

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

**DIPARTIMENTO DI ECOLOGIA E SVILUPPO ECONOMICO
SOSTENIBILE**

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN:

ECOLOGIA E GESTIONE DELLE RISORSE BIOLOGICHE (XXIV Ciclo)

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA:

**VALORIZZAZIONE ECOLOGICA DEL SAGGIO DI INIBIZIONE
DELLA CRESCITA ALGALE SU SEDIMENTI MARINI**

BIO-07

Coordinatore: Prof. Roberta Cimmaruta



Tutor: Dott. Michela Mannozi



Dottorando: Angela Sarni



“Stay foolish, stay hungry”

S. Jobs

“Credete, forse, che non vi sia possibilità?”

W. Shakespeare

Valorizzazione ecologica del saggio di inibizione della crescita algale su sedimenti marini

Indice

1 Introduzione

1.1 Inquadramento generale	5
1.1.1 La matrice “sedimento marino”	8
1.1.2 Il fitoplancton e l’ecotossicologia	10
1.1.3 Il microfitobentos e l’ecotossicologia	13
1.2 Obiettivi ed attività svolte	15

2 Materiali e metodi

2.1 Mantenimento in laboratorio delle popolazioni algali	17
2.1.1 Prelievi e misure	19
2.2 Selezione dei controlli	20
2.3 Preparazione della matrice	22
2.3.1 Preparazione delle soluzioni madri	25
2.3.2 Misura dei parametri di controllo e criteri di validità dei test	26
2.4 Esecuzione del saggio su sedimento	28
2.4.1 Esecuzione del saggio su elutriato	29
2.5 Piano sperimentale	31

3 Risultati e discussione

3.1 Curve di crescita	32
3.2 Tests sulle “matrici di controllo”	35
3.3 Tests sui confounding factors	37
3.4 Tests su campioni reali	41

4 Conclusioni

5 Bibliografia

Lista delle definizioni e abbreviazioni:

Crescita: incremento della densità cellulare.

Densità cellulare: numero di cellule per unità di volume.

CA72: crescita algale dopo 72 ore di incubazione.

Confounding factors: variabili presenti in un modello che, se non eliminate o considerate, alterano i risultati di una prova, danneggiando la validità di un esperimento.

Controllo: terreno di coltura (acqua marina sintetica+nutrienti) inoculato con le alghe

CV: Coefficiente di Variazione

DS: Deviazione Standard

EC: (Effect Concentration) Concentrazione della sostanza o del campione in esame in corrispondenza della quale si osserva l'effetto considerato come end-point nelle condizioni di riferimento della procedura specificata. L'EC si misura come percentuale d'effetto.

End-Point: Tipologia di effetto biologico considerato nella valutazione della tossicità in un saggio biologico o in un test di tossicità acuti e/o cronici.

ISO: International Standard Organization

LOEC: (Lowest Effect Concentration) Minima concentrazione di una sostanza o campione a cui corrisponde un effetto tossicologico osservabile o misurabile.

NOEC: (No Effect Concentration) Massima concentrazione di una sostanza o campione a cui non corrispondono effetti tossicologici osservabili o misurabili.

PSU: Practical Salinity Unit. Unità di misura della salinità di una soluzione.

Specie target: organismo utilizzato come indicatore biologico.

Tasso di crescita specifico: tasso di incremento della densità algale per unità di tempo

Terreno di coltura (growth medium): l'insieme di acqua marina sintetica e nutrienti, usato per le colture di mantenimento ed i controlli.

Terreno di prova (test medium): l'insieme di acqua marina, nutrienti e sostanza da testare, in cui vengono inoculate le alghe.

Test preliminare: test di tossicità finalizzato alla individuazione orientativa di una EC50, basato su un range di concentrazioni molto ampio. Il test preliminare ha un numero di diluizioni, di repliche e di organismi ridotto rispetto al test definitivo.

Test statico: test di tossicità acuta nel quale non vengono effettuati cambi anche parziali delle soluzioni da testare.

1 Introduzione

1.1 Inquadramento generale

L'ecotossicologia studia i contaminanti della biosfera attraverso gli effetti che questi producono sugli organismi che la abitano e ricerca gli strumenti metodologici per riuscirvi (Cairns 1989, 1993; Chapman, 2002).

Il fine dell'analisi è stabilire in che modo un organismo, o una popolazione di organismi, scelti come target, rispondano all'esposizione ad una matrice ambientale a loro consona. Gli strumenti di cui dispone sono i saggi biologici ed i test di tossicità, cioè esperimenti nei quali un numero prefissato di individui appartenenti alla specie-target vengono esposti, in condizioni controllate, rispettivamente a campioni naturali (acqua, reflui urbani, sedimento, suolo, ecc.) o a soluzioni di sostanze tossiche note, al fine di valutarne gli eventuali effetti (Volpi Ghirardini e Pellegrini, 2001).

I modi di risposta degli organismi sono detti end points e, a seconda del grado di contaminazione della matrice e della sensibilità a questa dell'organismo target, possono essere fondamentalmente due: la mortalità o l'inibizione di una funzione fisiologica nota e misurabile (la crescita, la fertilità, lo sviluppo, la bioluminescenza, la funzionalità enzimatica ecc.).

Questo tipo di approccio alla caratterizzazione di una matrice ambientale (acqua, sedimento marino o terrestre) ha avuto un forte sviluppo negli ultimi vent'anni (Cicero e Guerrera, 2001), ed è risultato utile per definire vari aspetti dell'ambiente naturale: per predire il potenziale impatto di sostanze contaminanti, per valutare l'efficacia dei trattamenti anti-inquinamento, per monitorare il livello di contaminazione di aree definite.

Il valore ecologico delle informazioni scaturite da questo tipo d'analisi è stato riconosciuto anche sul piano normativo, prova ne è, ad esempio, la Direttiva Europea 2000/60/CE che lo include tra gli strumenti di valutazione ed analisi della qualità di acqua e sedimenti.

La corretta applicazione dei principi fondamentali dell'ecotossicologia deriva da alcuni criteri (Calow *et al.*, 1989, Lambertson *et al.*, 1992), i più importanti sono i seguenti:

- L' organismo target ideale deve essere semplice, con un ciclo vitale breve, facilmente gestibile in laboratorio.
- La specie scelta deve avere una ampia distribuzione in natura e un'alta valenza ecologica (per favorire l'uniformità delle metodologie e la confrontabilità dei risultati), essere rappresentativa dell'habitat da cui proviene la matrice da analizzare e risultare sensibile ai principali gruppi di contaminanti di cui si suppone sia "affetta" la matrice.
- La matrice, solida o acquosa che sia, deve essere manipolata o trattata o esposta ad agenti ossidanti il minimo indispensabile.
- Avendo la possibilità, impiegare una batteria di saggi, piuttosto che un singolo test monospecifico, che copra i principali livelli della rete alimentare (produttori primari, consumatori, decompositori).

Se si considera l'analisi utile ai fini della predizione dell'impatto di sostanze contaminanti sull'ambiente, quest'ultimo aspetto è particolarmente interessante poiché le specie possiedono differenti caratteristiche ecologiche e biologiche, quindi, non è ipotizzabile poter pervenire ad una rappresentazione adeguata dell'ambiente marino in laboratorio attraverso l'utilizzo di una sola specie-test.

Una batteria composta da organismi con differente posizione filogenetica, differente livello trofico, diversa rilevanza ecologica, garantisce che esistano differenti vie di esposizione ai contaminanti (Focardi *et al.*, 2001), quindi una rappresentazione più esaustiva degli effetti della matrice. Se a questo si aggiunge la selezione di specie target specifiche per il tipo di habitat che si vuole caratterizzare, aumentano le possibilità di ottenere una predizione "realistica" (Chapman, 2002).

Dalla letteratura scientifica e dalla normale pratica di laboratorio, si evince che le batterie più comunemente usate sono studiate per avere il miglior compromesso tra il tipo di ambiente da indagare e l'utilizzo di routine (Baudo *et al.*, 1999; Chapman, 2007).

Poiché non è pensabile chiedere che ciascun laboratorio mantenga un numero molto elevato di allevamenti diversi, si deve cercare anche di contenere il più possibile il numero di saggi da includere in una batteria, pur mantenendo allo stesso tempo una buona copertura per sensibilità e rilevanza ecologica (tutte le batterie devono includere almeno batteri, alghe e invertebrati e prevedere la rilevazione di endpoint diversi, non solo letali).

Privilegiando l'utilizzo di routine, per i vari saggi andranno proposti preferibilmente sistemi statici.

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

Alla ricerca rimane il compito di identificare i criteri di giudizio sui quali basare una valutazione della valenza ecologica e pratica di ciascun tipo di saggio, così da consentire un confronto continuo tra batterie già in uso e nuove che, ipoteticamente, potrebbero essere proposte per conseguire obiettivi di salvaguardia ambientale più precisi.

Ad esempio, attualmente è prassi analizzare i sedimenti marini con saggi composti da un crostaceo fossorio esposto a sedimento tal quale, un batterio bioluminescente esposto a sedimento tal quale e ad acqua interstiziale, un'alga microfitoplanctonica esposta ad una matrice derivata dal sedimento e diluita (l'elutriato).

Relativamente a quest'ultimo saggio, resta il dubbio che, tanto l'organismo (un fitoplanctonte) quanto la matrice (elutriato, cioè un estratto dell'acqua inter ed intra-particellare del sedimento, diluito 4 volte con acqua marina sintetica), rispettino poco i criteri di scelta menzionati, e possano quindi essere entrambi inefficaci nel rappresentare le condizioni di una matrice complessa e importante come il sedimento marino.

