 giugno 2016, n.132.

Le persone che agiscono per conto dell'Istituto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo quaderno.

**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 13/2019

ISBN 978-88-448-0965-2

Riproduzione autorizzata citando la fonte

## **Elaborazione grafica**

ISPRA

*Realizzazione grafica a cura di:* Alessia Marinelli su progetto grafico di Silvia Giuliani

*Foto di copertina:* Silvia Giuliani

*Referenze fotografiche:* Valentina Vitiello, Isabella Buttino, Silvia Giuliani.

## **Coordinamento pubblicazione on line:**

Daria Mazzella  
ISPRA – Area comunicazione

**Autori:**

Isabella BUTTINO (ISPRA, CN-COS)  
Valentina VITIELLO (ISPRA, CN-COS)  
Simona MACCHIA (ISPRA, CN-COS)  
David PELLEGRINI (ISPRA, CN-COS)  
Gessica GORBI (Università degli Studi di Parma)

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

Fulvio Onorati (ISPRA, CN-LAB)  
Tristano Leoni (ARPA Marche)  
Marco Picone (Università Ca' Foscari di Venezia)

**Da citare come:**

Buttino I., Vitiello V., Macchia S., Pellegrini D., Gorbi G., 2019. Saggio di sviluppo larvale in presenza di sedimento con il copepode calanoide planctonico *Acartia tonsa* (Dana, 1848). Quaderni di Ecotossicologia. ISPRA, Quaderni - Ricerca Marina n. 13/2019.

## 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 dei copepodi</i>	p. 10
1.1.2 <i>Distribuzione e habitat di Acartia tonsa</i>	p. 15
1.1.3 <i>Abitudini alimentari</i>	p. 15
1.1.4 <i>Riproduzione e sviluppo embrionale</i>	p. 15
1.2 Utilizzo di <i>Acartia tonsa</i> in ecotossicologia	p. 18
1.3 Campionamento e sorting degli organismi	p. 19
1.4 Allevamento di <i>Acartia tonsa</i> in laboratorio	p. 19
<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
3.2 Soluzioni e terreni di coltura	p. 24
3.3 Strumentazione	p. 24
3.4 Materiali	p. 25
<b>4. Protocollo metodologico</b>	<b>p. 26</b>
4.1 Allestimento del test	p. 26
4.2 Fasi preparatorie	p. 26
4.2.1 <i>Allestimento della coltura algale</i>	p. 26
4.2.2 <i>Allestimento delle camere test con sedimento</i>	p. 26
4.2.3 <i>Raccolta delle uova di A. tonsa</i>	p. 26
4.3 Prova con composto chimico di riferimento in fase liquida (LDR-L)	p. 31
4.4 Valutazione della percentuale di schiusa	p. 33
4.5 Esecuzione del test LDR-S	p. 34
4.6 Parametri da monitorare	p. 34
4.7 Termine del test	p. 35
4.8 Lettura del test	p. 35
4.9 Elaborazione dei dati	p. 36

4.10 Parametri di validazione del test p. 36

BIBLIOGRAFIA p. 37

APPENDICE 1 - Panoramica sulle condizioni di allevamento reperite in p. 44  
bibliografia

## PRESENTAZIONE

di *Maurizio Ferla (Centro Nazionale Coste), Fulvio Onorati e Stefania Balzamo (Centro Nazionale Laboratori)*

---

Grazie alle collaborazioni di ISPRA con il mondo scientifico sta crescendo l'attenzione e l'importanza delle analisi ecotossicologiche per la valutazione degli effetti sugli organismi viventi dovuti alla presenza di miscele complesse di agenti inquinanti nelle matrici ambientali, riconducibili alle diverse attività antropiche.

L'utilizzo sempre più frequente di questa "linea di evidenza" ha determinato un progressivo inserimento dei saggi ecotossicologici nel contesto normativo nazionale, tanto che attualmente hanno assunto un ruolo chiave nella valutazione della qualità dei comparti ambientali, come nei casi del DM 173/16, che disciplina l'autorizzazione alla immersione deliberata in mare dei sedimenti portuali, e del DD 8 Giugno 2016, che stabilisce una metodologia per la stima del pericolo ambientale finalizzata alla deperimetrazione dei SIN. A ciò si deve aggiungere la produzione della manualistica ISPRA sull'utilizzo di batterie di saggi biologici (Manuali e Linee Guida n. 67 del 2011 e n. 88 del 2013).

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.

All'interno di ISPRA, e più in generale di SNPA, l'interazione sinergica e funzionale tra CN-LAB e CN-COS, ha portato nel 2017 alla pubblicazione di un primo Quaderno di Ecotossicologia: "Saggio di fecondazione e saggio di sviluppo embrionale con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea)", (Quaderni di Ecotossicologia 11/2017) ed oggi il secondo quaderno sul crostaceo copepode *Acartia tonsa*, quali proposte metodologiche per un impiego sempre più uniforme dei metodi ecotossicologici. Analogamente al primo quaderno anche il presente trova una sua specifica applicazione nella valutazione del pericolo ecotossicologico dei sedimenti marini, comparto ambientale di accumulo dei principali inquinanti presenti nelle acque, ma, a differenza del primo, trova una sua peculiare applicazione nelle prove "in presenza" di sedimento, che ne determina un utilizzo specifico per la valutazione qualitativa degli effetti biologici di quella frazione di contaminanti maggiormente legata alle "particelle solide".

Il presente Quaderno costituisce quindi un utile riferimento per il protocollo metodologico in esso riportato, risponde ad una esigenza raccolta nel paese e sta alla base anche di futuri esercizi di interconfronto che verranno comunque promossi.

## PREMESSA

---

Il protocollo per il saggio biologico di sviluppo larvale (Larval Development Ratio) in presenza di sedimento (LDR-S) con il copepode *Acartia tonsa* trattato nel presente Quaderno è una variante della versione ISO 16778 (2015) e deriva dalle competenze e dalle esperienze maturate prevalentemente dal gruppo tecnico-scientifico della “Sezione per la valutazione del rischio ecologico in ambienti marino-costieri” di ISPRA Livorno, ed alle collaborazioni con il Gruppo di Lavoro (GdL) UNICHIM “Tossicità di acque salate/salmastre e sedimenti” costituito nell’ambito del “gruppo ad hoc Crostacei”. Le metodologie per il saggio acuto e semicronico con il copepode calanoide *A. tonsa*, proposte dal GdL composto da Università di Parma, ARPAE – Sezione di Ferrara, ISPRA, Università di Genova, Shoreline, Stazione Zoologica A. Dohrn di Napoli, ARPA Marche – Dipartimento Macerata, CNR Taranto, Istituto Superiore di Sanità) sono state pubblicate rispettivamente nei Metodi UNICHIM 2365 (UNICHIM, 2012a) e 366 (UNICHIM, 2012b). Il metodo per il saggio acuto è indicato, inoltre, per la valutazione della idoneità di prodotti disperdenti/adsorbenti da utilizzare in mare per la bonifica da contaminazione da idrocarburi petroliferi (DD 25 febbraio 2011 del Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare).

Negli ultimi anni sono stati messi a punto nuovi protocolli che utilizzano il copepode *A. tonsa* per la determinazione degli effetti tossici cronici di sostanze chimiche con esposizioni prolungate (ISO 16778, 2015; Buttino et al., 2018, Picone et al., 2018). L’end-point considerato è il tasso di sviluppo larvale dallo stadio naupliare a quello di copepodite di embrioni esposti in fase acquosa (LDR-L) o in fase solida (sedimenti, LDR-S). Quest’ultimo saggio è stato inserito nel DM n. 173 del 15 luglio 2016 “Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l’autorizzazione all’immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini” come una possibile alternativa dei saggi ecotossicologici da eseguire su fase solida.

Il presente Quaderno di Ecotossicologia contiene informazioni metodologiche e operative utili per l’applicazione del saggio di sviluppo larvale LDR-S, incluso suggerimenti e indicazioni applicative ed operative, aggiornate sulla base di recenti studi e pubblicazioni scientifiche riguardanti l’allevamento ed il mantenimento del copepode *A. tonsa*, nonché alcuni specifici approfondimenti tecnico-scientifici legati all’allestimento delle colture algali necessarie per l’alimentazione di *A. tonsa*.

Lo scopo del presente Quaderno è quello di agevolare il raggiungimento di un buon livello di autonomia esecutiva degli operatori, consentendo l’avvio di prove di interconfronto/intercalibrazione a livello nazionale, al fine di definire da ultimo una carta di controllo nazionale in ambito SNPA.

La sperimentazione su larga scala di tale saggio e l’applicazione in diversi contesti territoriali, costituirà il presupposto per aggiornamenti periodici di questo Quaderno, supportati anche dall’ampliamento delle conoscenze sulla biologia dell’organismo test.



## INTRODUZIONE

---

Il copepode planctonico *Acartia tonsa* (Dana, 1848) è una specie cosmopolita delle regioni temperate e subtropicali, tipica di ambienti ad alto trofismo e comune in aree costiere ed estuari. In Mediterraneo *A. tonsa* è stata introdotta nella metà degli anni 80 (Gaudy and Viñas, 1985; Farabegoli et al., 1989) diventando la specie dominante nelle aree lagunari dell'Alto Adriatico a discapito di quelle cogeneriche autoctone (Sei et al., 1996; Comaschi et al., 2000). Questa specie è stata inoltre segnalata nella Laguna di Lesina (Sei et al., 1996; Comaschi, 2000; Bianchi et al., 2003).

*A. tonsa* è un importante membro delle comunità zooplanctoniche e, come tale, costituisce un fondamentale anello di congiunzione tra la produzione primaria e secondaria nell'ambiente marino-costiero, in quanto si nutre di fitoplancton e, a sua volta, è una fonte di cibo per pesci e grandi mammiferi.

La sua ampia distribuzione, le piccole dimensioni, il breve ciclo vitale, l'alta produttività ed il ruolo nella catena trofica marina rende questa specie un ottimo modello per gli studi sull'inquinamento e per l'utilizzo in test di tossicità per la valutazione della qualità delle acque e dei sedimenti marini (ISO 14669, 1999; Gorbi et al., 2012; Buttino et al., 2018; Picone et al., 2018). In particolare, *A. tonsa* viene ampiamente utilizzata in studi ecotossicologici sia in Europa che negli Stati Uniti e Canada, rientrando tra le specie indicate dalla International Organization for Standardization per l'esecuzione di saggi tossicologici applicati agli ambienti marini e salmastri (ISO 14669, 1999).

Nel presente volume viene trattata la metodologia di esecuzione del **saggio biologico di sviluppo larvale in presenza di sedimento (LDR-S)** con il copepode *A. tonsa* (ceppo Mediterraneo). Con il test LDR viene valutata la percentuale di inibizione dello sviluppo larvale dalla fase naupliare a quella di copepodite.

Il saggio è previsto dal DM n. 173 del 15 luglio 2016 "Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini".

Il protocollo descritto è una variante della versione ISO 16778 (2015) e prevede l'esposizione di uova di *A. tonsa* in acqua di mare contenente una quantità definita di sedimento di cui bisogna testare la tossicità (Buttino et al., 2018; Picone et al., 2018). Sebbene il copepode *A. tonsa* sia una specie pelagica, non può essere esclusa infatti la probabilità che le prime fasi larvali e le uova vengano a contatto con i sedimenti in ambienti poco profondi quali le lagune costiere e le aree di transizione. In questi ambienti anche le interazioni sedimento - colonna d'acqua potrebbero favorire il rilascio di inquinanti con possibili effetti negativi sulla sopravvivenza delle larve di copepodi, con conseguente riduzione del reclutamento della popolazione di copepodi nell'ambiente naturale. Ciò potrebbe portare ad una riduzione della produttività secondaria degli ambienti marini (Beaugrand and Reid, 2012). Inoltre, con le nuove tecniche di genomica applicata alla tossicologica (tossico-genomica) è stato rilevato che i copepodi planctonici come *A. tonsa* non sono in grado di attivare sistemi di difesa molecolare, come quelli messi in atto da copepodi bentonici, e risultano quindi essere maggiormente sensibili agli stress ambientali (Zhou et al., 2018).

# 1. SPECIE TEST

---

## 1.1 Biologia ed ecologia della specie

*Acartia tonsa* (Dana, 1848) appartiene al phylum *Arthropoda*, subphylum *Crustacea*, ordine *Calanoida*, sottoclasse Copepoda.

### 1.1.1 Morfologia ed organizzazione strutturale dei copepodi

I copepodi hanno un corpo metameroico cilindrico costituito da undici segmenti che possono presentare delle saldature più o meno complete. Nella morfologia esterna è possibile distinguere tre porzioni (Fig. 1):

- la testa [o *cefalosoma*, C],
- il torace [o *metasoma*, M], comprendente cinque segmenti distinti ed uno fuso con la testa,
- l'addome [o *urosoma*, U], composto da cinque segmenti.

La testa (C) e il torace (M) sono riuniti a costituire una regione anteriore omogenea, definita *prosoma* (P), mentre l'addome (U), più stretto, è nettamente distinto e costituisce da solo il corpo posteriore (Fig. 1).

La testa porta un unico occhio primitivo (detto naupliare) e sul lato ventrale la fronte si ricurva in un rostro (R) diretto il più delle volte all'indietro. In generale, il rostro è biforcuto e termina con 2 punte, talvolta con due filamenti sottili. In alcuni casi il rostro è superficiale, non biforcuto, in altri ancora del tutto assente.

La testa porta inserite sul lato ventrale due paia di antenne (Fig. 1). Le prime antenne (A1) sono costituite da un numero di segmenti variabile da 3 a 25, sono munite di setole semplici o piumate, hanno funzioni natatoria e sensoriale e in generale sono più sviluppate nei maschi, dove possono presentare modificazioni strutturali utilizzate per trattenere la femmina durante l'accoppiamento. Le seconde antenne (A2) sono invece più piccole e ventrali, spesso sono costituite da due rami, uno esterno (esopodite) e uno interno (endopodite).

Ventralmente sulla linea mediana si apre la bocca, composta di un "*labrum*" (L), un "*labium*" e di 4 coppie di appendici masticatrici, mandibole (Md), 1 mascelle (Mx 1), 2 mascelle (Mx 2) e massilpedi (Mxp), ricoperte da setole.

Ciascuno dei 5 somiti toracici non fusi con la testa porta un paio di appendici natatorie tipicamente bifide.

L'addome o urosoma (U) è costituito da 5 somiti privi di appendici (Fig. 1): il primo somite porta le aperture genitali (e per questo è definito segmento genitale, (Sg), l'ultimo porta l'apertura anale (Sa) e termina con la furca, costituita da 2 ramificazioni parallele divergenti (Rc), ognuna caratterizzata dalla presenza di 6 setole (quattro terminali o apicali, una sul bordo esterno e una sul bordo interno).