1.1.1 La matrice “sedimento marino”

Da un punto di vista geochimico, i sedimenti marini rappresentano il deposito finale di tutto ciò che attraversa e scorre sulle terre emerse (Frignani e Turci, 1981; Pellegrini *et al.*, 1999; Del Valls *et al.*, 2004; Casado Martinez *et al.*, 2006): dal materiale dilavato naturalmente dalle piogge e/o trasportato dai fiumi, fino ai contaminanti impiegati nelle attività produttive antropiche e trascinati o immessi in mare.

Soprattutto lungo le coste e nelle vicinanze di impianti industriali, portuali e insediamenti urbani, i sedimenti marini rappresentano la “memoria” chimica dei processi che si sono svolti ed il loro grado di contaminazione e la loro gestione rappresenta un problema di dimensioni globali sia dal punto di vista ecologico che politico (Chapman e Wang, 2001) per questo sono monitorati e analizzati secondo le normative antinquinamento vigenti.

Trattandosi di una matrice complessa, che in aree strategiche per le attività umane, custodisce contaminanti di varia natura (dai metalli pesanti agli idrocarburi, al carbonio e all’azoto organico) non può essere analizzata unicamente dal punto di vista chimico. L’analisi chimica, infatti, consente sicuramente di identificare e quantificare le cause della contaminazione ma non permette di stabilirne qual’è la frazione biodisponibile, cioè capace di interagire con il biota, né di valutare gli effetti sinergici o antagonistici tra i contaminanti (Ghirardini e Pellegrini, 2001).

Attualmente, l’uso integrato di metodi chimici ed di laboratorio con metodi ecologici e biologici di campo (definito “Multiple lines of evidence”) è riconosciuto come il sistema più appropriato per compensare i limiti delle singole metodologie e per definire e tutelare la qualità ambientale (Chapman, 1992; Burton, 1999; Hall e Giddings, 2000).

Dal punto di vista, sui sedimenti esistono 3 tipi di approcci analitici:

- Saggi su estratti di sedimento (cioè matrici derivate come l’elutriato)
- Saggi sul sedimento tal quale
- Saggi su acqua interstiziale

Ciascuno offre informazioni utili, per questo si opta per applicazioni congiunte di più tipi di saggio. Come specie target vengono preferiti i crostacei bentonici (*Tigriopus fulvus*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*), i vermi marini (*Hediste*, *Chironomus*

tentans, *Chironomus riparius*) e/o i batteri bioluminescenti (*Vibrio fischeri*) poiché sono gruppi diversi per posizione filogenetica e trofica, ma accomunati dal fatto che vivono e si nutrono stando a contatto diretto col sedimento.

I saggi che coinvolgono tali organismi sono perlopiù su sedimento tal quale e acqua interstiziale.

Un discorso a parte merita l'elutriato, che è una matrice derivata dal sedimento e, con qualche forzatura teorica, considerata rappresentativa dei processi di "aratura" o trascinamento cui i fondali marini sono sottoposti durante un dragaggio (ASTM, 1991) o più semplicemente durante una tempesta o le maree.

Durante questi processi, naturali o artificiali che siano, è facilmente ipotizzabile che composti idrofili adsorbiti sul sedimento superficiale vengano messi in sospensione nella colonna d'acqua, interagendo con gli organismi sovrastanti il sedimento o in esso infossati.

Lo svolgersi di questa dinamica, soprattutto in ambiente costiero, ha reso concettualmente plausibile che, a completamento delle batterie di test per l'analisi di un sedimento marino, venissero incluse anche le microalghe fitoplanctoniche.

1.1.2 Il fitoplancton e l'ecotossicologia

Il fitoplancton è costituito da organismi microscopici autotrofi e che popolano gli strati superficiali di bacini lacustri e marini e che non sono in grado di opporsi alle correnti, venendo trasportati passivamente da queste ultime (Ghirardelli, 1981).

Dal punto di vista ecologico le alghe fitoplanctoniche sono i produttori primari più importanti degli ecosistemi: la loro capacità supera quella delle piante terrestri. Le alghe contribuiscono in modo determinante al rifornimento di ossigeno nell'atmosfera e rappresentano il primo anello delle reti alimentari negli ambienti acquatici (Walsh, 1988; Nyholm e Kallqvist, 1989; Dajoz, 1993).

Vari fattori ambientali influenzano lo sviluppo delle popolazioni fitoplanctoniche: intensità luminosa, temperatura e la disponibilità di nutrienti (MacIntyre *et al.*, 2002). Inoltre, un'importante frazione della produzione primaria fitoplanctonica avviene lungo le zone costiere, cioè in un ambiente caratterizzato da una forte variabilità stagionale e interannuale e soggetto a forte impatto antropico.

Gli organismi algali possono sviluppare particolari adattamenti in risposta alla variabilità ambientale ed agli stress: ad esempio la dimensione degli individui può cambiare in funzione del grado di trofia delle acque (Guerrini *et al.*, 2000), oppure, come succede nei casi più noti e manifesti, in risposta a condizioni climatiche e trofiche particolari alcune specie sviluppano fenomeni ecologici massivi come la produzione di mucillagini (Pistocchi *et al.*, 2005), di fitotossine (Boni *et al.*, 2001; Ciminiello *et al.*, 2006) o di maree colorate.

Considerato il loro ruolo trofico, la diffusione a livello cosmopolita e la sensibilità ai parametri ambientali fisici e chimici, gli organismi fitoplanctonici sono stati facilmente investiti del ruolo di indicatori biologici dello stato di qualità dei corpi idrici.

Infatti il saggio algale, eseguito tramite l'impiego di alghe microfitoplanctoniche come specie target, è uno dei test più diffuso (Walsh, 1988; Sbrilli *et al.*, 1998).

La sua esecuzione è piuttosto semplice, soprattutto quando l'end point è la crescita degli organismi, oltre a questo presenta notevoli vantaggi operativi ed economici in quanto non si richiedono strumenti complicati o costosi né una particolare vigilanza durante il periodo di incubazione degli organismi fitoplanctonici.

Questi ultimi hanno dimostrato d'essere perfetti "animali da laboratorio": facilmente gestibili, con un ciclo vitale relativamente breve, un alto tasso di crescita, una discreta sensibilità ai principali contaminanti ed una alta rilevanza ecologica (Arensberg *et al.*, 1995).

Il tutto si è tradotto in una estesa produzione di protocolli internazionali standardizzati (alcuni esempi: OECD, 1984; USEPA, 1988; Environmental Canada, 1992; UNI EN ISO 10253, 2006) incentrati sull'uso di specie fitoplanctoniche marine e d'acqua dolce, tra le quali: *Kircherinella subcapitata* (formerly *Selenastrum capricornutum*, figura 1), *Scenedemus suspicatus*, *Dunaliella tertiolecta* (figura 2), *Nannochoris oculata*, *Minutocellus polymorphus*, *Isochrysis galbana*, *Skeletonema costatum* (figura 3), *Phaeodactylum tricornutum* (figura 4), cioè specie appartenenti ai grandi e variegati gruppi delle Cloroficee e delle Diatomee.



Figura 1. La cloroficea *K. Subcapitata*



Figura 2. La cloroficea *D. tertiolecta*



Figura 3. La Diatomea *S. costatum*

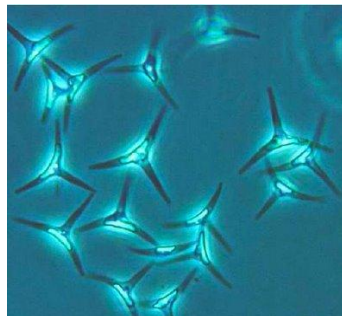


Figura 4. La Diatomea *P. tricornutum*

La convenienza nell'usare, a scelta, una specie piuttosto che un'altra è già stata descritta, va però specificato che il test di inibizione della crescita è utilizzabile esclusivamente su matrici acquose e questo aspetto accomuna tutti i protocolli: il saggio algale si applica alla valutazione di acque naturali, acque di scarico, acque interstiziali ed elutriati (ARPAT-CEDIF, 1998).

D'altra parte, è facile osservare che essendo gli organismi target dei fitoplanctonti, in considerazione del loro ruolo ecologico, la matrice di cui rappresentano meglio le caratteristiche e gli effetti è unicamente la matrice acquosa.

Volendo descrivere gli effetti di una matrice quale il sedimento marino sui produttori primari, più che rivolgersi alle specie normate dei protocolli (cioè i fitoplanctonti, ecologicamente inadeguati ad essere identificati come specie target per i motivi ora descritti), sarebbe più idoneo scegliere, tra le microalghe, quegli organismi che svolgono parte o tutto il loro ciclo vitale a contatto con il sedimento, quindi, rivolgersi ai gruppi algali microfitobentonici.

1.1.3 Il microfitobentos e l'ecotossicologia

Il microfitobentos è costituito da organismi microscopici, fotosintetici, autotrofi, prevalentemente appartenenti ai gruppi delle Diatomee e dei Cianobatteri bentonici cioè viventi gran parte del loro ciclo vitale sullo strato superficiale dei sedimenti marini, estuarini, lagunari (Miller *et al.*, 1996).

Ecologicamente questi organismi hanno un ruolo centrale nell'input di energia negli ecosistemi intertidali e nel loro mantenimento (de Bower *et al.*, 2003).

Le diatomee bentoniche sono i componenti principali del Microfitobentos e rappresentano, oltre che i produttori primari del sistema, anche la principale fonte di cibo per la meiofauna (suspension-feeders e deposit-feeders), sono dunque un anello importante tanto nel trasferimento energetico che materiale nella rete trofica bentica (Blanchard *et al.*, 2000).

La profondità cui arrivano all'interno del sedimento è funzione della penetrazione della luce sul fondo e degli interstizi del sedimento, quindi è correlata alla granulometria ed al contenuto di materia organica (Miller *et al.*, 1996). La distribuzione di cellule microalgali è documentata nei primi 2 cm di spessore del fondale anche se il 60% di tutto il microfitobentos è distribuito nel primo mezzo centimetro di sedimento (de Jonge e Colijn, 1994).

Inoltre, l'importanza ecologica del gruppo non si limita allo strato superficiale del sedimento su cui vive, infatti grazie ai processi di risospensione e alla dinamica fisico-chimica del sedimento superficiale, il microfitobentos non può considerarsi confinato al fondo ma è componente anche dell'ambiente creato dall'acqua immediatamente sovrastante (Miller, 1996).

Le diatomee bentoniche, oltre a rappresentare la gran parte della biomassa microfitobentonica, costituiscono il 60% delle specie totali del gruppo delle Bacillarioficee (Araujo, 2007).

Alcune specie ricorrono frequentemente nell'ambito degli studi: *Cilyndrotheca closterium*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Entomoneis punctulata*, *Nitzschia paleacea*, *Navicula* sp. Queste specie sono state impiegate originariamente per saggi algali su matrici acquose, come se fossero normali alghe fitoplanctoniche, infatti, considerati i frequenti processi di rimobilizzazione del sedimento costiero ad opera di correnti e maree, le microalghe bentoniche non sono isolate dalla colonna d'acqua sovrastante ed il confine tra specie di diatomee puramente bentoniche o puramente fitoplanctoniche è labile (Miller, 1996; van Dam *et al.*, 2008).

L'impiego delle diatomee in qualità di bioindicatori bentonici per valutare gli effetti dei sedimenti marini tal quali è invece più recente: ha cominciato a svilupparsi nell'ultimo decennio (Moreno Garrido *et al.*, 2003) insieme a vari approcci metodologici incentrati prevalentemente sulla gestione della matrice (Moreno garrido *et al.* 2003b), e su come ridurre o eliminare l'inconveniente principale dovuto ad essa, cioè l'effetto di shadowing che avviene quando il sedimento contiene silt in percentuale superiore del 15% (Adam e Stauber, 2004).

Sono state impiegate con successo *Cilyndrotheca closterium*, *Entomoneis* cf. *punctulata* e *Phaeodactylum tricornutum*, diatomee appartenenti al gruppo delle Pennales, con un'ottima distribuzione in tutti i mari del mondo, una buona sensibilità ai principali gruppi di contaminanti idrofili e idrofobi, e soprattutto, una ottima capacità di adattamento e stabilità in condizioni di laboratorio (Moreno Garrido *et al.*, 2003, 2007; Hogan *et al.*, 2005).

1.2 Obiettivi del lavoro ed attività svolte

L'inquinamento e la contaminazione delle aree costiere è un problema serio e aggravato dal fatto che le attività umane sono in incremento costante e interferiscono con il funzionamento e la biodiversità degli ecosistemi costieri (Lambolez *et al.*, 1994).

In particolare, i sedimenti rappresentano la “ tomba” o la fonte di molte sostanze organiche (contaminanti o nutrienti) a seconda delle loro proprietà fisico-chimiche e delle condizioni idrodinamiche (Chapman e Wang, 2001; Del Valls *et al.*, 2004).

Ad esempio, i sedimenti sono in grado di sequestrare alte concentrazioni di metalli, concentrazioni che non sono paragonabili a quelle presenti nell'acqua sovrastante e di cui non si conosce la biodisponibilità. La qualità dei sedimenti è strettamente correlata alla qualità dell'ecosistema di cui essi fanno parte, ed eseguire valutazioni di tipo ecotossicologico impiegando unicamente matrici acquose (acqua interstiziale) o derivate (elutriato) per caratterizzare questa matrice rappresenta un'estrapolazione forzata che non rende conto della tossicità del sedimento intero o tal quale (LiB e Ahlf, 1997).

Per ottenere informazioni credibili su tale matrice, ben si prestano gli organismi bentonici che vivendo dentro o sulla superficie del sedimento sono esposti, non solo a contaminanti dissolti nell'acqua interstiziale, ma per contatto diretto e/o per ingestione anche a quelle sostanze adsorbite sui granuli di sedimento (Macken *et al.*, 2008).

Lo stile di vita di questi organismi si presta in modo egregio per essere usato nei saggi su sedimento tal quale e per sperimentare nuovi test sulla fase solida, permettendo di indagare i suoi effetti tossici (Hack *et al.*, 2008).

La ricerca e la sperimentazione di nuovi saggi o nuove procedure sui sedimenti e gli organismi target ad essi collegati rappresenta attualmente una nuova fase delle conoscenze ecotossicologiche e considerato il ruolo cruciale della matrice in oggetto vale sicuramente la pena cercare di caratterizzarla nel modo più realistico possibile.

Ponendo come prioritario quest'ultimo aspetto, non si è ritenuto sufficiente scegliere un biosaggio o una specie test solo su basi pratiche quali la facilità d'esecuzione o la

reperibilità nell'ambiente della specie o la sua versatilità in laboratorio, ma ci si è posti il problema di sperimentare un biosaggio che associasse ad una matrice “complessa” un organismo target che fosse ad essa correlata dall'ecologia della specie, dal suo ruolo trofico e dalla sua posizione nell'ecosistema bentonico.

In questo lavoro si è cercato di costruire delle perfette corrispondenze tra i vari parametri ecologici e biologici che si incrociano nell'esecuzione di un biosaggio: matrice e specie test, ed ecosistema d'appartenenza di entrambi, privilegiando gli aspetti che potessero restituire una caratterizzazione il più possibile vicina alle caratteristiche ecologiche dell'ambiente di provenienza della matrice.

Sotto quest'ottica, attualmente la migliore combinazione di questi intenti con i test disponibili è rappresentata dal test *in situ*. Tuttavia, non potendo disporre dei mezzi di supporto per effettuare un'analisi così accurata, ci si è rivolti alla selezione di quelle specie di microalghe fitobentoniche, prioritariamente le specie più diffuse nell'area mediterranea, che potessero risultare adatte all'esecuzione di un test d'inibizione della crescita algale su sedimento marino tal quale.

Valutando i dati sui popolamenti fitoplanctonici dei monitoraggi eseguiti periodicamente dalle ARPA regionali e da dati ufficiali sul sito del Ministero dell'Ambiente (www.sidimar.ipz.it) sono state individuate due specie di diatomee epibentoniche: *Cilyndrotheca closterium* e *Phaeodactylum tricornutum*. Esse possiedono le caratteristiche necessarie agli scopi prefissi: hanno un ciclo vitale prevalentemente epibentonico, hanno una grande distribuzione nei mari del bacino Mediterraneo, sono specie collaudate come indicatori ecologici.

Il resto del lavoro è consistito nel trovare una procedura che permettesse l'esecuzione di un biosaggio su terreni di controllo e successivamente su sedimenti di campioni reali, valutare l'applicabilità della metodologia adottata, verificare la presenza di “confounding factors” che potessero inficiare i risultati e confrontare il tipo di informazioni ricavate con il metodo *ex novo* rispetto all'esecuzione del test su una matrice derivata standard quale l'elutriato, con la procedura “classica” ISO 10253.

2 Materiali e metodi

2.1 Mantenimento in laboratorio delle popolazioni algali

Le diatomee unicellulari *C. closterium* (figura 5) e *P. tricornutum* (ceppo 1090-1a = CCAP 1052/1° = UTEX 642, figura 6) sono state fornite in origine dal Laboratorio di Biologia Marina di Trieste, e sono in coltura monoclonale nel Laboratorio di Ecologia del Fitoplancton di ISPRA dal 2001.

In tabella 1 un quadro sintetico delle caratteristiche salienti di entrambe le specie.

Figura 5. *C. closterium*



Figura 6. *P. tricornutum*

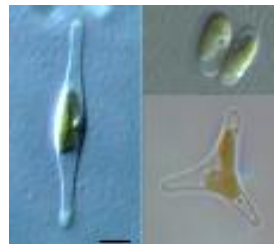


Tabella 1. Sintesi delle caratteristiche delle due diatomee selezionate per i test.

Caratteristiche	<i>Cylindrotheca closterium</i> (Ehrenberg) Reimann & J.C.Lewin 1964	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (Bohlin, 1897)
Tipo	Bacillariofitea Pennata	Bacillariofitea Pennata
Lunghezza	Da 30 a 400 µm	Da 20 a 35 µm (morfotipo fusiforme)
Simmetria	Bilaterale, allungata	Vd. Morfotipo
Morfotipo	Fusiforme	3 morfotipi (pleiomorfismo): fusiforme, triradiata, ovale
Ruolo ecologico	Mobile ed epibentonica	Fitoplanctonica ed epibentonica, non mobile
Ruolo trofico	Produttore primario	Produttore primario
Ambiente	Mare, estuari, lagune	Mare, estuari, lagune, pozze
Presenza nel Mediterraneo	Molto diffusa in Adriatico, presente negli altri mari	Diffusa in tutti i mari del Mediterraneo

Per quanto riguarda la preparazione dei terreni ed il mezzo di coltura, è stata seguita la metodologia ISO 10253 del 2006, come specificato di seguito.

Per quanto riguarda le condizioni di mantenimento, le modalità di gestione e l'uso delle vetrerie si è seguito il manuale di metodologia di saggio algale di ARPAT del 1998.

Ciascuna popolazione algale è stata coltivata su terreno preparato secondo la ricetta contenuta nel protocollo ISO 10253 (2006), specifica per il mantenimento ed il test sulle Diatomee *Skeletonema costatum* e *Phaeodactylum tricornutum*, entrambe appartenenti al gruppo delle Pennales come *C. closterium*, e per questo alimentata anch'essa nella stessa maniera.