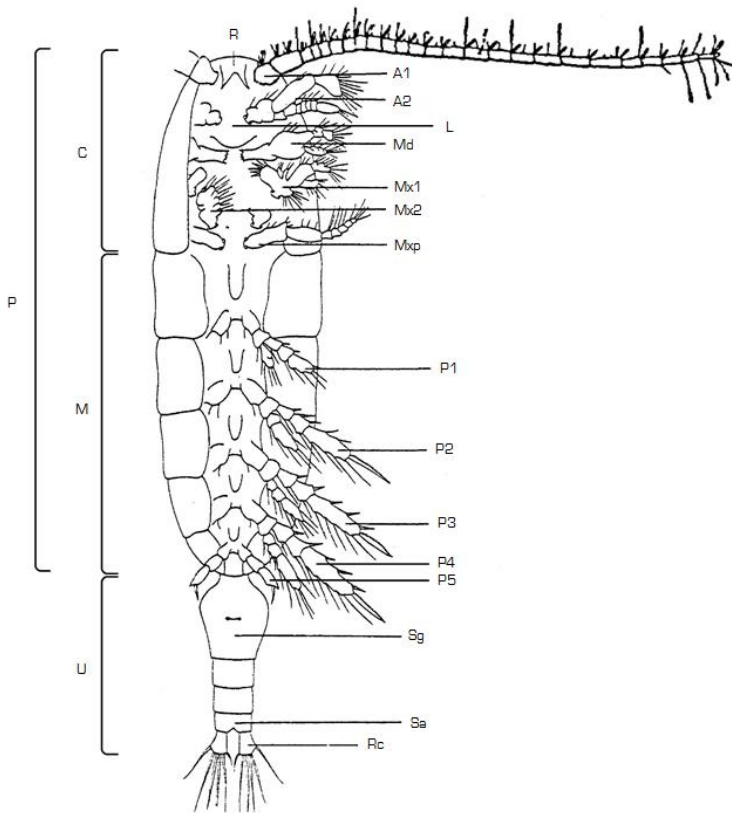


Figura 1: Morfologia esterna di copepode calanoide. P, prosoma; C, cefalosoma o testa; M, metasoma o segmenti toracici; U, urosoma o segmenti addominali; R, rostro; A1, prima antenna; A2, seconda antenna; L, labrum; Md, mandibola; Mx1, maxilla 1; Mx2, maxilla 2; Mxp, massillipede; P1-P5, pereiopodi natatori; Sg, segmento genitale; Sa, segmento anale; Rc rami caudali [da Murphy and Cohen, 1978; modificato].

In alcune specie gli individui adulti maschili e femminili non hanno un dimorfismo sessuale morfologicamente evidente ed è necessaria una certa esperienza per poterli distinguere senza ricorrere a forti ingrandimenti. In *A. tonsa* la femmina (Fig. 2a) è generalmente più arrotondata e grande del maschio che presenta antenne maggiormente ripiegate (Fig. 2b). Le dimensioni delle femmine sono solitamente 1 - 1,5 mm e quelle dei maschi 0,8 - 1,1 mm. Inoltre, le femmine hanno il primo paio di antenne dritte, la testa di forma arrotondata ed il bordo posteriore del prosoma munito di alcune piccole spinule.

E' possibile differenziare un individuo adulto di sesso femminile da uno maschile principalmente per lo sviluppo del I segmento genitale dell'addome e dal V piede. Nel maschio l'ultima appendice natatoria è modificata per l'accoppiamento [costituisce l'organo copulatore]. In Figura 3 sono riportati il V piede di un individuo maschile (M) e di

una femmina (F). Il primo segmento dell'urosoma risulta più grande e prolungato rispetto a quello del maschio, a questo seguono altri 3 segmenti (Fig. 4b-e e Fig. 4i-l). L'urosoma è costituito da 5 segmenti, il secondo dei quali risulta tondeggiante e munito di spinule dorso laterali.

Per approfondimenti delle specifiche morfologiche di *A. tonsa* si può fare riferimento alla "Guida al riconoscimento del plancton dei mari italiani" (ICRAM, 2006).

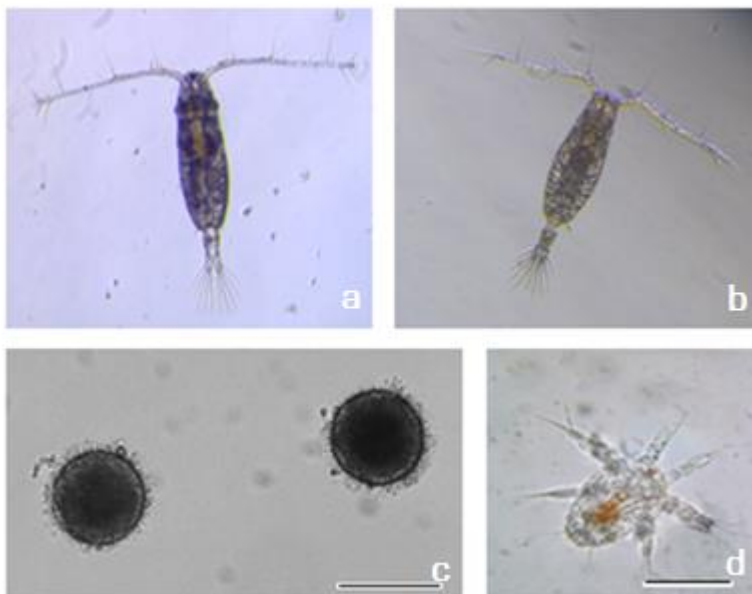


Figura 2: *A. tonsa*: a) femmina adulta; b) maschio adulto c) uova/embrioni; d) nauplio (a,b ingrandimento 40x; c,d bar= 80µm).



Figura 3: V paio di appendici natatorie in *A. tonsa* (M = maschio, F = femmina) (da Wilson, 1932).

I copepodi presentano due diverse modalità di movimento: un movimento lento, facilitato dalle antenne e da alcune appendici cefaliche ed un movimento rapido (*fast jumping*) che realizzano per mezzo delle appendici toraciche. Molti copepodi, per la maggior parte calanoidi, sono filtratori; si nutrono di fitoplancton che catturano e filtrano attraverso le appendici boccali.

Il *sistema digerente* è tipicamente costituito da tre parti: una anteriore, comprendente l'apertura boccale e l'esofago, una intermedia in cui si trova lo stomaco ed una parte terminale con l'intestino (o proctodeo) e l'ano.

A livello dello stomaco sboccano i canali per l'escrezione dell'epatopancreas. L'ano per lo più dorsale, situato sull'ultimo segmento addominale (segmento anale), è generalmente protetto da un opercolo anale.

La maggior parte dei copepodi manca di un vero e proprio *sistema circolatorio* e la circolazione si realizza in uno speciale emocoel per mezzo di forti contrazioni muscolari e pulsazioni ritmiche dell'intestino.

Il *sistema respiratorio*, analogamente al sistema circolatorio, risulta molto semplice: mancano, infatti, strutture caratteristiche dei crostacei, quali le branchie, e la respirazione avviene direttamente attraverso seni e cavità situate al di sotto del tegumento.

Il *sistema nervoso* consiste di un cervello trilobato, anteriore all'esofago, che si connette alla corda nervosa ventrale mediante 2 larghi cordoni circumesofagei. La corda nervosa ventrale si estende fino alla parte finale del prosoma, si divide in 2 rami a livello dell'urosoma e prosegue fino alla furca caudale.

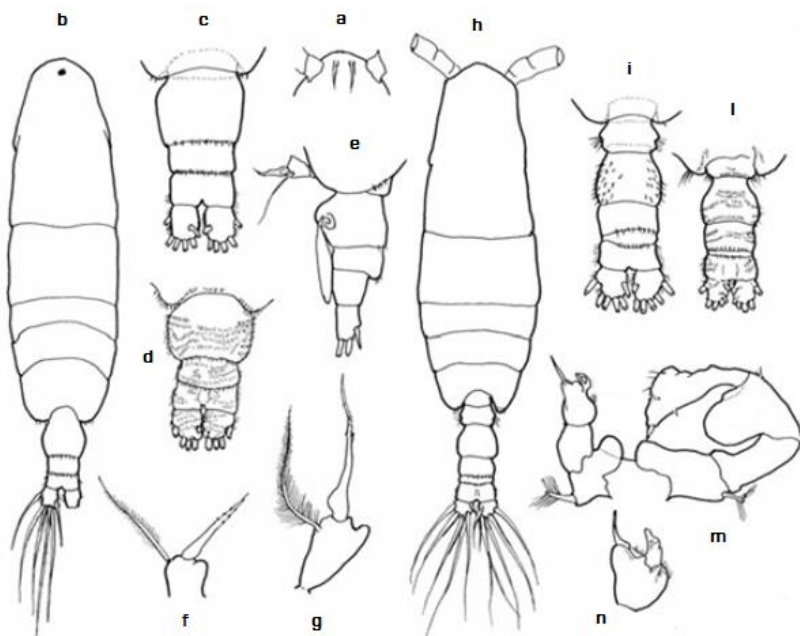
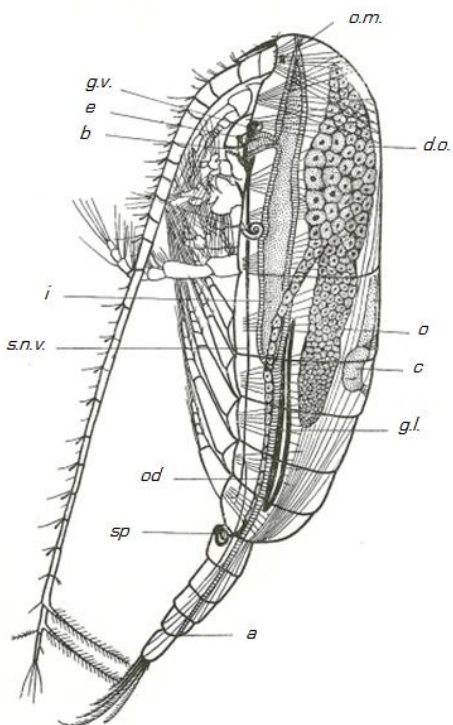


Figura 4: Caratteristiche morfologiche distintive di individui maschili e femminili di *A. tonsa*: a, filamenti rostrali in entrambi i sessi. Femmina [b-g]: b, individuo intero [visione dorsale]; c-d, urosoma [visione dorsale]; e, urosoma con spermatofora [visione laterale sinistra]; f-g, quinto piede [ramo sinistro]; Maschio [h-n]: h, individuo intero [visione dorsale]; i-l, urosoma [visione dorsale]; m, quinto piede; n, ramo sinistro del quinto piede [da "Guida al riconoscimento del plancton dei mari italiani", ICRAM 2006, Volume II - Plancton neritico - Tavole. Tavola n. 83. Disegni di: A. Comaschi - C.N.R. Venezia].

Il *sistema riproduttore* dei copepodi è costituito da una gonade situata nella parte dorso-mediale del torace. La femmina presenta nella regione della testa un unico ovaio dorsale con due diverticoli che si allungano anteriormente (diverticoli ovarici). L'ovario è distinto in tre zone: la posteriore in cui si ha la formazione degli oociti, anteriore e la zona di accrescimento (nelle quali si ha la maturazione delle uova). Dall'ovario si dipartono due ovidotti che corrono centralmente e sboccano in due cavità dette spermateche (o ricettacoli seminali) che sono collegate alle aperture genitali (gonopori) mediante brevi condotti. I gonopori sono spesso protetti da uno speciale opercolo (Fig. 5).



*Figura 5: Anatomia di copepode calanoide femmina (visione laterale). a: ano; b: bocca; c: cuore; d.o.: diverticolo ovarico; e: esofago; g.l.: goccia lipidica; g.v.: ganglio ventrale; i: intestino; o: ovaio; od: ovidotto; o.m.: occhio mediano; s.n.v.: sistema nervoso ventrale; sp: spermateca (da Marshall and Orr, 1972, modificata).*

L'apparato riproduttivo maschile è costituito da un unico testicolo dorsale addossato al cuore, dal quale si diparte il vaso deferente che termina nella vescicola seminale. Dalla vescicola gli spermatozoi passano nel sacco delle spermatofore che saranno poi rilasciate, attraverso il dotto spermatico posto ventralmente, sul segmento genitale.

Durante l'accoppiamento il maschio non feconda direttamente la femmina, ma attacca la spermatofora ai pori genitali femminili. Dalla spermatofora gli spermatozoi passano nelle spermateche e le uova vengono fecondate al passaggio attraverso i pori genitali prima di essere rilasciate in mare, come nel caso di *A. tonsa*, o restare attaccate all'addome e

raccolte in sacchi ovigeri, in alcune specie di copepodi sia planctoniche che bentoniche. Indipendentemente dall'accoppiamento, le femmine possono produrre un grandissimo numero di uova, tuttavia queste possono essere fecondate solo se la femmina ha ricevuto lo spermatozoo. In alcune specie un unico accoppiamento può essere sufficiente affinché le femmine producano uova fertili per un lungo periodo di tempo (come per la specie *A. tonsa*); per altre specie sono invece necessari accoppiamenti ripetuti.

Per i dettagli circa la riproduzione e lo sviluppo si veda il Paragrafo 1.1.4.

### 1.1.2 Distribuzione e habitat di *Acartia tonsa*

*Acartia tonsa* è una specie delle regioni temperate e subtropicali, tipica di ambienti ad alto trofismo e comune in aree costiere ed estuari.

Inizialmente osservata nella regione indo-pacifica, *A. tonsa* è oggi considerata cosmopolita essendo stata segnalata nell'Oceano Atlantico, nell'Oceano Indiano e nel Pacifico, nel Mare di Azov, nel mar Baltico, nel mar Nero, nel Mar Caspio, nel Mar Mediterraneo e in quello del Nord e nel Golfo del Messico sia in ambienti marini che estuariali. L'ampio range di distribuzione può essere il risultato del trasporto nelle acque di sentina delle navi (Mauchline, 1998; Sei et al., 2006).

In Italia, segnalata fin dalla fine degli anni '80 nelle lagune dell'alto Adriatico (Farabegoli et al., 1989; Sei et al., 1996), *A. tonsa* è diventata in alcune lagune specie dominante del popolamento zooplanctonico, sostituendo la specie co-generica autoctona *A. margalefi* (Comaschi et al., 2000; Sei et al., 2006), e recentemente la sua presenza è stata segnalata anche nella Laguna di Lesina (Sei et al., 2006).

Questa specie occupa nicchie ambientali che non si sovrappongono sempre a quelle di specie co-generiche. Ad esempio, *A. tonsa* è il copepode dominante nelle lagune del nord Adriatico, mentre *A. clausi* è la specie dominante nelle adiacenti acque costiere (Sei et al., 2006; Calliari et al., 2008). Nel Mar Tirreno non è stata segnalata finora, pertanto occorrerebbe evitare qualunque rilascio nelle condotte idriche, essendo questa specie comunque considerata aliena in Mediterraneo.

### 1.1.3 Abitudini alimentari

*Acartia tonsa* è un erbivoro filtratore opportunista che non accumula riserve energetiche e, in condizioni favorevoli in termini di disponibilità alimentari, investe tutto l'introito energetico nella produzione di uova, con tassi produttivi che decrescono rapidamente quando la quantità di microalghe fitoplanctoniche a disposizione si riduce (Kjørboe et al., 1985). Come nella maggior parte dei copepodi filtratori erbivori, anche la qualità delle alghe influenza la fisiologia riproduttiva di *A. tonsa* (Medina and Barata, 2004; Zhang et al., 2013, 2015).