L'acqua marina sintetica usata come mezzo di coltura è stata preparata secondo ricetta ISO 10253 e sterilizzata mediante 2 successive filtrazioni su dischi-filtro di acetato di cellulosa da 0,45 μm e 0,2 μm .

Le colture poste in beute di vetro Pyrex da 250 ml ciascuna sono state tenute in camera termostatica ventilata in condizioni fisico chimiche standard con regime di luce-buio 16-8, intensità luminosa di circa 6000 lux e temperatura di $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ (figura 7).

Il rinnovo delle colture algali è stato effettuato regolarmente ogni settimana per stabilizzare le curve di crescita e la loro risospensione ed ossigenazione è stata eseguita tramite agitazione manuale una volta al giorno.

Figura 7. Camera termostatica per colture algali.



2.1.1 Prelievi e misure

In via preliminare è stata monitorata la crescita delle popolazioni algali nel periodo corrispondente alla fase esponenziale (terzo, quarto e quinto giorno successivo al rinnovo della coltura madre), funzionale all'esecuzione dei test su sedimenti.

I prelievi ed i conteggi sono stati effettuati ogni 24 ore per 4 giorni, a partire da quello dell'inoculo, su 12 successivi rinnovi della coltura madre per ciascuna specie.

Il prelievo di una aliquota pari a 0,5 ml di ciascuna coltura è stato effettuato in triplice replica sotto cappa a flusso laminare, e diluita fino a 20 ml con sospensione salina specifica per effettuare il conteggio al contaparticelle elettronico Z1 della Merck.

I valori di densità ottenuti in totale per ciascuna specie sono stati utilizzati per il calcolo del tasso di crescita specifico, calcolato secondo la formula: $\mu = \frac{\ln N_L - \ln N_0}{t_L - t_0}$

Dove:

μ è il tasso di crescita specifico

t_0 è l'ora d'inizio del test

t_L è l'ora in cui il test è terminato o quella in cui è stata effettuata l'ultima misura

N_0 è la concentrazione cellulare iniziale

N_L è la concentrazione cellulare misurata al t_L

2.2 Selezione dei sedimenti di controllo

I sedimenti selezionati come controlli negativi dovevano rispondere a predeterminati requisiti: essere axenici, inerti chimicamente, privi di nutrienti e facilmente reperibili. Per questo, ci si è inizialmente serviti di sabbie quarzose per acquari garantiti sotto il profilo microbiologico e chimico, aventi una tessitura omogenea e granulometria di circa 0,1 mm (figura 8).

Figura 8. Sabbia quarzosa per acquario.



Successivamente, confrontando i dati in letteratura (Moreno Garrido, 2003; Adams e Stauber, 2004), si è scelto di utilizzare anche sabbie naturali prelevate in aree definite di bianco, originariamente campionate ai fini di un ripascimento e per questo preventivamente analizzate, e risultate prive di contaminanti organici e metallici, nutrienti (tabella 2). E defaunate preliminarmente a mano, poi tramite congelamento a -5 C° e successiva asciugatura in stufa a 50 C° (Moreno Garrido, 2003 a).

Le sabbie fini naturali campionate provengono da due zone marine diverse (area costiera a Sud di Anzio e sedimenti d'alto mare, circa 10 miglia nautiche al largo di Anzio) ed essendo granulometricamente differenti sono stati denominati Substrato 2 e Substrato 3. Questi, insieme alla sabbia quarzosa, sono stati testati come sedimento di

controllo da impiegare, poi, nei test come bianco negativo rispetto ai campioni di sedimenti contaminati.

Tabella 2 analisi fisico chimica dei sedimenti marini di controllo
(metalli e DDTs espressi come $\mu\text{g/L}$)

	Sed. 2	Sed. 3
pH	7.10	7,10
% sabbia	96,0	85,0
% silt	4,0	15,0
OM %	0,4	0,40
Cd	0,07	n.d.
Cr	5,3	6,4
Cu	2.0	2,2
Pb	3,2	1,8
Sn	0,2	<0,2
DDTs tot	n.d.	n.d.

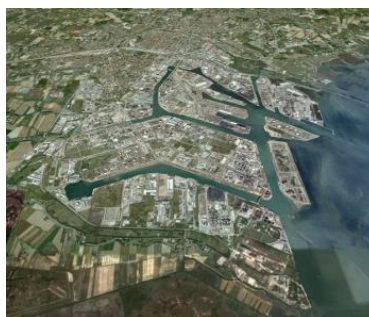
2.3 Preparazione della matrice

I campioni di sedimento selezionato per effettuare i saggi su campioni reali sono stati prelevati in due aree sottoposte a monitoraggio da ISPRA, precisamente: una sezione dell'area portuale di Livorno (figura 9) ed una porzione del bacino lagunare di Porto Marghera (figura 10).

Figura 9. Area portuale di Livorno



Figura 10. Area lagunare di Porto Marghera



Entrambi i siti di prelievo sono interessati da forte impatto ambientale derivante dalle attività antropiche. Le aree portuali sono notoriamente contaminate da metalli pesanti, composti organici riconducibili a biocidi ed idrocarburi (Pellegrini *et al.*, 1999).

La laguna di Porto Marghera, tristemente nota per le vicende legate alla presenza del petrolchimico, è stata classificata come S.I.N (Sito di bonifica d'interesse Nazionale, istituito con la L. n.426 del 1998) e tutte le aree ricadenti all'interno del perimetro geografico del sito (come previsto dal D.M 23.02.2000) sono dichiarate "potenzialmente contaminate" e quindi sottoposte all'obbligo della caratterizzazione, della messa in sicurezza e della bonifica.

L'area lagunare da cui sono stati prelevati i campioni di sedimento utilizzati in questo lavoro, è prospiciente a dei terreni agricoli e prossima allo sbocco di alcuni canali d'irrigazione. La natura della contaminazione nei sedimenti è principalmente da fertilizzanti, materia organica e antiparassitari.

I sedimenti marini campionati in ciascuna delle due aree sono stati analizzati nei laboratori chimici di ISPRA. In tabella 3 sono elencate le principali sostanze contaminanti rinvenute e le caratteristiche granulometriche dei campioni siglati, in base alla specifica provenienza, Sed Li I e Sed PM II.

Tabella 3. Contaminanti rilevati nei sedimenti usati come campioni
(metalli e DDTs espressi come $\mu\text{g/L}$)

	Sed Li I	Sed PM II
pH	7.00	6.57
% sabbia	65	80
% silt	35	20
OM %	2,5	5,4
Cd	3,3	1,0
Cr	51	32
Cu	1309	1158
Pb	320	286
Sn	15	7.3
DDTs tot	0,20	0,51

Ciascuna aliquota è stata raccolta dai primi 5 cm di ciascun sedimento, è stata conservata in un barattolo sterile da 200 ml e conservata a 4 C°.

In laboratorio, ciascun campione è stato diviso in due aliquote: la maggiore di circa 10 cm³ è stata privata da materiale grossolano, pietre, valve di molluschi e resti di crostacei (Adams e Stauber, 2004), congelata a -5 C° per completare il processo di defaunamento dai grazers autoctoni, poi posta in stufa a 50 C° (Moreno Garrido *et al.*, 2003).

Da essa sono state ricavate tre frazioni di 3 cm³ che sono state collocate all'interno di un beker da 250 ml e reidratate con 20 ml di acqua marina sintetica ISO 10253.

Quest'ultime operazioni sono state svolte sotto cappa a flusso laminare per evitare che le aliquote fossero contaminate.

La rimanente quota di sedimento (circa 5 cm³) viene invece utilizzata per l'estrazione dell'elutriato con cui effettuare i saggi di confronto.

Per questo scopo, è stata pesata la frazione di sedimento utile per il test (circa 30 gr), diluita in rapporto 1:4 volume/volume con acqua marina sintetica, posta in agitazione per 60 minuti su agitatore a 120 rpm, poi centrifugata per 30 minuti a 3500 rpm.

Il surnatante così ottenuto è stato filtrato a 0,45 µm sotto cappa a flusso laminare e conservato in frigorifero a 4 C° prima di essere impiegato per il test (ASTM, 1991).

In tabella 4 un confronto di sintesi delle due preparative delle matrici su esposte.

Tabella 4. Procedura di preparazione del sedimento tal quale e dell'elutriato.

Fase solida	Elutriato
• Congelamento a -5 C di un'aliquota pari a 10 cm³ per eliminare la fauna autoctona • Asciugatura in stufa a 50 C • Prelievo di 3 cm³ di sedimento • Deposizione sotto cappa del campione in becker da 200 ml e idratazione con 20 ml di acqua marina sintetica (ISO 10253)	• Diluizione di un'aliquota di sedimento con acqua marina sintetica ISO in rapporto 4:1 (v/v) • Agitazione della miscela per 1h • Centrifugazione refrigerata per 30 min a 3500 rpm • Prelievo del surnatante • Filtrazione con filtri a siringa da 0,45 µm

2.3.1 Preparazione delle soluzioni madri

Per la preparazione dei mezzi di coltura a diverse salinità (intervallo testato: 20 PSU, 30 PSU, 35 PSU, 40 PSU, 45 PSU), funzionali alla verifica dell'effetto delle variazioni di salinità sulla crescita algale sul substrato di controllo, è stata preparata una soluzione madre di acqua marina sintetica secondo ricetta ISO 10253, 2 volte più concentrata (salinità iniziale 64 PSU) rispetto alla salinità standard (32 PSU).

Aliquote di circa 200 ml di tale soluzione sono state successivamente diluite con acqua ultrapura MilliQ®, sotto cappa a flusso laminare, fino ad ottenere le concentrazioni dell'intervallo da testare.