### 1.1.4 Riproduzione e sviluppo embrionale

Il ciclo vitale e lo sviluppo di *A. tonsa* sono tipici della maggior parte dei copepodi calanoidi. Nel caso del ceppo Mediterraneo le uova fecondate, di forma sferica e con un diametro di circa 70 - 80 µm, sono *subitaneae*, cioè schiudono in meno di 48 h a 25 °C. Popolazioni di *A. tonsa* di aree geografiche diverse dal Mediterraneo (Oceano Atlantico e Mar Baltico) possono produrre due ulteriori tipologie di uova: *quiescenti* o di *diapausa*, a seconda dei tempi di schiusa e delle condizioni ambientali (Zillioux and Gonzalez, 1972; Castro-Longoria, 2001; Drillet et al., 2008a). Finora tali tipologie non sono state segnalate per il ceppo Mediterraneo di *A. tonsa*, né in condizione naturali né di allevamento (BOX 1). Un ritardo nella schiusa delle uova può essere indotto

artificialmente mantenendo gli embrioni a basse temperature (4 °C); ciò consente di conservarli in uno stato quiescente per diversi mesi e quindi di utilizzarli in tempi successivi alla deposizione. Questa pratica può essere utile qualora sia necessario inviare gli embrioni presso altri laboratori per effettuare test ecotossicologici o avviare nuove colture (Hansen et al., 2016; Vitiello et al., 2016).

#### **BOX 1 - Tipologie di uova nei copepodi**

Nei copepodi sono state descritte differenti tipologie di uova: *subitaneae*, di *diapausa* e *oligopausa* (o DHE, delayed hatching eggs) (Grice and Marcus, 1981; Chen and Marcus, 1997).

Le *uova subitaneae* schiudono entro pochi giorni dalla deposizione e, in alcune specie, possono rimanere in uno stato di quiescenza se le condizioni ambientali sono sfavorevoli. Le uova quiescenti riprendono lo sviluppo arrivando alla schiusa non appena le condizioni ambientali ritornano ottimali.

Le *uova di diapausa* arrestano lo sviluppo per lunghi periodi di tempo a seconda delle condizioni ambientali in cui si trovano gli individui adulti; questo meccanismo infatti è sotto il controllo materno. Le uova non riprendono lo sviluppo prima che sia trascorso un determinato periodo (periodo refrattario) anche se le condizioni ambientali ritornano ad essere ottimali. Le uova di diapausa possono sopravvivere in condizioni ambientali sfavorevoli (Zillioux and Gonzalez 1972; Castro-Longoria, 2001) come le basse temperature (Toledo et al., 2005; Holmstrup et al., 2006; Drillet et al., 2008a).

Le *uova di oligopausa* o DHE hanno una fase refrattaria molto breve, sempre sotto il controllo materno, di durata intermedia tra uova subitaneae e di diapausa. Uova di oligopausa sono state osservate in *A. tonsa* provenienti dal Mar Baltico (Katajisto 2006; Drillet et al. 2008b, 2011b). Tali uova necessitano di un tempo compreso tra 72 h e 1 mese per schiudersi e mostrano un metabolismo significativamente più lento rispetto alle uova subitaneae (Hansen and Drillet, 2013).

In generale, *Acartia tonsa* è in grado di produrre tutti questi tipi di uova. Nessuna evidenza di uova DHE tuttavia è stata trovata per la popolazione di *A. tonsa* proveniente dalla Florida (Scheef and Marcus, 2010; Drillet et al., 2011b) e per il ceppo Mediterraneo mantenuto in allevamento per diversi anni (Vitiello et al., 2016).

Nelle colture di laboratorio la produzione media giornaliera di uova per femmina (che rappresenta una stima della produttività o fecondità) dipende dalla qualità e quantità di cellule fitoplanctoniche somministrate agli adulti, nonché dalla densità di popolazione della coltura di copepodi (numero di individui adulti per mL) (Zhang et al., 2013, 2015).

La percentuale di schiusa delle uova (vitalità delle uova) dipende, oltre che dalla fertilità, dalla qualità delle alghe somministrate agli adulti (lanora et al., 2004; Zhang et al., 2013).

Come per la maggior parte dei copepodi calanoidi, anche per *A. tonsa* lo sviluppo larvale è indiretto e consiste in 6 successivi stadi naupliari (NI - NVI), seguiti da 5 stadi di copepodite (CI - CV) fino all'individuo adulto (Fig. 6).

La durata dello sviluppo e la vita media degli individui adulti variano in funzione della latitudine e della temperatura. A temperature comprese tra 15 °C e 20 °C lo sviluppo di *A. tonsa* da nauplio a copepodite dura mediamente 5 - 6 giorni. Lo stadio adulto viene raggiunto dopo 12 - 20 giorni dalla schiusa delle uova, a seconda della temperatura e



della densità di popolazione (Invidia et al., 2004; UNICHIM, 2012a, 2012b; Zhang et al., 2015).

La schiusa delle uova dà origine ad un primo stadio larvale (nauplio I) di dimensioni simili alle uova (Fig. 6) e morfologicamente molto diverso dall'adulto. Il nauplio non ha segmentazione: il primo stadio (N I) ha forma triangolare, un occhio mediano, due paia di antenne, la mandibola e un solo paio di spine nell'armatura caudale e non è in grado di nutrirsi. Maxillule, maxilla e massillipedi si formeranno durante le successive fasi di sviluppo naupliare (II-VI), caratterizzati dall'aumento del numero di appendici natatorie e dall'aumento delle dimensioni, pur mantenendo una forma triangolare (Fig. 6). I successivi stadi naupliari (II-VI) mantengono la forma triangolare e sono caratterizzati dall'aumento del numero di appendici natatorie e dall'aumento delle dimensioni.

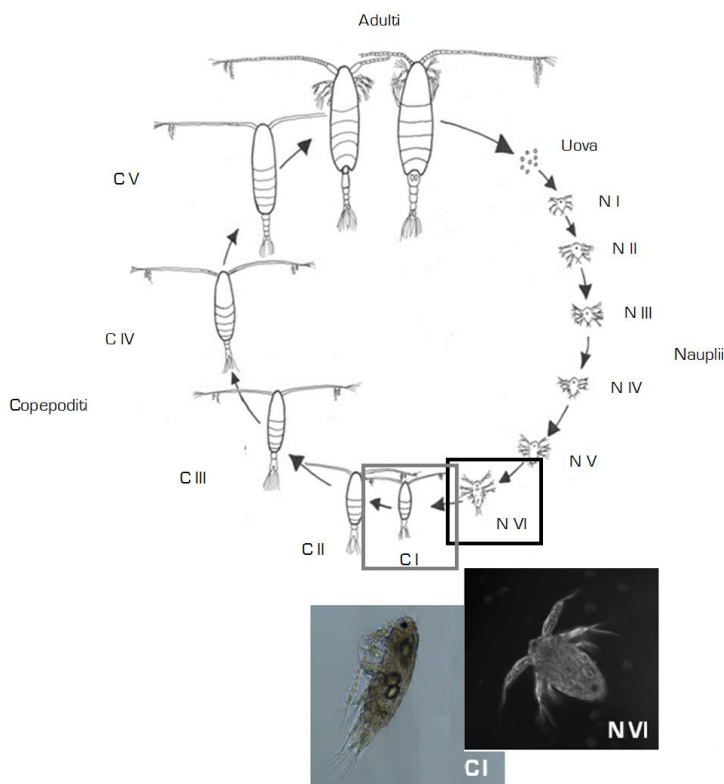


Figura 6: Ciclo vitale di *A. tonsa*. Le fotografie mostrano lo stadio naupliare VI (NVI, X 46) e copepodite I (CI, X 42,6) [da Alver et al., 2011, mod.].

Dopo i primi 6 stadi naupliari iniziano le 5 fasi di copepodite (I - V) durante le quali i copepoditi assumono le caratteristiche morfologiche tipiche dell'adulto. Negli stadi di copepodite appare più chiara la distinzione tra i vari metameri e le appendici, che sono i caratteri che permettono la differenziazione tra i vari stadi. Negli ultimi stadi di copepodite, inoltre, iniziano ad essere visibili le caratteristiche distintive dei due sessi.

Con il passaggio dall'ultimo stadio di copepodite a quello di adulto si ha lo sviluppo definitivo di tutte le appendici. Il VI stadio di copepodite rappresenta l'adulto. Individui sessualmente maturi possono essere riconosciuti dalla presenza del V piede modificato e da una antenna genicolata, nel maschio, e dalla dimensione del I segmento genitale nella femmina.

## 1.2 Utilizzo di *Acartia tonsa* in ecotossicologia

Il copepode *A. tonsa* è stato proposto per i test di tossicità e gli studi di inquinamento marino a partire dal 1977 (Lee, 1977), sia in Europa che negli Stati Uniti, rientrando tra le specie indicate dalla International Organization for Standardization per l'esecuzione di saggi tossicologici applicati agli ambienti marini e salmastri (ISO 14669, 1999). Successivamente alla pubblicazione del metodo ISO 14669 (1999) che prevede l'utilizzo di individui adulti o al V stadio di copepodite, Andersen et al. (2001) e Wollenberger et al. (2003) hanno proposto l'esposizione di uova per saggi di tossicità cronica per valutare la sopravvivenza degli stadi larvali, in quanto risultano più sensibili degli adulti alle sostanze inquinanti.

Recentemente, Gorbi et al. (2012) hanno proposto un saggio acuto (a 24 e 48 h) ed uno semicronico (a 7 giorni) a partire dalla esposizione delle uova di *A. tonsa* ed una procedura standardizzata per l'allevamento in laboratorio.

Le metodologie riportate da Gorbi e collaboratori sono state recepite da UNICHIM con i Metodi M.U. 2365 (UNICHIM, 2012a) e M.U. 2366 (UNICHIM, 2012b), rispettivamente per il saggio acuto e per il saggio semicronico. Il metodo per il saggio acuto è stato in seguito inserito nell'elenco di saggi da utilizzare per la valutazione della idoneità all'impiego in mare di prodotti disperdenti/adsorbenti da utilizzare per la bonifica da inquinamento da idrocarburi (D.D. 25 febbraio 2011 "Definizioni delle procedure per il riconoscimento di idoneità dei prodotti assorbenti e disperdenti da impiegare in mare per la bonifica dalla contaminazione da idrocarburi petroliferi").

Più recentemente, nuovi protocolli hanno riguardato test di esposizione prolungata in condizioni semi-statiche, per la determinazione degli effetti di sostanze chimiche in fase acquosa. End-point considerati sono il tasso di sviluppo larvale ossia il passaggio da stadio naupliare a copepodite (ISO 16778, 2015; Picone et al., 2018).

Ulteriori saggi ecotossicologici condotti esponendo individui adulti a sostanze inquinanti per diversi giorni, hanno considerato la fecondità, cioè il numero di uova prodotte per individuo, e la vitalità delle uova (tasso di schiusa) durante il periodo di esposizione, come end-point (Zhou et al., 2018).

Per la valutazione della qualità dei sedimenti marini generalmente si utilizzano organismi bentonici (Kennedy et al., 2009) come gli anfipodi adulti (ISO 16712, 2007), i policheti (ASTM 1611, 2007) ed i copepodi bentonici (Lotufo, 1997; Kovatch et al., 1999; Pane et al., 2008; Perez-Landa and Simpson, 2011; Simpson and Spadaro, 2011; Ward et al., 2011).

Nei test con il sedimento intero gli effetti sub-letali e cronici sono raramente investigati poiché le procedure sono spesso costose e richiedono tempi di esposizione più lunghi (Costa et al., 2005). Tuttavia, le fasi iniziali della vita degli invertebrati bentonici e planctonici, in genere più sensibili delle fasi adulte (Ringwood, 1992; Hutchinson et al., 1998), offrono la possibilità di valutare gli effetti sub-letali esercitati da contaminanti legati ai sedimenti nell'interfaccia acqua-sedimento (Anderson et al., 1996, 2001).

L'uso di *A. tonsa* come organismo modello è favorito dal fatto che questa specie è reperibile tutto l'anno con abbondanze particolarmente elevate da marzo/aprile a ottobre/novembre in Alto Adriatico (Sei et al., 1996; Comaschi et al., 2000). Inoltre, gli

studi sulla biologia ed i protocolli di allevamento in laboratorio sono ormai ben consolidati e permettono di disporre di questo organismo durante tutto l'anno.

### 1.3 Campionamento e sorting degli organismi

Per il campionamento dello zooplancton è necessaria un'imbarcazione equipaggiata con un retino da plancton, generalmente di 200 µm di maglia (tipo WP2). Lo zooplancton raccolto nel collettore di vetro o plastica posto alla base del retino viene poi trasportato in laboratorio entro 1 - 2 h dalla raccolta, in contenitori refrigerati in cui la temperatura dell'acqua è mantenuta simile a quella del luogo di raccolta. Appena giunti in laboratorio si procede alla separazione delle specie (*sorting*).

Se nel campione prelevato in campo la specie è predominante, il suo isolamento e il trasferimento nel mezzo di allevamento risultano piuttosto semplici. Se al contrario la specie da isolare è scarsamente rappresentata può risultare vantaggioso filtrare il campione attraverso una serie di reti con maglie a diversa grandezza, in modo da eliminare gli individui di altre specie con dimensioni nettamente maggiori e inferiori rispetto a quella che si intende allevare.

Per facilitare il trasferimento si può sfruttare una caratteristica propria di diversi copepodi, inclusa *Acartia* spp, ovvero la tendenza a nuotare verso una fonte luminosa, concentrandosi nella zona del recipiente più illuminata. Inoltre, se gli organismi risultano troppo attivi e veloci per il loro isolamento si può ridurre il volume di cattura o anestetizzare gli animali ponendo del ghiaccio tritato sotto il cristallizzatore o la capsula Petri contenente il campione di zooplancton. Questa procedura è anche raccomandata quando sia necessario determinare il sesso o lo stadio di sviluppo degli organismi.

Per una trattazione approfondita dell'argomento si rimanda al Capitolo 42 del Manuale ISPRA 56/2010 "Metodologie di studio del plancton marino" (ISPRA, 2010).

### 1.4 Allevamento di *Acartia tonsa* in laboratorio

I primi esperimenti relativi al mantenimento di copepodi marini in laboratorio risalgono agli inizi del secolo scorso, ma solo a partire dagli anni '70 sono state messe a punto tecniche adeguate per allevare le più importanti specie oloplanctoniche.

La necessità di sviluppare tecniche di allevamento di *A. tonsa* in laboratorio si è accresciuta negli ultimi anni, sia per aumentare le conoscenze sulla fisiologia di questa specie, visto che è un'importante componente della rete trofica marina, sia per il recente interesse come potenziale alimento per le larve di pesci in acquacoltura, in alternativa a rotiferi ed *Artemia* spp. (Støttrup 2000, 2006; Drillet et al., 2006, 2011a), o come organismo modello per saggi ecotossicologici (Gorbi et al., 2012).