Per la preparazione dei mezzi di coltura arricchiti in nutrienti, utile alla valutazione degli effetti di questi sul metabolismo algale e all'individuazione di una NOEC o di una LOEC sperimentale, è stato utilizzato il sale (RPE) di cloruro d'ammonio (NH₄Cl) diluito in acqua ultrapura MilliQ® fino ad ottenere una soluzione madre a concentrazione nominale di 1000 mg/l.

Dalla soluzione madre sono state prelevate aliquote poi diluite in terreni di coltura completi di tutti i nutrienti (ricetta ISO 10253) fino ad ottenere le concentrazioni finali di 5 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l, 40 mg/l.

I terreni di coltura nell'intervallo su citato sono stati usati nei saggi algali su substrato di controllo. Le concentrazioni selezionate sono state desunte dai dati di monitoraggio costiero (Ministero dell'Ambiente- Servizio Difesa Mare e ICRAM, 2000) effettuato nei trienni 1996-1999 e 2001-2003 ai sensi della legge n. 979/82, e sono relative alle concentrazioni di azoto misurate nei sedimenti marini situati in aree fortemente impattate dalle attività antropiche (scarichi agricoli ed urbani).

Simulando in laboratorio le peggiori condizioni riscontrabili negli ambienti marini contaminati, si intende acquisire informazioni utili alla previsione degli effetti indotti da matrici reali, in cui la fonte prevalente della contaminazione è la sostanza organica.

2.3.2 Misura dei parametri di controllo e criteri di validità dei test

Salinità: la misura della salinità nelle colture di mantenimento, all'inizio dei saggi e nelle prove specifiche sui confounding factors è stata effettuata tramite riflettometro Bertuzzi- Brugherio mod. S-28.

Azoto: la verifica delle concentrazioni nominali delle soluzioni arricchite con cloruro d'ammonio è stata effettuata tramite sistema Reflectoquant® della MERCK costituito da kit colorimetrico specifico per la misura dello ione ammonio e dal fotometro da banco Rqflex®. Le misure sono state eseguite prima dell'inizio dei test ed alla loro fine (dopo aver effettuato i prelievi per conteggi algali).

pH: come da prassi, in ogni saggio ecotossicologico, è stato verificato il valore del pH all'inizio ed alla fine di ogni test (precisamente: prima dell'inoculo algale e dopo i prelievi per i conteggi) tramite pHmetro Crison mod.507.

La verifica si rende necessaria perché variazioni di pH superiori a ± 1 possono causare falsi positivi interferendo con il normale metabolismo algale.

Il pH ottimale per la specie target *P.tricornutm* è 8, il range di tolleranza è compreso tra 6 e 9 (protocollo ISO 10253, 2006).

Condizioni di validità di ciascun test: alla fine del periodo di incubazione, la CA72 in ogni replica del controllo deve essere almeno 16 volte superiore alla CA iniziale (pari a 10.000 cell/ml).

Il coefficiente di variazione delle repliche dei controlli deve essere pari o inferiore al 10%.

2.4 Esecuzione del saggio sul sedimento

Il metodo di seguito descritto è stato utilizzato per la determinazione di effetti tossici di composti chimici biodisponibili sulla crescita di una popolazione algale.

Le vie di esposizione possibili sono il contatto con i granuli di sedimento, l'acqua interstiziale, i flussi di scambio all'interfaccia acqua-sedimento.

L'organismo utilizzato è la diatomea unicellulare ed epibentonica *Phaeodactylum tricornutum*.

Il principio del metodo consiste nel lasciare crescere, per un periodo predeterminato di 72 ore, una popolazione algale in fase di crescita esponenziale esposta ad un matrice solida sconosciuta immersa in un terreno di coltura sterile.

Al termine del periodo d'incubazione, in ogni coltura è stata misurata la crescita algale (CA72). L'inibizione o lo sviluppo è stato determinato, rispettivamente, come riduzione o aumento della crescita rispetto ad una coltura di controllo, costituita da sedimento sterile ed inerte immerso in terreno nutritivo sterile, mantenuto nelle stesse condizioni fisiche.

Per l'allestimento del saggio sono stati adoperati becker da 200 ml in vetro Pyrex e sacche da dialisi, sterili in cellulosa rigenerata della SpectraPor1®, usate come setto separatore semipermeabile tra la fase solida e gli organismi algali (Mura *et al.*, 1996; Dalsgaard e Krause-Jensen, 2006).

La presenza del diaframma costituito dalla sacca da dialisi permette che si realizzino scambi chimici tra le superfici interne ed esterne ed impedisce che particelle di sedimento, microorganismi o grazers entrino in contatto con le alghe, ed a quest'ultime di disperdersi sulla superficie del sedimento.

Predisposti i becker in triplice replica, con il campione di sedimento sottoposto alla sacca da dialisi, è stato preparato l'inoculo algale conteggiando circa 100.000 cell/ml e inoculato in ciascun becker per ottenere una concentrazione finale di *P.tricornutum* pari a 10.000 cell/ml. Il volume di terreno di coltura finale è di circa 50 ml.

Ogni microcosmo così predisposto è stato coperto con un singolo strato di parafilm e incubato in camera termostatica ventilata per 72 ore a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, con regime di illuminazione continua.

Al termine del periodo stabilito è stata determinata la CA72 mediante contaparticelle elettronico Z1 ed effettuata la verifica random dei conteggi e della morfologia degli organismi al microscopio tramite sistema della lettura dei campi (metodo Utermohl, 1979).

I valori di CA72 conteggiati in ciascuna delle tre repliche del campione e del controllo sono stati utilizzati nel test F per la verifica dell'omogeneità della varianza e, di seguito, per l'applicazione del test t di Student per la stima della significatività della differenza tra la CA72 di campione e controllo.

Le differenze sono state considerate significative se oltre ad eccedere $\pm 10\%$ rispetto al controllo, risultano avere un p inferiore a 0,05 (Sarni e Onorati, 2009).

2.4.1 Esecuzione del saggio sull'elutriato

Predisposta l'aliquota di alghe in fase di crescita esponenziale pari a 100.000 cell/ml, è stato effettuato l'inoculo di 2 ml in 18 ml di elutriato estratto dal sedimento da analizzare, per ottenere la densità finale di 10.000 cell/ml.

Gli elutriati in triplice replica per ciascun campione ed i controlli sono posti in beute da 100 ml in vetro Pyrex ed incubati per 72 ore in camera termostatica nelle condizioni di luce e temperatura già descritte sopra.

Al termine del periodo di incubazione, ciascuna replica di campione controllo è stata conteggiata tramite contaparticelle elettronico Z1 della Merck ed i risultati ottenuti sottoposti al test parametrici F e t di Student. Similmente al procedimento di elaborazione già descritto, vengono considerate significativamente diverse dal controllo delle CA72 che eccedano $\pm 10\%$ del controllo e che abbiano un p inferiore a 0,05.

In tabella 5 una sintesi comparativa dei passaggi principali delle due metodiche.

Tabella 5. Confronto tra le caratteristiche delle metodiche utilizzate.

Specie target	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	
Tipo di test	Tossicologico, statico	Ecotossicologico, statico
Matrice testata	Elutriato	Sedimento tal quale
Durata	72 h	
Acqua marina sintetica	ISO 10253, 2006	
Controllo	ISO 10253, 2006 + Nutrienti	
Salinità	32 PSU	
Fotoperiodo	Illuminazione continua	
Intensità luminosa	7000 lux	
Temperatura	20 ± 2 C°	
pH	8,0 ± 1	
Fase del ciclo vitale	Crescita esponenziale	
Inoculo iniziale	10.000 cell/ml	
Volume di campione	50 ml	5-10 gr
Contenitore	Beuta in vetro 125 ml	Beker in vetro da 100-200 ml
Numero di repliche	3	
Concentrazioni testate	100% (tal quale)	
End points	Crescita della popolazione algale	
Strumenti di conteggio	Contaparticelle elettronico Z1, camera Neubauer e microscopio	
Analisi dati	% effetto rispetto al controllo, t test	
Criteri di validità del test	CA72 del controllo almeno 16 volte > all'inoculo iniziale, CV entro il 10%	
Protocolli di riferim.	ARPAT (draft, 2006), ISO 10253	Moreno Garrido, 2003

2.5 Piano sperimentale

In tabella 6 la sintesi delle prove sperimentali effettuate in successione cronologica.

Tabella 6. Quadro sinottico delle prove pianificate.

	Attività sperimentale	Obiettivi
I ANNO	• Prove di crescita e mantenimento su ceppi algali monoclonali; • test su sedimento di controllo	• selezione della specie target • selezione del substrato di controllo
II ANNO	• test di verifica dei controlli • test con le sacche di dialisi come setto separatore	• verificare la variabilità tra i controlli e la riproducibilità dei dati ad essi relativi • verificare l'applicabilità delle sacche e la loro funzionalità allo sviluppo della metodica
III ANNO	• test sui confounding factors • test su matrici ambientali • confronto tra nuovo metodo e metodo standard	• verificare l'esistenza di falsi positivi o negativi • verificare la sensibilità specifica e l'applicabilità della metodica a matrici reali e valutare le informazioni ottenute

3. Risultati e discussione

3.1 Curve di crescita

Nei grafici di seguito, sono illustrati l'andamento medio della crescita in fase esponenziale dell'alga *P.tricornutum* (figura 11) e dell'alga *C.closterium* (figura 12).

I valori graficati rappresentano le medie di densità cellulari misurate nell'arco di tre mesi su 12 successive colture clonali nei 4 giorni successivi all'inoculo.