Le tecniche di allevamento e le attrezzature necessarie variano in base alle esigenze specifiche di ciascun laboratorio (Tab. 1).

I contenitori utilizzati per l'allevamento possono essere di dimensioni e materiali diversi: beaker di vetro o plastica da 1 - 5 L, acquari in vetro o bidoni in polipropilene da 20 - 50 L, fino a vasche in vetroresina di grossi volumi (Kjørboe et al., 1985; Schipp et al., 1999; Zhang et al., 2013; ISO 16778, 2015; Vitiello et al., 2016; Hagemann et al., 2016).

Per l'allevamento di *A. tonsa* è preferibile l'utilizzo di acqua di mare naturale prelevata da località lontane da fonti di inquinamento, filtrata con maglia di 0,22 µm (ISO 16778, 2015) o 0,45 µm (Gorbi et al., 2012) e conservata al buio e a bassa temperatura fino all'utilizzo (Gorbi et al., 2012).

I protocolli ISO 14669 (1999) e ISO 16778 (2015) prevedono la possibilità di utilizzare anche acqua di mare sintetica; per il protocollo e le modalità di preparazione dell'acqua di

mare sintetica è possibile fare riferimento al protocollo ISO 16778 (2015) e i protocolli UNICHIM MU 2365- (2012a) e MU 2366 (2012b).

Per l'allevamento del ceppo mediterraneo di *A. tonsa* la salinità ottimale è compresa tra 28 ÷ 32 ‰, in quanto a valori più elevati sono state registrate riduzioni della fecondità/vitalità naupliare. Il protocollo ISO 16778 (2015) amplia il range a 15 ÷ 35 ‰ in considerazione dell'elevata tolleranza di tale specie, sebbene sia necessario valutare la provenienza di *A. tonsa* per scegliere le specifiche condizioni di allevamento, poiché ceppi provenienti da differenti aree hanno dimostrato di possedere caratteristiche fisiologiche diverse (Hansen et al., 2016).

Il controllo periodico della salinità permette di operare correzioni, in caso di elevata evaporazione, mediante aggiunta di acqua distillata.

La concentrazione di ossigeno deve essere mantenuta intorno al livello di saturazione, prevedendo una costante e leggera aerazione mediante l'utilizzo di pipette di vetro o tubicini di piccolo diametro. Alcuni protocolli prevedono l'utilizzo di pietre porose a porosità fine (UNICHIM, 2012a, 2012b).

Il pH dell'acqua di mare è uno dei fattori più importanti che limita il tasso di crescita del plancton in laboratorio. Il pH dovrebbe essere mantenuto tra 7,5 e 8,5, specialmente quando i copepodi sono allevati con alte densità di fitoplancton.

I contenitori di allevamento devono essere mantenuti in ambienti termoregolati (camere o celle termostate) ad una temperatura solitamente compresa tra 19 e 21 °C, provvisti di illuminazione artificiale (neon a bassa intensità luminosa) con fotoperiodo 14 h L : 10 h D (UNICHIM, 2012a, 2012b). Altri protocolli suggeriscono un fotoperiodo di 16 h L : 8 h D (ISO 14669, 1999; ISO 16778, 2015). Il controllo del fotoperiodo può essere fondamentale perché molti processi metabolici sono sotto il diretto controllo dei cicli circadiani. Landry (1975) ha osservato che le uova di *A. tonsa* non schiudono in condizioni di luce continua e che le femmine depongono maggiormente in assenza di luce. Aumentare il numero di ore di buio favorisce quindi un aumento della fecondità dei copepodi.

In caso di allevamenti in grandi volumi (da 5 a 10 L) l'acqua deve essere rinnovata completamente ogni 2 - 3 mesi. E' inoltre necessario mantenere puliti i contenitori prevedendo non soltanto periodiche sifonature del fondo per la rimozione dei pellet fecali, residui di animali e alghe, esuvie e uova schiuse (avendo cura di recuperare gli embrioni), ma anche trasferimenti dell'intero volume dell'allevamento per effettuare una pulizia approfondita delle pareti dei contenitori.

Mediante l'utilizzo di filtri con maglie di grandezza differente è possibile la raccolta e la selezione degli stadi vitali di interesse. A tal proposito, il protocollo ISO 14669 (1999) fornisce indicazioni sul tipo di maglia da utilizzare in base agli stadi vitali che si vuole selezionare (Tabella 2).

Per un approfondimento sull'argomento si rimanda al Capitolo 47 del Manuale ISPRA 56/2010 "Metodologie di studio del plancton marino" (ISPRA, 2010).

L'allevamento e il mantenimento di *A. tonsa* in laboratorio prevede necessariamente anche l'allestimento di colture di alghe fitoplanctoniche da utilizzare come alimento.

Un'alimentazione costituita da un mix algale di *Rhinomonas reticulata* e *Isachrysis galbana* in rapporto 1:1, che fornisca almeno 1.500 µg C/L tre volte a settimana, garantisce un buon mantenimento della coltura.

Il tasso di ingestione delle alghe da parte dei copepodi è direttamente proporzionale all'abbondanza delle cellule, ma solo fino a un certo valore limite oltre il quale si raggiunge un plateau (Zhang et al., 2015). Pertanto, non è necessario aumentare le densità di alghe somministrate per ottenere una produzione più elevata di copepodi.

Per un quadro, comunque non esaustivo, delle differenti diete e metodologie di allevamento reperite in bibliografia si può consultare la Tabella 6 dell'Allegato 1.

E' ormai dimostrato che un'alimentazione a base di diatomee interferisce non solo sulla vitalità degli adulti di copepode, ma anche sul successo di schiusa delle uova e sulla vitalità dei naupli (Miralto et al., 1999; Carotenuto et al., 2002; Ianora et al., 2003, 2004; Buttino et al., 2008) per la presenza di molecole bioattive alle quali ogni specie di copepode risponde in maniera differente. Oltre alle diatomee come *Thalassiosira weissflogii*, *Skeletonema marinoi* e *Phaeodactylum tricornutum*, anche la cloroficea *Tetraselmis suecica* non favorisce una buona produzione di uova, ne riduce il successo di schiusa, influenzando negativamente la fecondità la vitalità naupliare di *A. tonsa* (Zhang et al., 2013).

Le criptoficee come *Rhinomonas* sp. e *Rhodomonas* sp. possono costituire un alimento valido per la crescita e lo sviluppo dei copepodi (Leandro et al., 2006) in considerazione dell'elevato contenuto di lipidi (Zhang et al., 2013), di acidi grassi polinsaturi (PUFA) e dell'acido docosaesaenoico (DHA, un acido grasso essenziale della serie omega-3). Zhang et al. (2013) riportano che tra le specie testate *I. galbana*, *Rhinomonas reticulata*, *Rhodomonas baltica*, *T. suecica*, *S. marinoi* e *P. tricornutum*, il più alto tasso di produzione di uova è stato ottenuto con *R. reticulata*, mentre il più alto tasso di schiusa è stato registrato con *R. baltica*.

Come *Rhodomonas* sp., anche *Isochrysis* sp. favorisce una iniziale elevata produzione di uova per l'elevato contenuto di lipidi (Støttrup and Jensen, 1990), tuttavia la produttività si riduce dopo una settimana di alimentazione monoalgale a base di *I. galbana* (Zhang et al., 2013) che pertanto, se utilizzata da sola, non è in grado di supportare l'allevamento di *A. tonsa* nel tempo.

Le densità di allevamento di *A. tonsa* (1.000 ind/L) (Jepsen et al., 2007) sono più basse rispetto a quelle raggiunte per altre specie come *Eurytemora affinis* (fino a 3.000 ind/L) e paracalanoidi del genere *Parvocalanus* (pari a 3.000 ind/L) (Støttrup, 2006).

Jepsen et al. (2007) non hanno trovato differenze in termini di produzione di uova e successo di schiusa, per il ceppo baltico, per densità comprese tra 100 e 600 ind/L.

Per il ceppo mediterraneo di *A. tonsa* la densità di 160 ind/L ha indotto tassi di produzione giornaliera di uova (10 uova/femmina) significativamente più bassi rispetto a quelli ottenuti a densità più ridotte (40 e 80 ind/L) (Zhang et al., 2015). Tassi di produzione di uova relativamente bassi a densità alte denotano una disponibilità sub-ottimale delle risorse in termini di quantità e qualità di alimento (Zhang et al., 2015). Allevamenti mantenuti alle condizioni suggerite da Zhang et al. (2015) hanno permesso di ottenere densità totali medie di circa 800 ind/L.

Tabella 1: Confronto tra condizioni di allevamento in laboratorio di *A. tonsa* proposte in differenti protocolli di saggi ecotossicologici. (ND= non disponibile).

Publicazione	ISO 14669 (1999)	ISO 16778 (2015)	UNICHIM 2365 (2012a) e UNICHIM 2366 (2012b)
Mezzo	Acqua di mare naturale o sintetica	Acqua di mare naturale filtrata 0,2 µm o acqua di mare sintetica	Acqua di mare sintetica filtrata 0,45 µm
Salinità (‰)	29 - 36	15 - 35	30 ± 2
pH	8,0 ± 0,3	ND	8,2 ± 0,1
T (°C)	ND	20 ± 5	20 ± 1
Fotoperiodo (h L : h D)	ND	16 : 8	14 : 10 (500 - 600 lux)
Densità coltura (ind./L)	25 (adulti); >25 (stadi larvali)	400 - 600	ND
Frequenza alimentazione	ND	Giornaliera	Bisettimanale
Tipologia di alimentazione (µg C/L)	<i>Rhodomonas reticulata</i> + <i>Isochrysis galbana</i> (> 1.500)	<i>Rhodomonas salina</i> , 60.000 cells/mL (7.500)	<i>Rhinomonas reticulata</i> + <i>Tetraselmis suecica</i> + <i>Isochrysis galbana</i> (>300)
Volume di allevamento (L)	10 - 12	1 - 2	7 - 8

Tabella 2: Esempio di utilizzo di filtri con maglie di dimensioni differenti per la selezione di stadi vitali diversi

Dimensione maglia (µm)	Stadi di <i>A. tonsa</i> trattenuti
< 80	Tutti gli stadi larvali
100	Tutti gli stadi larvali eccetto uova/embrioni e naupli di 0 - 2 giorni
140	Copepoditi e adulti
≥ 300	Solo adulti

## **2. MATRICI AMBIENTALI E SOSTANZE TOSSICHE DA TESTARE**

---

Le matrici ambientali che possono essere valutate sulla base del presente protocollo sono i sedimenti marini e salmastri tal quali.

Per sedimento tal quale si intende un sedimento comprensivo dell'acqua interstiziale, che ha subito una manipolazione minima dopo il campionamento (ASTM, 1994).

Per l'allestimento del test il sedimento non deve essere congelato, ma può essere conservato prima dell'esecuzione dei saggi di tossicità a 4 °C al buio per un periodo che varia, a seconda dei metodi, da 2 settimane (Norton et al., 1999) fino a 30 giorni (ISO 16712, 2005).

### 3. SOLUZIONI, STRUMENTAZIONE E MATERIALI

---

#### 3.1 Acqua

Per la preparazione dei controlli negativi, dei controlli positivi, per la raccolta delle uova e per l'allestimento delle camere test è preferibile utilizzare acqua di mare naturale, prelevata da un'area lontana da impatti antropici, filtrata a  $0,22 \mu\text{m}$  (FSW) e con salinità di 30 ‰.

L'acqua impiegata per la preparazione della soluzione madre della sostanza tossica di riferimento deve essere acqua deionizzata o di purezza equivalente.

#### 3.2 Soluzioni e terreni di coltura

I reagenti utilizzati per la preparazione delle soluzioni di prova e di controllo devono avere grado di purezza analitico.

Il fissativo utilizzato per la valutazione degli stadi larvali può essere la soluzione Lugol o l'alcool etilico denaturato al 90 %.

Per la crescita delle alghe unicellulari criptofite e primnesiofitiche da utilizzare come fonte alimentare dei copepodi è indicato il terreno di coltura F/2 Guillard (1975).

Una delle sostanze tossiche di riferimento più utilizzata come controllo positivo è il 3,5-diclorofenolo ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O}$ ) di seguito indicato come 3,5-DCP. L'uso di una sostanza tossica di riferimento è necessario per valutare in condizioni standard il tasso di sviluppo larvale. 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 (si veda BOX 2 a pagina 29).

#### 3.3 Strumentazione

In aggiunta alle usuali apparecchiature da laboratorio sono necessari:

- ambiente termostato a  $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  con sistema di illuminazione temporizzata;
- apparato per la filtrazione dell'acqua di mare;
- frigorifero/incubatore a  $4^\circ\text{C}$ ;
- bilancia tecnica per il porzionamento del sedimento;
- pompa, aeratore e sistemata di tubicini, rubinetti e pipetta/pietra porosa per l'aerazione;
- strumento per la determinazione della salinità delle matrici acquose;
- termometro;
- pH-metro;
- ossimetro;
- emocitometro per la determinazione della concentrazione delle alghe (ad esempio Neubauer, Thoma, Fuchs-Rosenthal o Bürker) o contacellule automatico/elettronico per la quantizzazione delle uova e delle alghe;
- micropipette automatiche e/o manuali graduate da 0,010 a 10,00 mL;
- stereomicroscopio per il controllo degli organismi, la selezione delle uova, la valutazione della densità della sospensione di uova, la conta del numero di naupli e copepoditi al termine del saggio;
- microscopio ottico per la conta delle alghe (obiettivi 10x e 40x);
- microscopio ottico rovesciato per la conta delle uova (obiettivo 4x e 10x).



### 3.4 Materiali

- filtri da 0,22 - 0,45  $\mu\text{m}$  in nitrocellulosa per la filtrazione dell'acqua di mare;
- serie di filtri con maglie < 80  $\mu\text{m}$ , da 100 a 140  $\mu\text{m}$  e  $\geq$  300  $\mu\text{m}$  per la selezione/separazione dei diversi stadi vitali di *A. tonsa* presenti nei contenitori di allevamento;
- spruzzetta con acqua di mare per la pulizia dei filtri (e recupero del materiale trattenuto dal filtro);
- cristallizzatori da 70 mL o beaker da 100 mL in vetro borosilicato per la raccolta degli organismi;
- pipette Pasteur in vetro da 7 x 230 mm per selezionare organismi/uova/residui da allontanare;
- contenitore (provetta, bicchierino, beaker o cristallizzatore) con coperchio per stoccaggio delle uova a 4° C;
- piastra Petri o piastra in vetro/plexiglass per la valutazione della densità della sospensione di uova;
- cucchiaio o spatola resistente per la miscelazione del sedimento;
- spatole in acciaio inox per la selezione del sedimento;
- bicchierini/beaker a fondo piatto da 100 mL per l'esecuzione del saggio (camera test);
- filtri cilindrici in plexiglass con maglia da 50  $\mu\text{m}$
- pellicola Parafilm®.