Figura 11. Andamento in fase esponenziale di *P.tricornutum*

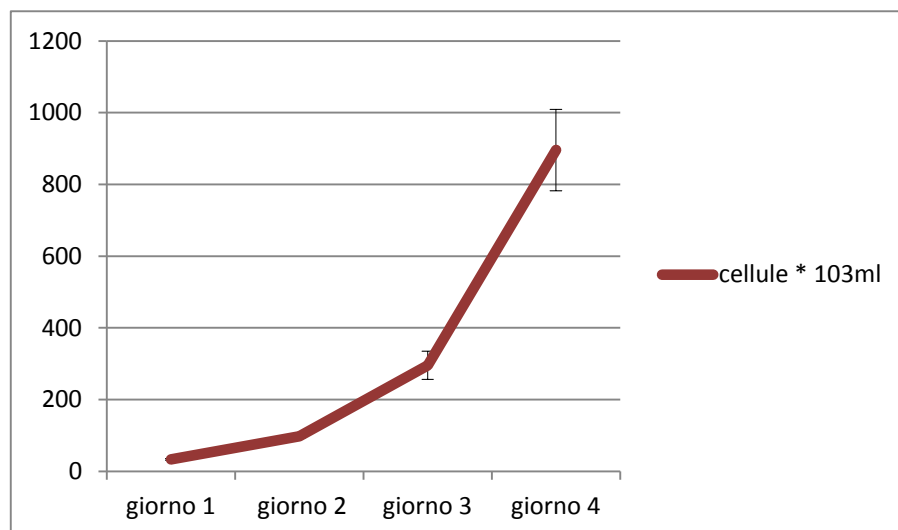
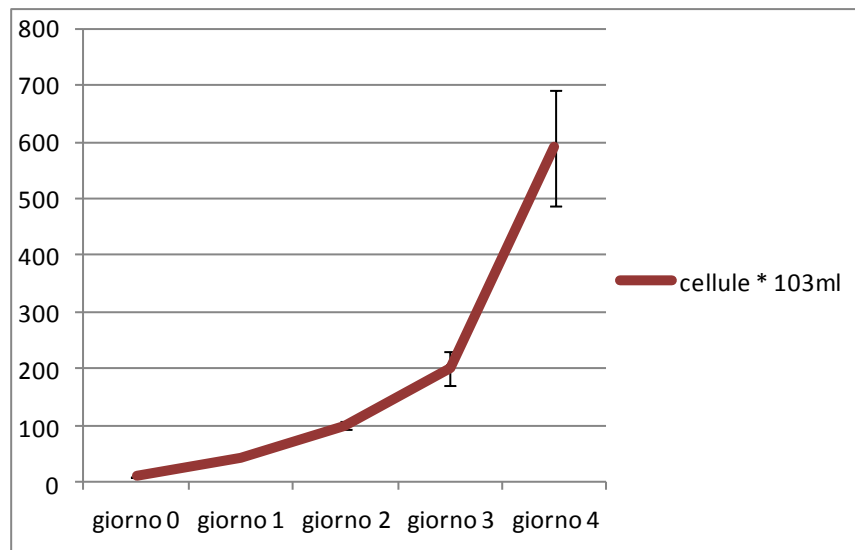


Figura 12. Andamento in fase esponenziale di *C. closterium*



In tabella 7 la sintesi dei dati relativi alla velocità media di crescita dei due organismi target.

Tabella 7. Confronto tra i tassi di crescita delle 2 specie

Organismo target	Tasso di crescita
<i>P. tricornutum</i>	1,10 d ⁻¹
<i>C. closterium</i>	0,90 d ⁻¹
Pennales	0,90 d ⁻¹

Il confronto tra i rispettivi tassi di crescita (μ) in tabella 7 ha evidenziato che *P. tricornutum* ha un tasso medio di crescita più rapido di *C. closterium*.

Dai dati in letteratura (OECD 1984; ISO 2006) si evince che il tasso di crescita relativo alle specie in oggetto (valore compreso tra 1 e 0,9 d⁻¹) è confrontabile con quelli ottenuti sperimentalmente nelle condizioni di laboratorio adottate e che variazioni rispetto a questi valori sono da imputare alle capacità di fitness specifica di ciascun ceppo algali.

Sotto questo punto di vista, va riportato che le popolazioni di *P. tricornutum* si sono dimostrate più vitali di quelle di *C. closterium*. Queste ultime, infatti, nel periodo

occorso per la stabilizzazione delle curve di crescita intorno a valori ripetibili e prevedibili, hanno mostrato più volte andamenti anomali in vari passaggi della progressione delle curve di crescita (rallentamenti nello sviluppo durante la early exponential phase o fase esponenziale iniziale, fasi di plateau precoci).

Tali situazioni possono essere ricondotte ad eventi accidentali relativi al periodo d'incubazione delle alghe: infezioni microbiche, o a sbalzi di tensione che hanno determinato un'illuminazione disomogenea o a fenomeni di agglutinazione delle cellule che hanno limitato l'assimilazione dei nutrienti (Nyholm e Kallqvist, 1989; Sbrilli *et al.*, 1998). In conseguenza del ripetersi in più di un'occasione di queste improvvise alterazioni della crescita, la diatomea *C. closterium* è stata ritenuta meno stabile ed affidabile in condizioni di mantenimento della specie concorrente.

Presumibilmente il ceppo di *P. tricornutum* “vive” meglio nelle condizioni di laboratorio e ciò è dovuto probabilmente anche ad un migliore adattamento al tipo di terreno di coltura (ISO 10253), elaborato quasi appositamente per l'alga e probabilmente più metabolizzabile per la specie di *P. tricornutum* che *C. closterium*.

Sulla base degli andamenti della crescita delle due popolazioni si è pertanto potuto stabilire quale delle due potesse essere scelta come organismo target con cui procedere nel piano sperimentale. E la scelta è caduta su *P. tricornutum*.

3.2 Tests preliminari sulle “matrici di controllo”

Le prove preliminari effettuate su sedimento di controllo, cioè il substrato da usare come “bianco” o falso positivo nei test successivi, sono state cruciali per l’intera sessione sperimentale.

Dalle prime prove effettuate su sedimento sabbioso quarzoso per acquari con *P.tricornutum* e *C. closterium* si è osservata una notevole variabilità tra le repliche di ciascuna specie.

Proseguendo i test preliminari solo con *P.tricornutum* si è continuato ad osservare il fenomeno di un’eccessiva variabilità (CV pari al 18%).

Dai dati in letteratura relativi all’esecuzione di test su sedimenti con microalghe bentoniche è emerso che la granulometria del sedimento interferisce in modo più o meno spinta sulla crescita algale in rapporto alla percentuale di silt presente (Adam e Stauber, 2004), e che in linea generale era da tenere presente l’effetto di shadowing che si manifesta quando, per agitazione del microcosmo che contiene il test, i granuli di sedimento si spostano “seppellendo” le alghe, lo stesso fenomeno avviene anche a causa di “correnti” oppure per addensamenti casuali delle alghe che si infossano (Moreno Garrido, 2003; Adam e Stauber, 2004; Moreno Garrido, 2007).

Per ovviare a questo inconveniente sono stati selezionati come “controlli” sedimenti sintetici quarzosi (Substrato 1), sabbie naturali (Substrato 2), sabbie naturali con una percentuale del 10% di fanghi di fondale (Substrato 3).

I sedimenti naturali sono stati prelevati in aree non disturbate da impatto antropico e preventivamente analizzate per garantire che non vi fossero concentrazioni sospette di metalli e nutrienti.

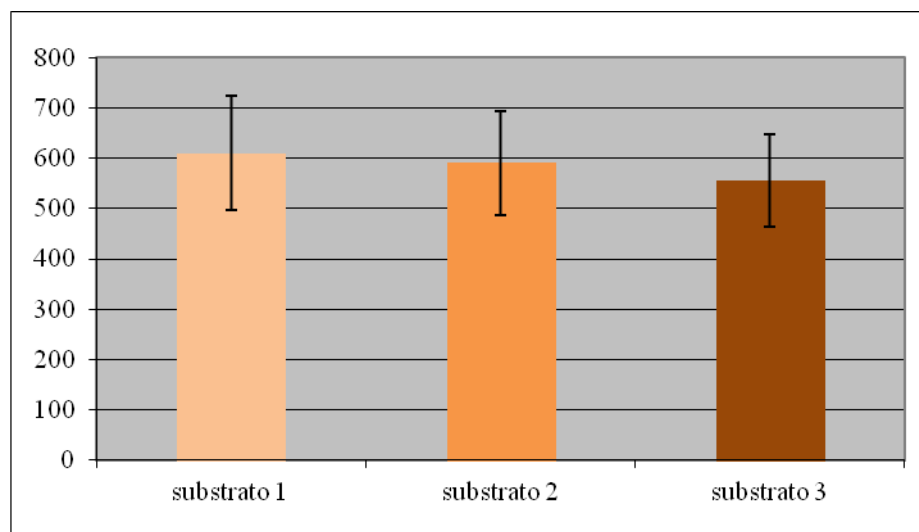
Inoltre sono state sperimentate le sacche da dialisi, già impiegate per test *in situ* da Mura (1996) e Dalsgaard (2006), come setti separatori tra la fase solida e gli organismi, al fine di limitare lo shadowing e valutare se fosse attribuibile prevalentemente a questo l’eccessiva variabilità tra le repliche osservata in precedenza.

In tabella 8 sono riportati i valori del p dei t test effettuati per confrontare le crescite algali sui tre sedimenti di controllo individuati, mentre in figura 13 sono confrontati i risultati relativi alla crescita dell'alga e le relative deviazioni standard.

Tabella 8. Confronto tra i p relativi alle densità algali medie avvenute sui tre substrati.

	Substrato 1	Substrato 2	Substrato 3
Substrato 1	-----		
Substrato 2	0,09	-----	
Substrato 3	0,06	0,08	-----

Figura 13. Confronto tra le crescite algali e relative deviazioni standard sui tre substrati.