## 4. PROTOCOLLO METODOLOGICO

---

### 4.1 Allestimento del test

Per l'esecuzione del test devono essere allestite:

- n. 12 repliche del controllo negativo costituito da un sedimento di controllo privo di contaminazione e che non evidenzia effetti sullo sviluppo di *A. tonsa* (ad esempio la sabbia quarzifera);
- n. 6 repliche del campione di sedimento da testare;
- n. 5 repliche per ogni concentrazione da testare (ISO 16778, 2015) del controllo positivo rappresentato dal tossico di riferimento in fase liquida (3,5 DCP).

### 4.2 Fasi preparatorie

#### 4.2.1 Allestimento della coltura algale

Circa 10 giorni prima dell'inizio della prova, viene effettuato un rinnovo della coltura algale mediante un inoculo di *R. baltica* nel terreno F/2 Guillard (1975), per ottenere una coltura ad elevata densità cellulare ed in fase di crescita esponenziale pronta al momento dell'allestimento del test.

Il protocollo ISO 14669 (1999) per il saggio acuto riporta che una coltura di *R. baltica* ad una densità iniziale di 3.333 cell/mL, tenuta a  $20 \pm 3$  °C, con aerazione vigorosa e una illuminazione di 10.000 lux con fotoperiodo 16 h L : 8 h D, può raggiungere una densità di  $5 \times 10^6$  cell/mL dopo 10 giorni. Se la coltura algale dovesse raggiungere densità più elevate prima dell'inizio della prova, essa può essere mantenuta a 4° C per un massimo di 3 giorni (ISO 14669, 1999). Viceversa, qualora non si raggiungano le densità necessarie è possibile concentrare le colture algali mediante centrifugazione a  $3.300 \times g$  per 30 minuti a 10 °C per ottenere una sospensione stock di  $3 \times 10^7$  cell/mL che può essere mantenuta per una settimana a 4° C (ISO 14669, 1999).

La determinazione della densità cellulare della coltura di *R. baltica* può essere effettuata mediante emocitometri con microscopio ottico o con contacellule automatico/elettronico.

Una volta stabilita la densità algale è quindi possibile calcolare il volume di coltura da aggiungere in ciascuna replica per avere una densità finale di  $5 \times 10^4$  cell/mL.

#### 4.2.2 Allestimento delle camere test con sedimento

Il giorno prima dell'inizio della prova le camere test (es. beaker da 100 mL) vengono preparate con 3,5 g di sedimento a cui si aggiungono 60 mL di FSW. Le camere devono essere coperte, per limitare l'evaporazione, e mantenute in ambiente termostato a 20 °C per 24 h, fino all'aggiunta delle uova.

#### 4.2.3 Raccolta delle uova di *Acartia tonsa*

Se si dispone della coltura di *A. tonsa* nei propri laboratori, 3 o 4 giorni prima dell'allestimento del test bisogna iniziare la raccolta delle uova da incubare nelle camere test. Si procede, quindi, alla selezione degli individui adulti dalla coltura madre mediante filtrazione, utilizzando un filtro a maglie  $\geq 300$   $\mu\text{m}$ . Gli organismi selezionati vengono raccolti in beaker, contenenti FSW, ad una densità  $\leq 20$  organismi/L (si veda Paragrafo 1.4) e colture algali di *R. baltica* o *R. reticulata* a concentrazioni  $\geq 2.000$   $\mu\text{g C/L}$  (per esempio  $1,6 \times 10^4$  cell/mL per *R. baltica* oppure  $3,6 \times 10^4$  cell/mL per *R. reticulata*) (Zhang et al., 2015).

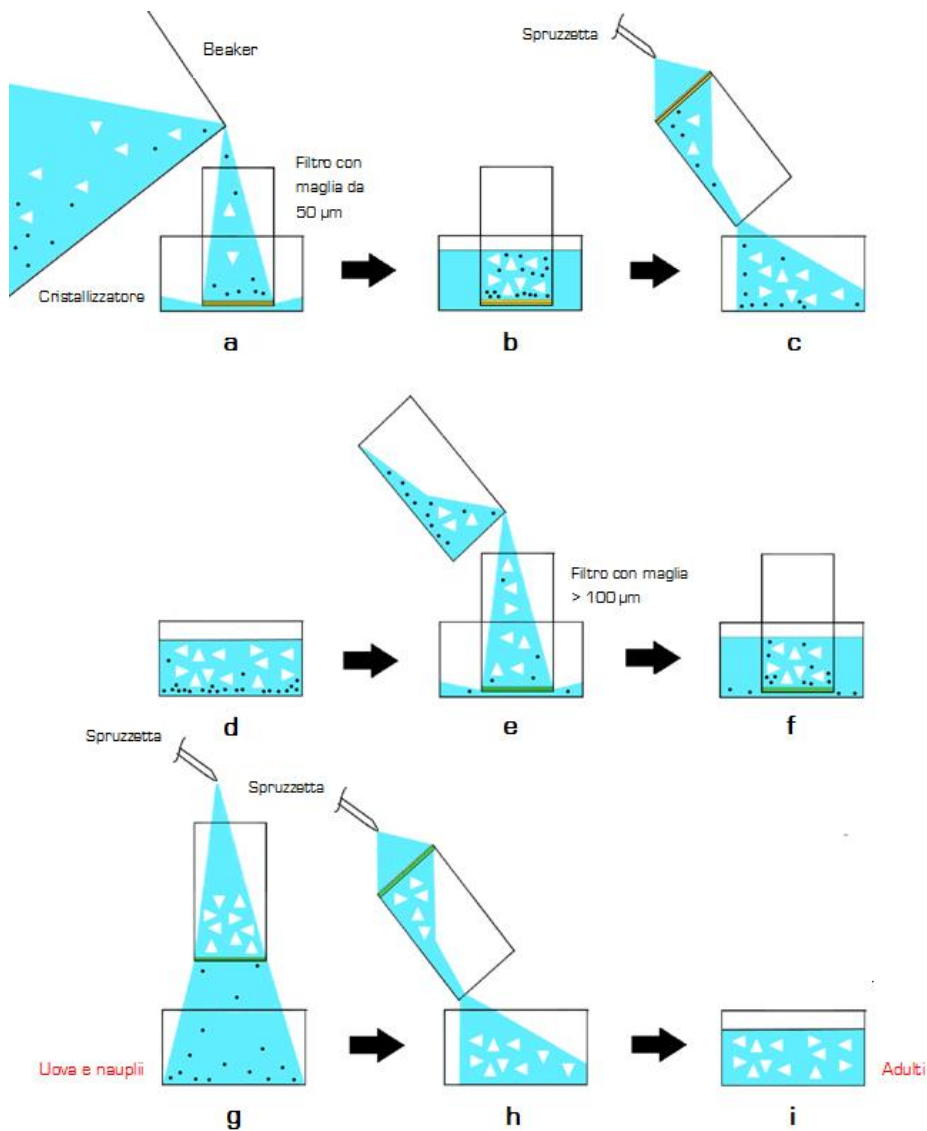


Figura 7: Procedura per la raccolta delle uova: [a, b] filtrazione dell'intero volume della coltura contenente gli adulti mediante un filtro con maglia da 50 µm che trattiene sia le uova che gli adulti; [c, d] trasferimento nel cristallizzatore di adulti e uova trattenuti dal filtro mediante l'uso di una spruzzetta; [e, g] filtrazione del contenuto del cristallizzatore mediante filtro con maglia superiore a 100 µm che trattiene gli adulti ma lascia passare le uova; [h, i] trasferimento degli adulti trattenuti dal filtro in un altro cristallizzatore. Triangolo bianco = adulto; cerchio nero = uovo o primo stadio naupliare.

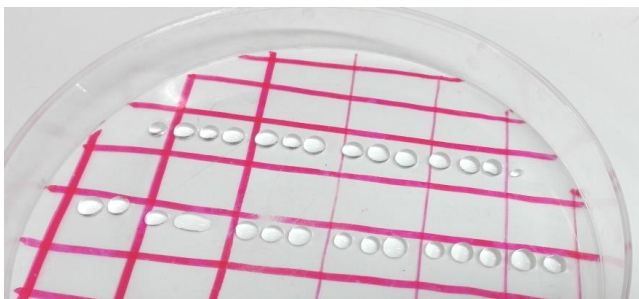
I beaker sono quindi mantenuti alle stesse condizioni di temperatura, illuminazione e fotoperiodo dell'allevamento principale. Per incrementare la produzione di uova si può prevedere una incubazione al buio per le prime 48 h.

Ogni 24 h la coltura contenente gli adulti di *A. tonsa* viene filtrata attraverso un filtro da 50  $\mu\text{m}$  per concentrare uova e individui in un volume d'acqua ridotto (Fig. 7a-d), che sarà poi ulteriormente filtrato con filtro di maglia  $\geq 100 \mu\text{m}$  per trattenere tutti gli organismi eccetto le uova e gli organismi allo stadio naupliare I (Fig. 7e-i).

Per evitare che le uova schiudano, le uova raccolte nei cristallizzatori devono essere rapidamente trasferite in frigorifero fino a quando non si è pronti ad allestire il test. Durante la fase di raccolta delle uova è comunque preferibile utilizzare FSW preventivamente raffreddata in frigorifero e posizionare il cristallizzatore con le uova raccolte su una superficie fredda.

Le uova raccolte ogni giorno potranno essere conservate in frigorifero per un periodo non superiore ai 30 giorni fino all'allestimento del test (Vitiello et al., 2016). Oltre tale periodo si può verificare un abbassamento della percentuale di schiusa a valori inferiori a quanto richiesto per la validità del test ( $\geq 75 \%$ ; si veda Paragrafo 4.6) (Gorbi et al., 2012; ISO 16778, 2015; Vitiello et al., 2016).

Il giorno dell'allestimento della prova le uova raccolte nei giorni precedenti vengono mescolate e risciacquate con FSW. La sospensione di uova in FSW è mantenuta in agitazione (mediante leggera aerazione o per semplice, delicata, agitazione manuale) per rendere la distribuzione delle uova nel volume d'acqua relativamente omogenea. La densità della sospensione è determinata mediante conteggio di volumi definiti (ad esempio 500  $\mu\text{L}$ ), suddividendo tale volume in serie di piccole gocce. Si suggerisce di utilizzare una pipetta automatica o Pasteur per la distribuzione delle gocce, in modo da rendere più agevole la conta allo stereo microscopio (Fig. 8).



*Figura 8: Procedura per la valutazione della densità di uova e nauplii mediante l'utilizzo di una piastra Petri: il volume di sospensione prelevato con la pipetta automatica (ad esempio 500  $\mu\text{L}$ ) viene suddiviso in piccole gocce di pochi  $\mu\text{L}$  (nell' esempio della foto 29 gocce per un volume medio di 18-20  $\mu\text{L}$  ciascuna) per facilitare la conta. Con una sola grande goccia da 500  $\mu\text{L}$  le uova tenderebbero ad ammassarsi, rendendone più difficoltoso il conteggio.*

Il numero di uova da incubare in ciascuna camera test deve essere compreso tra 50 e 80. Per il calcolo del volume di sospensione di uova da aggiungere nelle camere test si veda il BOX 2. Una stima accurata della densità della sospensione, mantenuta in continua leggera agitazione, può assicurare un numero abbastanza costante di uova ad ogni prelievo con una riduzione dei tempi di allestimento.

Una volta calcolato il volume di sospensione da prelevare è consigliabile effettuare un conteggio per verificare la media del numero di uova effettivamente contenuto in quel dato volume di sospensione, da ripetere durante l'allestimento ogni 20 camere test. L'eliminazione di eventuali naupli (presenti a seguito della schiusa di parte delle uova) è necessaria qualora il numero di naupli (e quindi di uova schiuse) sia > 5 % del numero di uova totali.

### **BOX 2 - 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 quindi la loro 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. 9).

Oltre alla linea centrale nella carta sono presenti due limiti (Fig. 9), 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):

$$CL = E[W];$$

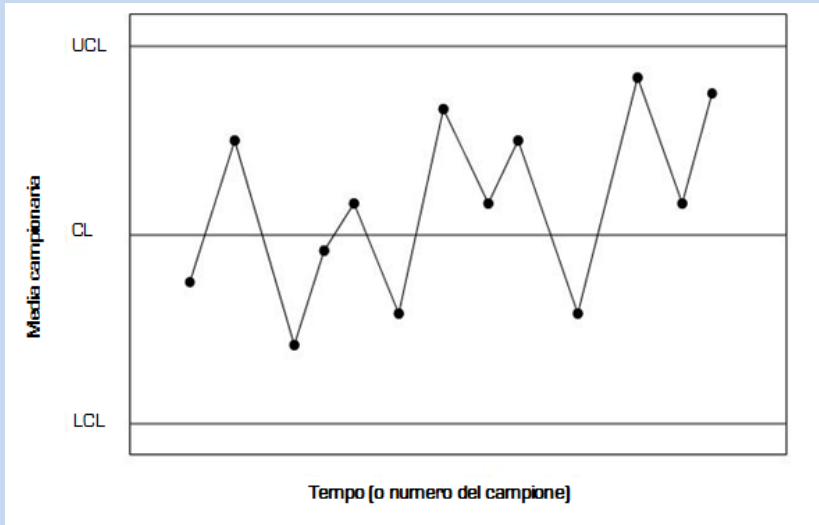
$$UCL = E[W] + 3 (\text{Var}[W])^{1/2};$$

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

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.

Oltre ai limiti di controllo, possono essere presenti dei limiti più interni chiamati limiti di guardia o sorveglianza. Tali limiti chiamati UWL (Upper Warning Limit) e LWL (Lower Warning Limit), si collocano a  $\pm 2$  scarti quadratici medi dalla misura statistica di

interesse. Un valore della statistica campionaria interno ai limiti di controllo, ma esterno ai limiti di guardia è un evento che pur non essendo un segnale di fuori controllo ha una certa probabilità di verificarsi, quindi sono opportuni accertamenti sul processo.



*Figura 9: Esempio di rappresentazione grafica di una carta di controllo.*

Se nell'esecuzione del saggio è presente una variabilità sistematica, e quindi qualcosa che determina errori nella produzione dei 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 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 Prova con composto chimico di riferimento in fase liquida (LDR-L)

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

Per il controllo positivo si suggerisce l'utilizzo del 3,5-DCP, come previsto dal protocollo ISO 16778 (2015).

Le concentrazioni comunemente utilizzate e idonee alla individuazione di una EC50 sono 50, 120, 187, 375, 450 µg/L. Alla prova occorre aggiungere il controllo negativo in acqua di mare filtrata a 0,22 µm (FSW), corrispondente alla concentrazione 0 µg/L.

Le soluzioni in FSW devono essere preparate a partire da una soluzione stock in acqua deionizzata o di purezza equivalente (ISO 16778, 2015).

Al momento dell'allestimento in ciascuna camera test si aggiungono:

- 25 mL di FSW;
- l'aliquota di sospensione concentrata di uova tale da aggiungere un numero di uova compreso tra 50 e 80 (volume calcolato come riportato precedentemente nel BOX 3);
- l'aliquota di coltura algale concentrata, tale da avere una concentrazione finale di  $5 \times 10^4$  cell/mL;
- l'aliquota della soluzione stock di 3,5-DCP;
- una ulteriore aliquota variabile di FSW per portare il volume totale a 40 mL.