Dal confronto è emerso che le popolazioni crescono in maniera omogenea, perlomeno senza nessuna “significativa differenza imputabile ai tre substrati, che costituiscono l’unica variabile inserita nei tre saggi. Il miglior rapporto tra valore del p e tipo di substrato è espresso dal substrato 2 (sabbia fine naturale) che oltre a permettere una crescita normale delle popolazioni di *P.tricornutum* (fattore di crescita > 16) risulta

essere anche più pratico ed economico del sedimento quarzoso. In ragione di ciò è stato scelto come sedimento di controllo nelle successive fasi sperimentali.

Inoltre è stato appurato che l'impiego delle sacche limita fortemente la variabilità tra le repliche (figura 13, nella pagina precedente) infatti il CV è risultato pari al 10% nei test sui substrati, ritornando entro i valori di accettabilità del controllo (APAT 1998). Quest'ultimo dato, unito al fatto che l'impiego delle sacche evita lo shadowing ed esclude la possibilità che le alghe possano essere predate da grazers (Dalsgaard, 2006) sfuggiti al processo di defaunamento (rendendolo, anzi, praticamente superfluo), è stato determinante nel decidere di impiegarle in tutte le successive prove.

3.3 Tests sui confounding factors

Il passo successivo all'identificazione di un substrato inerte idoneo come sedimento di controllo ed alla riduzione entro limiti accettabili della variabilità delle colture di controllo, è consistito nel valutare l'influenza che diverse salinità e diverse concentrazioni di ammonio in soluzione possono indurre sulla crescita delle popolazioni algali.

Testare le variabili che maggiormente producono stress sugli organismi target è funzionale ad evitare falsi positivi o falsi negativi (Postma et al., 2002).

Nel caso delle alghe, i fattori cui sono maggiormente sensibili, poiché hanno un'influenza diretta sul loro metabolismo, sono la salinità ed i nutrienti, nella fattispecie l'ammonio (Guerrini 2000; Sbrilli *et al.*, 2003).

Le diatomee sono organismi azoto-limitate, cioè più sensibili alle carenze o alla disponibilità di nutrienti azotati che fosforati (Chiaudani *et al.*, 1978), per questo si è proceduto a testare concentrazioni crescenti di sali ammoniacali (cloruro d'ammonio) per individuare un'eventuale NOEC o LOEC.

Gli effetti delle variazioni di salinità sono stati studiati esponendo colture in fase esponenziale a terreni con valori superiori ed inferiori (l'intervallo considerato va da 20

a 45 PSU) rispetto alla salinità standard (32 PSU), senza effettuare nessun tipo di pre-acclimatamento, e sono stati conteggiati i valori di crescita alla 72^a ora.

In tabella 9 sono riportati i valori del p dei t test accoppiati effettuati sui valori di densità ottenuti.

Tabella 9. Confronto tra coppie di valori di salinità effettuato tramite t test.

	20 PSU	30 PSU	35 PSU	40 PSU	45 PSU
20 PSU					
30 PSU	0,12				
35 PSU	0,12	0,12			
40 PSU	0,07	0,09	0,14		
45 PSU	0,05	0,08	0,08	0,15	

Come si osserva dall'andamento dei p, esiste una sorta di “gradiente” salino che si manifesta in termini significativi nella coppia 20 PSU-45 PSU: la differenza percentuale media nella crescita algale è pari al 13,0 % $\pm$ 3,0 e il p calcolato nel test di Student è pari al 0,047. Pertanto il campione 45 PSU ha mostrato una tendenza ad essere significativamente differente dal 20 PSU, ed ha prodotto uno sviluppo algale del 13 % inferiore rispetto a quest'ultimo.

In generale i campioni cresciuti a salinità comprese tra 20 e 35 PSU non hanno mostrato significative differenze nella crescita degli organismi, come confermato anche da dati in letteratura (Bonin *et al.*, 1986, Walsh *et al.*, 1988).

Per valori superiori della salinità (40 e 45 PSU) è possibile osservare l'inizio di un trend, in senso inibitorio, della crescita algale. Rispetto ai campioni “oligoalini”, il valore di 45 PSU può rappresentare una LOEC, mentre per valori intermedi (30 e 35 PSU) il valore di 45 PSU può essere interpretabile come una NOEC.

In ogni caso, alle concentrazioni saline maggiori si sono osservate crescite algali minori o rallentate, anche se statisticamente non significative rispetto alla salinità standard d'esercizio (32 PSU). Rapportando questo risultato all'applicazione dei saggi su matrici reali, va osservato che, nei casi di sedimenti prelevati in ambienti “eurialini” (lagune,

aree costiere chiuse o in casi di elevata evaporazione) dovrebbe venir effettuata l'acclimatazione preventiva delle colture algali o predisposta una serie di controlli alla stessa salinità della matrice per non incorrere in falsi positivi.

Precauzione che non si è dimostrato necessario prendere, invece, per i campioni a salinità compresa tra 20 e 40 PSU.

Relativamente ai nutrienti, in tabella 10 sono riportati i risultati dei saggi effettuati su terreni arricchiti in cloruro d'ammonio nelle concentrazioni effettive di 5, 10, 20 mg/L di NH_4^+ (verificata tramite riflettometro RQ Flex) in condizioni di salinità e temperatura standard (rispettivamente 32 PSU e $20\text{ C}^\circ \pm 2$).

Tabella 10. Risultati dei saggi sui concentrazioni note di NH_4^+ .

Concentrazione NH_4^+	% effetto $\pm$ dev. St.	p (t test)	Effetto osservato
5 mg/L	$8,2 \pm 4,1$	0,09	Nessun effetto
10 mg/L	$11,3 \pm 3,2$	0,09	Nessun effetto
20 mg/L	$42,0 \pm 11,2$ (LOEC)	0,03	Eutrofizzante
40 mg/L	$113,4 \pm 18,1$	0,001	Eutrofizzante

Dalle prove effettuate è stato osservato che a concentrazioni inferiori di 20 mg/L non si è prodotto nessun effetto significativo sulla crescita algale. Per concentrazioni di cloruro d'ammonio pari a 20 mg/L è stato osservato un marcato effetto biostimolante (eutrofizzante) sul metabolismo algale, misurabile con uno sviluppo superiore al controllo del 40,0 %.

Il valore individuato (20 mg/L) tra gli intervalli di concentrazione testati può essere considerato come LOEC. Tali risultati sono in accordo con quanto riportato in Sbrilli *et al.*, 2003; Bianchi *et al.*, 2003 e risultano particolarmente interessanti nei casi di applicazioni dei saggi algali, in quanto il rapporto tra lo sviluppo algale e la presenza di nutrienti è cosa nota (Glass *et al.*, 1998; Harkey *et al.*, 2000; Stimson *et al.*, 2000).

Il contributo dei nutrienti diventa ancora più rilevante se si considera che i sedimenti possono essere considerati ricchi depositi di materia organica, facilmente biodisponibile per gli organismi algali grazie agli scambi chimici ed ai flussi all'interfaccia acqua-sedimento (Frignani e Turci, 1981, Brady, 1996; Brown *et al.*, 1998) che permettono la solubilizzazione dei composti dell'azoto legati alla fase solida e la loro assimilazione da parte dei popolamenti fitobentonici *in primis* (Randall *et al.*, 1992; Parnell *et al.*, 1994; Guerrini *et al.*, 2000).

L'attenta valutazione della provenienza di sedimenti da analizzare (aree industriali, aree prossime a scarichi urbani, aree agricole e portuali) e la misura della concentrazione dei nutrienti andrebbe preventivamente effettuata prima di eseguire i saggi.

Tale accorgimento potrebbe servire ad evitare che possano verificarsi effetti di schermatura degli effetti tossici causati dal contemporaneo rilascio di nutrienti che mascherano la presenza di contaminanti di altra natura inducendo falsi negativi o effetti eutrofizzanti, che non vengono quasi mai considerati alla stessa stregua di effetti inibitori, rischiando una sottostima dei reali rischi per l'ambiente rappresentati dalla matrice in esame (Glass *et al.*, 1998; Stimson *et al.*, 2000).

3.4 Tests su campioni reali

Per poter valutare l'applicabilità del saggio a matrici marine reali secondo la metodica qui proposta, sono state selezionate due tipologie di sedimento:

- Sedimenti portuali provenienti dal porto di Livorno, campionati nell'ambito di uno studio preliminare all'esecuzione di un dragaggio per mantenere e/o ampliarne la navigabilità.
- Sedimenti marini provenienti dalla laguna di Porto Marghera, campionati in un tratto di laguna prospiciente un'area agricola.

Entrambe le tipologie di sedimento dovevano essere sottoposte ad analisi ecotossicologiche ai sensi della Legge n. 152/06 con una batteria di test.

Nel primo caso, tale indagine era funzionale, insieme alle analisi chimiche, a stabilire se il sedimento da dragare potesse essere smaltito in aree di dumping offshore oppure andasse confinato in vasca di colmata.

Il secondo, invece, rientrava nell'ambito di un esteso piano di monitoraggio per caratterizzare le condizioni ecotossicologiche di varie aree della laguna, attualmente inserita tra i SIN (Siti di Interesse Nazionale).

In entrambi i casi, il piano analitico originale prevedeva come test sui produttori primari, il saggio algale su elutriato.

Nel presente lavoro, sono stati eseguiti i saggi su fase solida con aliquote dei sedimenti su descritti e confrontati i risultati con quelli ottenuti sull'elutriato.

La specie target impiegata per confrontare le due tipologie di saggio è stata *P.tricornutum*, essendo questa al contempo fitoplanctonica ed epibentonica (Araujo, 2010), nonché presente nella norma ISO 10253.

In tabella 11 sono presentati i risultati dei test sul sedimento tal quale.