Nel caso del controllo negativo si omette l'aliquota di soluzione stock di 3,5-DCP.

Nella Tabella 3 si riportano alcuni esempi del numero di uova, dei volumi delle colture algali (definiti sulla base della densità cellulare della coltura madre) e dei volumi di acqua necessari per l'allestimento del test in fase acquosa.

In particolare, supponendo di avere una soluzione madre di 1 g 3,5-DCP/L, una coltura algale di *R. baltica* con densità di  $1,25 \times 10^6$  cell/mL e una sospensione di uova con densità di 836 uova/mL, i volumi da utilizzare per allestire le camere test sono riportati in Tabella 4.

#### **BOX 3 - Esempio di calcolo del volume di sospensione di uova**

Numero di uova contate in 8 repliche di 500 µL di volume:

390; 435; 490; 370; 385; 445; 425; 405

Valore Medio = 418 uova/500 mL

418 uova: 500 µL = 70 uova: X µL

$X = (500 \mu\text{L} * 70 \text{ uova}) / 418 \text{ uova} = 83,7 \mu\text{L}$

Verifica del numero di uova effettivamente raccolto prelevando 84 µL:

64; 60; 69; 66; 63; 49; 68; 73

Valore medio = 64 uova

Tabella 3: Esempio di allestimento del saggio in fase acquosa LDR-L. Numero di uova e volumi di coltura algale e di acqua totali necessari per l'allestimento. Sono riportati i volumi di coltura algale da utilizzare a seconda della concentrazione della coltura di partenza, per un volume totale finale di incubazione di 40 ml. Tutti i volumi sono espressi in ml.

Componente		FASE ACQUOSA (ISO 16778, 2015)			
		Replica	Controllo Negativo (12 repliche)	Controllo Positivo (7 concentrazioni x 5 repliche)	Totali
Numero di uova		50-80	600-960	1.750-2.800	2.350-3.760
Volumi di <i>Rhodomonas baltica</i> (mL)	5,0 x 10 <sup>6</sup> cell/mL	0,4	4,8	14	18,8
	2,5 x 10 <sup>6</sup> cell/mL	0,8	9,6	28	37,6
	1,25 x 10 <sup>6</sup> cell/mL	1,6	19,2	56	75,2
	6,25 x 10 <sup>5</sup> cell/mL	3,2	38,4	112	150,4
	3,125 x 10 <sup>5</sup> cell/mL	6,4	76,8	224	300,8
Volumi di FSW (mL)		40	960	1.400	2.360



Tabella 4: Esempio di allestimento del saggio con composto chimico di riferimento in fase acquosa LDR-L. E' considerata una soluzione madre di 3,5-DCP di 1 g/L, una coltura di *Rhodomonas baltica* di  $1,25 \times 10^6$  cell/mL ed una sospensione di uova alla densità di 836 uova/mL.

Concentrazione di 3,5-DCP finale da testare ( $\mu\text{g/L}$ )	FSW (mL)	3,5-DCP ( $\mu\text{L}$ )	<i>R. baltica</i> (mL)	Sospensione uova ( $\mu\text{L}$ )	Volume finale (mL)
50	38,31	2	1,6	83,73	40
120	38,31	4,8	1,6	83,73	40
187	38,31	7,48	1,6	83,73	40
375	38,30	15	1,6	83,73	40
450	38,30	18	1,6	83,73	40

Le condizioni di incubazione devono essere uguali a quelle utilizzate nel test LDR su fase solida (vedi Paragrafo 4.2).

Dopo 48 h dall'inizio del test si aggiunge una ulteriore aliquota di:

- soluzione di 3,5-DCP (il volume per ogni concentrazione sarà quindi raddoppiato);
- coltura algale concentrata di *R. baltica*, tale da determinare una concentrazione finale di  $5 \times 10^4$  cell/mL;
- FSW portando il volume finale a 80 mL in ciascuna camera test.

Dopo 5 giorni di incubazione si procede come riportato per il saggio su fase solida, per verificare se terminare o proseguire il test fino al raggiungimento del rapporto 1:1 tra naupli e copepoditi.

Eccessive evaporazioni dell'acqua possono essere evitate coprendo i contenitori con un coperchio o con Parafilm®, non ermeticamente, in modo da favorire la circolazione di aria nella camera test.

#### 4.4 Valutazione della percentuale di schiusa

Per la valutazione della percentuale di schiusa delle uova 3 gruppi da 50 - 80 uova devono essere incubati in 40 mL di FSW alle stesse condizioni di temperatura e fotoperiodo del test. Dopo 72 h si procede con la determinazione del numero di uova schiuse (che appaiono come membrane vuote in cui è spesso possibile distinguere una frattura) mediante microscopio ottico invertito ed obiettivo 4x e 10x.

La percentuale di successo di schiusa è quindi calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\% \text{ di schiusa} = [N. \text{ uova schiuse} / (N. \text{ uova schiuse} + N. \text{ uova non schiuse})] * 100.$$

#### 4.5 Esecuzione del test LDR-S

In ciascuna camera test, preparata il giorno precedente e contenente sedimento e FSW, viene aggiunto un volume di sospensione di uova e soluzione algale, calcolati in precedenza, per ottenere le concentrazioni necessarie. Il volume finale di acqua FSW deve essere di 80 mL.

E' consigliabile incubare le uova in un filtro cilindrico con maglia da 50  $\mu$ L posizionato all'interno della camera test in modo che la maglia sia a contatto con il sedimento (Fig. 10). L'utilizzo del filtro facilita il recupero e l'osservazione degli organismi per la valutazione del loro stadio di sviluppo.

Nella Tabella 5 si riportano alcuni esempi del numero di uova, dei volumi delle colture algali (definiti sulla base della densità cellulare della coltura di partenza) e dei volumi di acqua necessari per l'allestimento del test in fase solida.

Le camere test contenenti le uova di *A. tonsa* vengono quindi incubate in camera termostata a temperatura costante ( $20 \pm 1$  °C), bassa intensità luminosa (500 - 1.000 lux) e fotoperiodo di 16 h L : 8 h D (ISO 16778, 2015).

Dopo 3 giorni di incubazione in ciascuna camera test deve essere aggiunto un volume definito di coltura algale tale da ottenere una concentrazione finale di  $5 \times 10^4$  cell/mL; il volume massimo che può essere aggiunto è pari al 10 % del volume finale del contenitore.

Eccessive evaporazioni dell'acqua possono essere evitate coprendo i contenitori con un coperchio o con Parafilm®, non ermeticamente in modo da favorire la circolazione di aria nella camera test.



*Figura 10: Camera test per il test LDR-S contenente sedimento sul fondo e il tubo di plexiglass con maglia filtrante da 50  $\mu$ m (da Buttino et al., 2018 modificato).*

#### 4.6 Parametri da monitorare

I parametri da monitorare, ossigeno disciolto, pH, salinità e temperatura, devono essere misurati in almeno una replica di tutti i campioni e del controllo, all'inizio e alla fine della prova e al momento dell'aggiunta delle alghe.

La percentuale di saturazione dell'ossigeno disciolto deve essere  $\geq 70$  % (ISO 16778, 2015); la salinità nel controllo non deve variare più del 10 % del valore iniziale, il pH deve ricadere nell'intervallo  $8.0 \pm 0,3$  e la temperatura mantenersi a  $20 \pm 1$  °C.

Tabella 5: Esempio di allestimento del saggio LDR-S. Numero di uova e volumi di coltura algale e di acqua totali per l'allestimento del test. Sono riportati i volumi di coltura algale da utilizzare a seconda della concentrazione della coltura di partenza, per un volume totale finale di incubazione di 80 ml. Tutti i volumi sono espressi in ml.

Componente		FASE SOLIDA			
		Replica	Controllo Negativo (12 repliche)	Campione (6 repliche)	Totali
Numero di uova		50-80	600-960	300-480	900-1.440
Volumi di <i>Rhodomonas baltica</i> (mL)	5,0 x 10 <sup>5</sup> cell/mL	0,8	9,6	4,8	14,4
	2,5 x 10 <sup>5</sup> cell/mL	1,6	19,2	9,6	24
	1,25 x 10 <sup>5</sup> cell/mL	3,2	38,4	19,2	57,6
	6,25 x 10 <sup>5</sup> cell/mL	6,4	76,8	38,4	115,4
	3,125 x 10 <sup>5</sup> cell/mL	12,8	153,6	76,8	230,4
FSW (mL)		80	960	480	1.440

#### 4.7 Termine del test

Il saggio su sedimento è condotto prevedendo un periodo di esposizione di 6 giorni. Al termine dei 6 giorni di incubazione deve essere verificato lo stadio di sviluppo degli esemplari di *A. tonsa* esposti al sedimento di controllo (controllo negativo): il filtro contenuto in 3 camere test viene sollevato, sciacquato con FSW e quindi rovesciato per trasferire, con l'aiuto di una spruzzetta, gli individui trattenuti dal filtro in un cristallizzatore (fino ad un volume di 60 mL circa). Gli organismi sono poi fissati aggiungendo lo 0,1 % di Lugol o il 10 % di alcool etilico (al 95 %).

#### 4.8 Lettura del test

Per effettuare la lettura del test si procede alla conta di naupli e copepoditi nelle 3 repliche, mediante osservazione allo stereo microscopio. Se il rapporto naupli: copepoditi è di 1 : 1, si procede terminando il test anche per tutte le altre repliche del controllo negativo, per il controllo positivo in fase acquosa e per i campioni. Diversamente (rapporto 1 : 1 tra naupli e copepoditi non raggiunto, con una netta prevalenza di naupli)

si attende un ulteriore giorno, ripetendo la procedura il giorno successivo (per questo è necessario disporre di un numero congruo di controlli negativi da sacrificare).

#### 4.9 Elaborazione dei dati

Il numero totale di naupli e copepoditi a fine test è utilizzato per calcolare la percentuale di *Inibizione della Sopravvivenza* secondo la formula riportata di seguito:

$$\text{Inibizione della Sopravvivenza (\%)} = [1 - (TO \text{ campione} / TO \text{ Controllo})] * 100$$

dove TO= numero Totale degli Organismi (naupli e copepoditi) rilevati a fine test.

Il *Larval Development Rate* (LDR) è calcolato mediante la formula:

$$LDR = N. \text{ copepoditi} / TO$$

La percentuale di *Inibizione dello Sviluppo Larvale* rispetto al controllo registrata nel campione di sedimento testato è calcolata utilizzando la seguente equazione:

$$\% \text{ Inibizione dello sviluppo larvale} = [1 - (LDR \text{ campione} / LDR \text{ controllo})] * 100$$

in cui:

- LDR campione = valore di LDR calcolato per il campione testato
- LDR controllo = valore di LDR calcolato per il sedimento di controllo.

#### 4.10 Parametri di validazione del test

Affinché la prova sia considerata valida, devono essere rispettati i seguenti criteri di validità:

- il successo di schiusa nei cristallizzatori di controllo deve essere  $\geq 75\%$ ;
- il valore medio di LDR registrato per il controllo negativo deve rientrare nel range  $0,6 \pm 0,2$  al termine dell'esposizione;
- nel test LDR-L la media di organismi sopravvissuti nel controllo alla fine del test deve essere maggiore o uguale al 70% delle uova schiuse;
- il valore dell'EC50 con il composto chimico di riferimento deve ricadere nella carta di controllo del laboratorio (BOX 4).

#### BOX 4 - Valori di riferimento per il 3,5-DCP

Nel protocollo ISO 16778 (2015) è riportato come valore di EC50 per l'inibizione dello sviluppo larvale con 3,5-DCP in fase liquida (LDR-L) un range di  $500 \pm 300 \mu\text{g/L}$  (alla salinità del 20 ‰ a 20 °C).

Un intervallo di  $130 - 210 \mu\text{g/L}$  per l'EC50 con il 3,5-DCP è stato riportato da Andersen et al. (2001) (salinità 18 ‰ a 20 °C) e di  $33 - 204 \mu\text{g/L}$  da Picone et al. (2018) (salinità 25 ‰ a  $20 \pm 1$  °C) per il ceppo danese di *A. tonsa*. Ad oggi, nei laboratori ISPRA di Livorno il valore di EC50 con il composto chimico di riferimento (3,5-DCP) per il ceppo mediterraneo di *A. tonsa*, ricade nell'intervallo  $21,22 - 293,65 \mu\text{g/L}$  (valore medio =  $157,44 \pm 136,21 \mu\text{g/L}$ ).

## 5. BIBLIOGRAFIA

---

- Alver M.O., Storøy W., Bardal T., Overrein I., Onsøyen M.K., Tennøy T., Øie G., 2011. Automatic measurement of *Acartia tonsa* nauplii density, and estimation of stage distribution. *Aquaculture* 313: 100–106.
- Andersen H.R., Wollenberger L., Halling-Sørensen B., Kusk K.O., 2001. Development of copepod nauplii to copepodites. A parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environ Toxicol Chem*, 20: 2821–2829.
- ASTM, 1994. Standard guide for designing biological tests with sediments. ASTM E1525: 22 pp.
- ASTM, 2004. Standard guide for conducting static acute toxicity test starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. ASTM E724: 21pp.
- Baetens J., 2015. Culturing *Acartia tonsa* Dana and acute testing with copper on different life cycle stages. *Master's thesis*. Ghent University, Faculty of Bioscience Engineering. Belgium.
- Beaugrand G. and Reid P.C., 2012. Relationship between North Atlantic salmon, plankton, and Hydroclimatic change in the Northeast Atlantic ICES J Mar Sci, 69: 1549-1562.
- Bianchi F., Aciri F., Aubry F. B., Berton A., Boldrin A., Camatti E., Cassin D., Comaschi A., 2003. Can plankton communities be considered as bioindicators of water quality in the lagoon of Venice? *Mar Pollut Bull*, 46: 964-971.
- Buttino I., De Rosa G., Carotenuto Y., Mazzaella M., Ianora A., Esposito F., Vitiello V., Quaglia F., La Rotonda M.I., Miralto, A., 2008. Aldehyde-encapsulating liposomes impair marine grazer survivorship. *J Exp Biol*, 211: 1426-1433.
- Buttino I., De Rosa G., Carotenuto Y., Mazzella M., Ianora A., Esposito F., Vitiello V., Quaglia F., La Rotonda M.I., Miralto A., 2008. Aldehyde-encapsulating liposomes impair marine grazer survivorship. *J. Exp. Biol.*, 211: 1426-1433.
- Buttino I., Vitiello V., Macchia S., Scuderi A., Pellegrini D., 2018. Larval development ratio test with the calanoid copepod *Acartia tonsa* as a new bioassay to assess marine sediment quality. *Ecotox Environ Safe*, 149: 1–9.
- Calliari D., Borg M., Thor P., Gorokhova E., Tiselius P., 2008. Instantaneous salinity reductions affect the survival and feeding rates of the co-occurring copepods *Acartia tonsa* Dana and *A. clausi* Giesbrecht differently. *J Exp Mar Biol Ecol*, 362: 18-25.
- Carotenuto Y., Ianora A., Buttino I., Romano G., Miralto A., 2002. Is post-embryonic development in the copepod *Temora stylifera* negatively affected by diatom diets? *J Exp Mar Biol Ecol*, 276: 49–66.
- Castro-Longoria E., 2001. Comparative observations on the external morphology of subitaneous and diapause eggs of *Acartia* species from Southampton water. *Crustaceana*, 74: 225–236.
- Chen F. and Marcus N.H., 1997. Subitaneous, diapause, and delayed hatching eggs of planktonic copepods from the northern Gulf of Mexico: morphology and hatching success. *Mar Biol*, 127: 587–597.

Comaschi A., Acri F., Bianchi F., Bressan M., Camatti E., 2000. Temporal changes of species belonging to *Acartia* genus (Copepoda: Calanoida) in the Northern Basin of the Venice Lagoon. *Boll Mus Civ Stor Nat Ven*, 50: 189–193.

DM 74, 2011. Decreto n. 74 del 25 febbraio 2011 del Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare, pubblicato sul Supplemento ordinario n. 87 alla Gazzetta ufficiale del 31 marzo 2011: Definizione delle procedure per il riconoscimento di idoneità dei prodotti assorbenti e disperdenti da impiegare in mare per la bonifica della contaminazione da idrocarburi petroliferi.

DM 173, 2016. Decreto n. 173 del 15 luglio 2016 del Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare, pubblicato sul Supplemento ordinario n. 208 alla "Gazzetta Ufficiale del 6 settembre 2016 - Serie generale Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini.

Drillet G., Iversen M.H., Sørensen T.F., Ramløv H., Lund T., Hansen B.W., 2006a. Effect of cold storage upon eggs of a calanoid copepod, *Acartia tonsa* (Dana) and their offspring. *Aquaculture*, 254: 714–729.

Drillet G., Jørgensen N.O.G., Sørensen T.F., Ramløv H., Hansen B.W., 2006b. Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as relevant live feed organisms in marine larviculture. *Aquac Res*, 37: 756–772.

Drillet G., Lindley L.C., Michels A., Wilcox J., Marcus N.H., 2007. Improving cold storage of subitaneous eggs of the copepod *Acartia tonsa* Dana from the Gulf of Mexico (USA-Florida). *Aquac Res*, 38: 457–466.

Drillet G., Goetze E., Jepsen P.M., Højgaard J.K., Hansen B.W., 2008a. Strain-specific vital rates in four *Acartia tonsa* cultures, I: strain origin, genetic differentiation and egg survivorship. *Aquaculture*, 280:109–116.

Drillet G., Jepsen P.M., Højgaard J.K., Jørgensen N.O.G., Hansen B.W., 2008b. Strain specific vital rates in four *Acartia tonsa* cultures II: life history traits and biochemical contents of eggs and adults. *Aquaculture*, 279:47–54.

Drillet G., Frouël S., Sichlau M.H., Jepsen P.M., Højgaard J.K., Joarder A.K., Hansen B.W., 2011a. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. *Aquaculture*, 315: 155–166.

Drillet G., Hansen B.W., Kiørboe T., 2011b. Resting egg production induced by food limitation in the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Limnol Oceanogr*, 56: 2064-2070.

Farabegoli A., Ferrari I., Manzoni C., Pugnetti A., 1989. Prima segnalazione nel Mare Adriatico del copepode calanoide *Acartia tonsa* DANA. *Nova Thalassia*, 10: 207-208.

Franco S.C., Augustin C.B., Geffen A.J., Dinis M.T., 2017. Growth, egg production and hatching success of *Acartia tonsa* cultured at high densities. *Aquaculture*, 468: 569–578.

Gatten R.R., Sargent J.R., Forsberg T.E.V., O'Hara S.C.M., Corner E.D.S, 1980. On the nutrition and metabolism of zooplankton. XIV. Utilization of lipid by *Calanus helgolandicus* during maturation and reproduction. *J Mar Biol Ass UK*, 60: 391-399.

Gaudy R. and Vinas M., 1985. Première signalization en Méditerranée du copépode pélagique *Acartia tonsa*. *Rapp Comm Int Mer Médit*, 29(9): 227-229.

- Giese A.C., 1966. Lipids in the economy of marine invertebrates. *Physiol Rev*, 46: 244-298.
- Gorbi G., Invidia M., Savorelli F., Faraponova O., Giacco E., Cigar M., Buttino I., Leoni T., Prato E., Lacchetti I., Sei S., 2012. Standardized methods for acute and semichronic toxicity tests with the copepod *Acartia tonsa*. *Environ Toxicol Chem*, 31: 2023–2028.
- Grice G.D. and Marcus N.H., 1981. Dormant eggs of marine copepods. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev*, 19: 125–140.
- Guillard R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp. 26-60. In Smith W.L. and Chanley M.H. (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA.
- Hagemann A., Øie G., Evjemo J.O., Olsen Y., 2016. Effects of light and short-term temperature elevation on the 48-h hatching success of cold-stored *Acartia tonsa* Dana eggs. *Aquacult Int*, 24(1): 57-68.
- Hansen B.W. and Drillet G., 2013. Comparative oxygen consumption rates of subitaneous and delayed hatching eggs of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *J Exp Mar Biol Ecol*, 442: 66–69.
- Hansen B.W., Buttino I., Cunha M.E., Drillet G., 2016. Embryonic cold storage capability from seven strains of *Acartia* spp. isolated in different geographical areas. *Aquaculture*, 457: 131–139.
- Holmstrup M., Overgaard J., Sørensen T.F., Drillet G., Hansen B.W., Ramløv H., Engell-Sørensen K., 2006. Influence of storage conditions on viability of quiescent copepod eggs [*Acartia tonsa* Dana]: effects of temperature, salinity and anoxia. *Aquac Res*, 37: 625–631.
- Holste L. and Peck M.A., 2006. The effects of temperature and salinity on egg production and hatching success of Baltic *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida): a laboratory investigation. *Mar Biol*, 148: 1061–1070.
- Ianora A., Poulet S.A., Miralto A., 2003. The effects of diatoms on copepod reproduction. *Phycologia*, 42: 351–363.
- Ianora A., Miralto A., Poulet S.A., Carotenuto Y., Buttino I., Romano G., Casotti R., Pohnert G., Colucci-D'Amato L., Terrazzano G., Smetacek V., 2004. Aldehyde suppression of copepod recruitment in blooms of a ubiquitous planktonic diatom. *Nature*, 429: 403–407.
- ICRAM 2006. Guida al riconoscimento del plancton dei mari italiani. (<http://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/manuali-e-linee-guida/guida-al-riconoscimento-del-plancton-dei-mari>)
- Ihara P.M., Pinho G.L.L., Fillmann G., 2010. Avaliação do copépodo *Acartia tonsa* (Dana, 1849) como organismo-teste para ensaios de toxicidade crônica. *J Braz Soc Ecotoxicol*, 5(1): 27-32.
- Invidia M., Sei S., Gorbi G., 2004. Survival of the copepod *Acartia tonsa* following egg exposure to near anoxia and sulfide at different pH values. *Mar Ecol Prog Ser*, 276: 187–196.
- ISO 14669, 1999. Water quality — Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). ISO, Genève, Switzerland.

ISO 16712, 2005. Water quality - Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods. ISO, Genève, Switzerland.

ISO 16778, 2015. Water quality-Calanoid copepod development test with *Acartia tonsa*. ISO/FDIS16778. Calanoid copepod early-life stage test with *Acartia tonsa*. ISO, Genève, Switzerland.

ISPRA, 2010. Metodologie di studio del Plancton Marino. Manuali e Linee Guida 56/2010, 625 pp.

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

Jakobsen H.H., Halvorsen E., Hansen B.W., Visser A., 2005. Effects of prey motility and concentration on feeding in *Acartia tonsa* and *Temora longicornis*: the importance of feeding modes. *J Plankton Res*, 27: 775-785.

Jepsen P.M., Andersen N., Holm T., Jørgensen A.T., Højgaard J.K., Hansen B.W., 2007. Effects of adult stocking density on egg production and viability in cultures of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *Aquac Res*, 38: 764-772.

Jónasdóttir S.H., 1994. Effects of food quality on the reproductive success of *Acartia tonsa* and *Acartia hudsonica*: laboratory observations. *Mar Biol*, 121: 67-81.

Katajisto T., 2006. Benthic resting eggs in the life cycles of calanoid copepods in the northern Baltic Sea. PhD Thesis, University of Helsinki.

Kester D.R., Duedall I.W., Connors D.N., Pytkowicz R.M., 1967. Preparation of artificial seawater. *Limnol Oceanogr*, 12: 176-179.

Kjørboe T., Mohlenberg F., Hamburger K., 1985. Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. *Mar Ecol Prog Ser*, 26: 85-97.

Kovatch C.E., Chandler T., Coull B.C., 1999. Utility of a full life-cycle copepod bioassay approach for assessment of sediment-associated contaminant mixtures. *Marine Pollution Bulletin*, Vol 38 (8): 692-701.

Kusk K.O. and Wollenberger L., 1999. Fully defined saltwater medium for cultivation of and toxicity testing with marine copepod *Acartia tonsa*. *Environ Toxicol Chem*, 18:1564-1567.

Landry M.R., 1975. Dark inhibition of egg hatching of marine copepod *Acartia clausi* Giesbr. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 20: 43-47.

Laurer M.M. and Bianchini A., 2010. Chronic copper toxicity in the estuarine copepod *Acartia tonsa* at different salinities. *Environ Toxicol Chem*, 29(10): 297-303.

Leandro S.M., Tiselius P., Queiroga H., 2006. Growth and development of nauplii and copepodites of the estuarine copepod *Acartia tonsa* from southern Europe (Ria de Aveiro, Portugal) under saturating food conditions. *Mar Biol*, 150: 121-129.

Lee W., 1977. Some laboratory cultured crustaceans for marine pollution studies. *Mar Poll Bull*, 8 (11): 258-259.

Lotufo G.R., 1997. Toxicity of sediment-associated PAHs to an estuarine copepod: effect on survival, feeding, reproduction and behavior. *Marine Environmental Research*, Vol 44(2):149-166.



- Marcus N.H. and Wilcox J.A., 2007. A guide to the meso-scale production of the copepod *Acartia tonsa*. Fla. Sea Grant 27. [http://www.flseagrant.org/program\\_areas/aquaculture/copepod/about.htm](http://www.flseagrant.org/program_areas/aquaculture/copepod/about.htm)
- Marshall S.M. and Orr A.P., 1972. The biology of a marine copepod *Calanus finmarchicus* (Gunnerus). Oliver and Boyd, Edingburgh and London.
- Mauchline, J., 1998. The Biology of Calanoid Copepods. Elsevier Academic London, UK, pp. 710
- Medina M. and Barata C., 2004. Static-renewal culture of *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) for ecotoxicological testing. *Aquaculture*, 229: 203–213.
- Miralto A., Barone G., Romano G., Poulet S.A., Ianora A., Russo G.L., Buttino I., Mazzarella G., Laabir M., Cabrini M., Giacobbe M.G., 1999. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature*, 402: 173–176.
- Murphy J.A. and Cohen R.E., 1978. A guide to the developmental stages of common coastal, Georges Bank and Gulf of Maine Copepods. National Marine Fisheries Service, Northeast Fisheries Center, Woods Hole Laboratory, Woods Hole, MA 02543, Laboratory Reference No. 78-53.
- Norton B.L., Lewis M.A., Mayer F.L., 1999. Storage duration and temperature and the acute toxicities of estuarine sediments to *Mysidopsis bahia* and *Leptocheirus plumulosus*. *Bull. Environ Contam Toxicol*, 63: 157-166.
- Olivotto I., Gaiot G., Holste L., Tulli F., Cardinaletti G., Piccinetti C.C., Gioacchini G., Carnevali O., 2012. Are *Acartia tonsa* cold-stored eggs a suitable food source for the marine ornamental species *Amphiprion polymnus*? A feeding study. *Aquacul Nutr*, 18(6): 685-696.
- Parrish K.K. and Wilson D.F., 1978. Fecundity studies on *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) in standardized culture. *Mar Biol*, 46: 65–81.
- Perez-Landa V. and Simpson S.L., 2011. A short life-cycle test with the epibenthic copepod *Nitocra spinipes* for sediment toxicity assessment. *Environ Toxicol and Chemistry*, Vol 30 (6): 1430-1439.
- Picone M., Bergamin M., Delaney E., Volpi Ghirardini A., Kusk K.O., 2018. Testing lagoonal sediments with early life stages of the copepod *Acartia tonsa* (Dana): An approach to assess sediment toxicity in the Venice Lagoon. *Ecotox Environ Safe*, 147(24): 217-227.
- Pinho G.L.L. and Bianchini L., 2010. Acute copper toxicity in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*: implications for the development of an estuarine and marine biotic ligand model. *Environ Toxicol Chem*, 29: 1834–1840.
- Saiz E., 1994. Observations on the free-swimming behavior of the copepod *Acartia tonsa*: effects of food concentration and turbulent water. *Limnol Oceanogr*, 39: 1566-1578.
- Scheef L.P. and Marcus N.H., 2010. Occurrence and significance of copepod resting egg accumulation in seagrass sediments. *Mar Ecol Prog Ser*, 407:125–134.
- Schipp G.R., Bosmans J.M.P., Marshall A.J., 1999. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*, 174: 81–88.
- Sei S., Rossetti G., Villa F., Ferrari I., 1996. Zooplankton variability related to environmental changes in a eutrophic coastal lagoon in the Po Delta. *Hydrobiologia*, 329: 45-55.

- Sei S., Invidia M., Gorbi G., 2006. Near anoxia and sulfide as possible factors influencing the spatial distribution of *Acartia tonsa* and *Acartia clausi*. Comparative evaluation of egg tolerance. *J Exp Mar Biol Ecol*, 337(2): 121-130.
- Sei S., Invidia M., Giannetto M., Gorbi G., 2016. *Acartia tonsa* eggs as a biomonitor to evaluate bioavailability/toxicity of persistent contaminants in anoxic/sulfidic conditions: The case of cadmium and nickel. *Ecotox Environ Safe*, 132: 1–8.
- Simpson A.L. and Spadaro D.A., 2011. Performance and sensitivity of rapid sublethal sediment toxicity tests with the amphipod *Melita plumulosa* and copepod *Nitocra spinipes*. *Environ Toxicol and Chemistry*, Vol 30 (10), 2326-2334.
- Stoecker D.K. and Egloff D.A., 1987. Predation by *Acartia tonsa* Dana on planktonic ciliates and rotifers. *J Exp Mar Biol Ecol.*, 110: 53–68.
- Støttrup J.G. and Jensen J., 1990. Influence of algal diet on feeding and egg production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *J Exp Mar Biol Ecol*, 141: 87-105.
- Støttrup J.G., 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquac Res*, 31: 703-711.
- Støttrup, J.G., 2006. Review on status and progress in rearing copepods for marine larviculture ñ Advantages and Disadvantages among calanoid, harpacticoid and cyclopoids copepods. In: I.Elizabeth Cruz Suarez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, G. Martha , Nieto Lopez, David A. Villarreal Cavazos, Anna C. Puello Cruz y Armando Garcia Ortega. *Advances en Nutricion Acuicola. VIII Symposium Internacional Acuicola 15-17 Noviembre, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Mexico.*
- Tackx M. and Polk P., 1982. Feeding of *Acartia tonsa* Dana (Copepoda, Calanoida): predation on nauplii of *Canuella perplexa* T. et A. Scott (Copepoda, Harpacticoida) in the sluice-dock at Ostend. *Hydrobiologia* 94: 131-133.
- Teixeira P.F., Kaminski S.M., Avila T.R., Cardozo A.P., Bersano J.G.F, Bianchini A., 2010. Diet influence on egg production of the copepod *Acartia tonsa*. *An Acad Bras Cienc*, 82(2): 333-339.
- Toledo J.D., Golez M., Ohno A., 2005. Studies on the use of copepods in the semi-intensive seed production of Grouper *Epinephelus coioides*. In: Lee C-S, O'Bryen PJ, Marcus NH (eds) *Copepods in aquaculture*. Blackwell, Iowa, USA.
- Turner J.T. and Tester P.A., 1989. Zooplankton feeding ecology: nonselective grazing by the copepods *Acartia tonsa* Dana, *Centropages velificatus* de Oliveira, and *Eucalanus pileatus* Giesbrecht in the plume of the Mississippi River. *J Exp Mar Biol Ecol*, 126: 21-43.
- UNICHIM, 2012a. Metodo n. 2365. Qualità dell'acqua. Determinazione dell'inibizione della mobilità di nauplii di *Acartia tonsa* Dana (Crustacea: Copepoda) 24 h e 48 h di esposizione.
- UNICHIM, 2012b. Metodo n. 2366. Qualità dell'acqua. Determinazione dell'inibizione della mobilità di nauplii di *Acartia tonsa* Dana (Crustacea: Copepoda) dopo 7 giorni di esposizione.
- 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.

Vitiello V., Zhou C., Scuderi A., Pellegrini D., Buttino I., 2016. Cold storage of *Acartia tonsa* eggs: a practical use in ecotoxicological studies. *Ecotoxicology*, 25: 1033–1039.

Ward D.J., Perez-Landa V., Spadaro D.A., Simpson S.L., Jolley D.F., 2011. An assessment of three harpacticoid copepod species for use in ecotoxicological testing. *Arch Environ Contam Toxicol* 61:414-425.

Wilson C.B., 1932. The copepods of the Woods Hole region. Smithsonian Institution United States National Museum Bull. 158. United States Government Printing Office (1972 edition), 635 p.

Wollenberger L., Breitholtz M., Kusk K.O., Bengtsson B.-E., 2003. Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances. *Sci Total Environ*, 305: 53–64.

Zhang J., Wu C., Pellegrini D., Romano G., Esposito F., Ianora A., Buttino I., 2013. Effects of different monoalgal diets on egg production, hatching success and apoptosis induction in a Mediterranean population of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *Aquaculture*, 400–401: 65–72.

Zhang J., Ianora A., Wu C., Pellegrini D., Esposito F., Buttino I., 2015. How to increase productivity of the copepod *Acartia tonsa* (Dana): effects of population density and food concentration. *Aquac Res*, 46: 2982–2990.

Zhou C., Carotenuto Y., Vitiello V., Wu C., Zhang J., Buttino I. (2018) De novo transcriptome assembly and differential gene expression analysis of the calanoid copepod *Acartia tonsa* exposed to nickel nanoparticles. *Chemosphere*, 209: 163-172.

Zillioux E.J., Gonzalez J.G., 1972. Egg dormancy in a neritic calanoid copepod and its implications to overwintering in boreal waters. In: Battaglia B (ed) Fifth european marine biology symposium. Piccin editore, Padova, pp 217–230.

## APPENDICE 1 - Panoramica sulle condizioni di allevamento reperite in letteratura

Tabella 5: Condizioni di allevamento di *Acartia* spp. riportate in letteratura.

Riferimenti bibliografici	Mezzo	Salinità (‰)	Temperatura (°C)	Fotoperiodo (h L: h D)	Frequenza alimentazione	Tipologia di alimentazione	Tipologia e volume contenitore allevamento	Luogo origine
Parrish and Wilson, 1978	Acqua di mare naturale filtrata a 1,2 µm e acqua di mare artificiale <sup>1</sup>	31	18 ± 1,5	24 : 0	Tre volte a settimana	Mix di <i>Thalassiosira pseudonana</i> , <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Chroomonas salina</i>	Cristallizzatori 1,5 L	Ocean City, Maryland (USA)
Jónasdóttir, 1994	Acqua di mare naturale filtrata 0,22 µm	27	16	14 : 10	Due volte a Settimana	Mix di <i>Thalassiosira weissflogii</i> , <i>Rhodomonas lensae</i> , <i>Prorocentrum minimum</i> , in eccesso; [circa 300 µg C/L]	Beaker 2L	Long Island Sound, New York (USA)

<sup>1</sup> Kester et al., 1967

Riferimenti bibliografici	Mezzo	Salinità (‰)	Temperatura (°C)	Fotoperiodo (h L: h D)	Frequenza alimentazione	Tipologia di alimentazione	Tipologia e volume contenitore allevamento	Luogo origine esemplari
Schipp et al., 1999	Acqua di mare filtrata e sterilizzata chimicamente	30 ± 2	30 ± 2	Luce e fotoperiodo naturale	Quotidiana	<i>Rhodomonas</i> sp., <i>Tetraselmis</i> sp., <i>Isochrysis</i> sp.; mix 2:1:1, tot 20.000 cells/mL [1.543 µg C/L]	Vasche 5.000 L	ND
Andersen et al., 2001	Acqua di mare artificiale <sup>2</sup>	18	20 ± 0,5	12 :12	Quotidiana suddivisa in due razioni	<i>Rhodomonas salina</i> , 50.000 cells/mL [6.250 µg C/L]	ND	Øresund (Danimarca)
Wollenberger et al., 2003	Acqua di mare artificiale <sup>2</sup>	18	20 ± 0,5	12 : 12	Quotidiana suddivisa in due razioni	<i>Rhodomonas salina</i> 50.000 cells/mL	ND	Øresund (Danimarca)
Invidia et al., 2004	Acqua di mare naturale filtrata a 0.45 µm	30 - 32	20 ± 1	14 : 10	ND	Mix di <i>Rhodomonas reticulata</i> , <i>Tetraselmis suecica</i> e <i>Isochrysis galbana</i> , quantità non riportate	ND	Mar Adriatico, (Italia)

<sup>2</sup> Kusk and Wollenberger, 1999

Riferimenti bibliografici	Mezzo	Salinità (‰)	Temperatura (°C)	Fotoperiodo (h L: h D)	Frequenza alimentazione	Tipologia di alimentazione	Tipologia e volume contenitore allevamento	Luogo origine esemplari
Medina and Barata, 2004	Acqua di mare naturale	30	20	16 : 8	Quotidiana	Mix di <i>Rhinomonas reticulata</i> (25.000 cells/mL) e <i>Isochrysis galbana</i> (25.000 cells/mL), 1:1, tot 50.000 cells/mL [1.718 µg C/L]	Contenitori con fondo conico 1,2 L	Danish Institute for Fisheries and Marine Research, Charlottenlund (Danimarca)
Drillet et al., 2006a	Acqua di mare naturale filtrata a 0,22 µm	30	18 - 19	ND	ND	<i>Rhodomonas salina</i> , 20.000 cells/mL [2.500 µg C/L]	Vasche 200 L	Øresund (Danimarca)
Drillet et al., 2006b	Acqua di mare naturale filtrata a 0,22 µm	30	25	ND	ND	<i>Rhodomonas salina</i> , in eccesso	Vasche	ND
Holste and Peck, 2006	ND	19 ± 1	20,5 ± 2,5	13 : 11	Quotidiana	<i>Rhodomonas</i> sp., > 50.000 cells/mL	Vasche 220 L	Golfo di Kiel (Germania)

Riferimenti bibliografici	Mezzo	Salinità (‰)	Temperatura (°C)	Fotoperiodo (h L: h D)	Frequenza alimentazione	Tipologia di alimentazione	Tipologia e volume contenitore allevamento	Luogo origine esemplari
Leandro et al., 2006	Acqua di mare naturale filtrata a 0,45 µm	20	18	12 : 12	ND	Mix di <i>Rhodomonas</i> sp. e <i>Thalassiosira weissflogii</i> , > 1.000 µg C/L	Bidoni in polietilene 15 L	Canal de Mira, Ria de Aveiro (Portogallo)
Drillet et al., 2007	ND	ND	19	ND	ND	<i>Rhodomonas lens</i> e <i>Rhodomonas salina</i>	Vasche 300 L	Golfo del Messico, Florida (USA)
Marcus and Wilcox, 2007	Acqua di mare artificiale	ND	25	14 : 10	Quotidiana	Adulti e copepoditi: <i>Rhodomonas lens</i> (25.000 cells/mL) e <i>R. salina</i> (25.000 cells/mL), occasionalmente <i>Akashiwo sanguinea</i> (150 cells/mL); nauplii <i>R. lens</i> (15.000 cells/mL) e <i>R. salina</i> (15.000 cells/mL)	Vasche 300 L	Apalachee Bay, Florida (USA)

Riferimenti bibliografici	Mezzo	Salinità (‰)	Temperatura (°C)	Fotoperiodo (h L: h D)	Frequenza alimentazione	Tipologia di alimentazione	Tipologia e volume contenitore allevamento	Luogo origine esemplari
Ihara et al., 2010	Acqua di mare naturale filtrata a 1 µm	30	24	12 : 12	Quotidiana	<i>Thalassiosira weissflogii</i> (10.000 cells/mL) e <i>Isochrysis galbana</i> (50.000 cells/mL) in accordo con Kaminski, 2004	Vasche 500 L	Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande (Brasile)
Laurer and Bianchini, 2010	Acqua di mare naturale filtrata a 1 µm	15 e 30	20	16 : 8	Quotidiana	Mix di <i>Thalassiosira weissflogii</i> (20.000 cells/mL) e <i>Isochrysis galbana</i> (10.000 cells/mL)	Bidoni 20 L	Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande (Brasile)
Pinho and Bianchini, 2010	Acqua di mare naturale filtrata a 1 µm	30	20	ND	Quotidiana	Mix di <i>Thalassiosira weissflogii</i> (20.000 cells/mL) e <i>Isochrysis galbana</i> (10.000 cells/mL)	Bidoni 20 L	Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande (Brasile)



Riferimenti bibliografici	Mezzo	Salinità (‰)	Temperatura (°C)	Fotoperiodo (h L: h D)	Frequenza alimentazione	Tipologia di alimentazione	Tipologia e volume contenitore allevamento	Luogo origine esemplari
Teixeira et al., 2010	ND	30	20 ± 1	12 : 12	Quotidiana	Mix di <i>Rhodomonas baltica</i> , <i>T. weissflogii</i> e <i>C. muelleri</i> in eccesso	Vasche 70 L	Estuario del lago Patos, Rio Grande, RS (Brasile)
Drillet et al., 2011b	ND	34	17,6 ± 0,3	12 : 12	Quotidiana	<i>Rhodomonas salina</i> , in eccesso	Vasche 30 L	Kiel Bright (Germania), Øresund (Danimarca) e Florida (USA)
Gorbi et al., 2012	Acqua di mare naturale filtrata a 0,45 µm	28-30	20 ± 1	14 : 10	Due volte a settimana	<i>Rhinomonas reticulata</i> (1.200 cells/mL), <i>Tetraselmis suecica</i> (2.450 cells/mL) <i>Isochrysis galbana</i> (9.100 cells/mL) [circa 300 µg C/L]	Acquari in vetro, con una colonna d'acqua di almeno 10 cm	Mar Adriatico (Italia)
Olivotto et al., 2012	ND	30	18	13 : 11	Quotidiana	<i>Rhodomonas</i> sp.; > 50.000 cells/mL [6.250 µg C/L]	Vasche 8 L	Kiel Bright (Germania)

Riferimenti bibliografici	Mezzo	Salinità (‰)	Temperatura (°C)	Fotoperiodo (h L: h D)	Frequenza alimentazione	Tipologia di alimentazione	Tipologia e volume contenitore allevamento	Luogo origine esemplari
Zhang et al., 2013, 2015	Acqua di mare naturale filtrata a 0,22 µm	30	20	14 : 10	Giornaliera	Mix di <i>Rhinomonas reticulata</i> , <i>Rhodomonas baltica</i> e <i>Isochrysis galbana</i> [ $> 300 \mu\text{g C/L}$ ]	Acquari 50 L	Mar Adriatico (Italia)
Baetens, 2015	Acqua di mare sintetica Instant Ocean filtrata a 0,45 µm	$30 \pm 1$	20	14 : 10	Quotidiana	<i>Tetraselmis suecica</i> e <i>Isochrysis galbana</i> (1:1) ad libitum	Acquari 2 L	Uova acquistate dalla Fry Marine (Olanda)
Hagemann et al., 2016	Acqua di mare naturale filtrata a 20 µm	$33 \pm 1$	$20 \pm 0,5$	24 : 0	Quotidiana continua	<i>Rhodomonas baltica</i> $> 30.000$ cells/mL	Vasche 1.000 L	Øresund (Danimarca) (ceppo DFH-AT1)
Sei et al., 2016	Acqua di mare naturale filtrata a 0,45 µm	$30 \pm 2$	$20 \pm 1$	14 : 10	ND	Mix di <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Tetraselmis suecica</i> e <i>Rhinomona reticulata</i> , in eccesso	Acquari 8 L	Mar Adriatico (Italia)

Riferimenti bibliografici	Mezzo	Salinità (‰)	Temperatura (°C)	Fotoperiodo (h L: h D)	Frequenza alimentazione	Tipologia di alimentazione	Tipologia e volume contenitore allevamento	Luogo origine esemplari
Franco et al., 2017	Acqua di mare filtrata a 1 µm	33	18 ± 1	24 : 0	Quotidiana	Mix 1:1 di <i>Rhodomonas baltica</i> e <i>Isochrysis galbana</i> , ≥ 50.000 cells/mL	Vasche 10 - 80 mL	Øresund (Danimarca) (ceppo DFH-AT1)
Buttino et al., 2018	Acqua di mare naturale filtrata a 0,22 µm	30	20 ± 1	14 : 10	3 volte a settimana	Mix di <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Rhinomonas reticulata</i> e <i>Rhodomonas baltica</i> [>1.500 µg C/L]	Bidoni in 20 L	Mar Adriatico (Italia)
Picone et al., 2018	Acqua di mare artificiale <sup>3</sup>	25	20 ± 1	16 : 8	Quotidiana	<i>Rhodomonas salina</i> 60.000 cells/mL	Bottiglie in vetro da 2 L	Technical University of Denmark (DTU), Lyngby (Danimarca)

ND= non disponibile

<sup>3</sup> ASTM, 2004