In tabella 12 e figura 14 è stato rappresentato il confronto tra i risultati sulle due diverse matrici: sedimento ed elutriato.

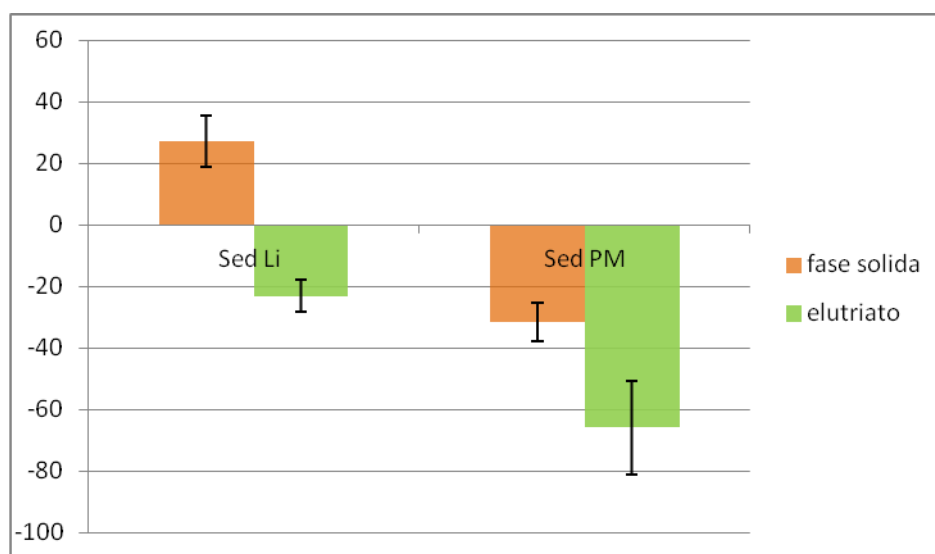
Tabella 11. Risultati dei saggi con *P.tricornutum* su fase solida.

Sigla campione	Δ % rispetto al controllo $\pm$ DS	p (t test)	Effetto sulla crescita
Sed I Li	27,1 $\pm$ 8,5	0,03	Inibente
Sed II PM	-31,6 $\pm$ 6,3	0,01	Eutrofizzante

Tabella 12. Confronto tra i risultati dei saggi su fase solida ed elutriato.

Sigla campione	Fase solida		Elutriato	
	Δ % rispetto al controllo $\pm$ DS	p (t test)	Δ % rispetto al controllo $\pm$ DS	p (t test)
Sed I Li	27,1 $\pm$ 8,5	0,03	-23,1 $\pm$ 5,2	0,04
Sed II PM	-31,6 $\pm$ 6,3	0,01	-65,9 $\pm$ 15,3	0,01

Figura 14. Confronto tra i saggi su fase solida (in marrone) ed elutriato (in verde).



Come si può vedere dal confronto tra i risultati ottenuti con la stessa specie su due matrici diverse (tabella 12), gli effetti manifestati dalle cellule algali esposte a fase solida sono stati di inibizione della crescita nel campione Sed I Li, di incremento della crescita rispetto al controllo nel campione Sed II PM.

Gli elutriati, estratti dagli stessi campioni, hanno prodotto effetti eutrofizzanti in entrambe i casi, ma in percentuale d'effetto diversa (rispettivamente: il 32 % di CA72 in più rispetto al controllo in Sed I, il 66 % di CA in più rispetto al controllo in Sed II PM).

Nel grafico a istogrammi in figura 14, si può osservare meglio la differenza di risposta dell'organismo alla diversa matrice cui è stato esposto.

La matrice rappresenta l'unica variabile del caso, dal momento che i saggi su sedimento ed elutriato sono stati eseguiti nelle medesime condizioni sperimentali: stesso periodo d'incubazione, stesso regime di illuminazione continua, stessa acqua marina sintetica, stessa percentuale di nutrienti nel terreno di crescita, stesso inoculo algale iniziale.

L'effetto matrice produce sviluppi algali significativi negli elutriati, d'altra parte, è un risultato piuttosto ricorrente nel binomio elutriato-fitoplancton, come ben sanno tutti gli operatori di saggio algale.

La probabile spiegazione risiede nel fatto che la preparazione stessa della matrice permette ai nutrienti idrofili di entrare in soluzione, e di sommare il loro contributo nutritivo a quello del terreno di crescita. Un aspetto concomitante è che nell'analisi degli elutriati da sedimento, si sostiene che la massiccia concentrazione di nutrienti mascheri la presenza di possibili contaminanti (Sbrilli *et al.*, 2003), impedendo loro di manifestare effetti sugli organismi algali.

Le prove effettuate sui sedimenti tal quali hanno prodotto, invece, effetti diversi. L'inibizione della CA72 avvenuta sui substrati ottenuti da sedimenti portuali può riflettere la presenza di contaminanti di varia natura (idrocarburi, alcune specie metalliche quali Pb e Cd), confermata dalle analisi chimiche.

In questo caso, quindi l'entità degli scambi all'interfaccia acqua-sedimento tra nutrienti solubili e colonna d'acqua non sarebbe stata in grado di sovrastare gli effetti tossici indotti dalle altre sostanze adsorbite ai granuli di sedimento.

Un discorso simile può essere sostenuto per spiegare i risultati del secondo sedimento: dall'analisi chimica si è evidenziata la presenza di pesticidi e composti azotati, riconducibili con grande probabilità all'uso di prodotti fertilizzanti.

Ciò che è evidente nel confronto tra le due matrici è l'entità dell'effetto stimolante la crescita: esso è più pronunciato nell'elutriato.

A riguardo, si potrebbe osservare che probabilmente, anche in questo caso, sussiste un effetto “maschera” sulle proprietà tossiche del sedimento, ma rimane il fatto che l'elutriato è in grado di concentrare nutrienti solubili e di produrre effetti non paragonabili a quelli dei reali scambi tra le due fasi solido-liquida nell'interfaccia acqua-sedimento.

Verosimilmente, gli effetti eutrofizzanti osservati sul microcosmo contenente il sedimento tal quale Sed II PM potrebbero essere più vicini, o più rappresentativi, di ciò che potrebbe avvenire in natura in un sedimento costiero d'acqua bassa cronicamente interessato da sversamenti di sostanza organica e prodotti fitosanitari.

Le diverse informazioni, ottenute dall'applicazione dei due saggi sulle due matrici, in ogni caso, non sono in contraddizione tra loro, al contrario, possono essere considerate come elementi che integrano lo stesso quadro.

Sulla base dell'esperienza maturata nello specifico campo, viene ritenuto quasi scontato che un elutriato produca effetti stimolanti sulle alghe.

Questo è il motivo per cui questa precisa combinazione ecotossicologica fornisce indicazioni poco aderenti alla reale condizione del sistema naturale che si propone di esaminare, ma può avere, comunque, un valore previsionale qualora lo si associ al verificarsi di condizioni artificiali: un dragaggio, o un'aratura meccanica su fondale. Nella sua formulazione originale, descritta nel protocollo USACE del 1991, l'elutriato

doveva servire proprio a questo: a riprodurre gli effetti di un intervento perturbativo acuto o cronico, ma intenso, sull'ecosistema di fondale (dragaggio, aratura, messa in posa di cavi, escavo). Successivamente è diventata la matrice con cui valutare gli effetti dei sedimenti marini sul fitoplancton, e questa applicazione si è dimostrata inadeguata, oltrechè un'estrapolazione forzata (Ankley et al., 1991; Sassoon Brickson e Burton, 1991).

Alla domanda di rappresentare realisticamente gli effetti dei campioni di sedimento marino Sed I Li e Sed II PM, probabilmente possono rispondere in modo adeguato i risultati dei saggi su fase solida o, detto più cautamente, possono provare a rispondere.

4. Conclusioni

Le alghe microfitobentoniche sono la base della rete alimentare degli ecosistemi bentici, contribuiscono al mantenimento della coesione del sedimento (MacIntyre *et al.*, 1996; de Bower *et al.*, 2003), vivono sullo strato superficiale del fondale e nell'acqua immediatamente sovrastante, fungendo da elemento di contatto tra i due sistemi ecologici (Blanchard *et al.*, 2000).

Dal punto di vista eco tossicologico, si sono dimostrati organismi di facile reperibilità, facilmente coltivabili in laboratorio, gestibili con costi limitati e contemporaneamente con una considerevole idoneità sui principali fronti di applicabilità dei saggi: provata sensibilità alla presenza dei principali contaminanti che interessano le matrici solide (Adam e Stauber, 2004; Araujo, 2010), rilevanza ecologica, rappresentatività rispetto alla matrice da analizzare ed appartenenza al suo stesso ecosistema (Stauber e Florence, 1985; Chapman, 2002; Hogan *et al.*, 2005; Araujo *et al.*, 2008).

Le prove condotte hanno dimostrato che l'alga epibentonica-fitoplanctonica *Phaeodactylum tricornutum*, specie cosmopolita ma ampiamente diffusa e distribuita nei mari italiani, possiede tutti i requisiti principali per rivestire il ruolo di specie target nell'esecuzione di saggi di inibizione della crescita algale su sedimento marino tal quale.

La ricerca e l'applicazione di saggi su fase solida si è estesa agli organismi fitobentonici solo negli ultimi anni, con grande soddisfazione, per chi considerava le batterie di saggi per la caratterizzazione dei sedimenti, carenti proprio di specie target-rappresentanti dei produttori primari del sistema benthico.

I dati esistenti sulle possibili metodiche, applicabili alle matrici solide marine, hanno confermato che la ricerca di una metodologia meno centrata sull'essere internazionale ma più rispecchiante la composizione ecologica locale degli ambienti indagati è probabilmente la migliore via da percorrere per ottenere informazioni ecotossicologiche più realistiche e quindi di maggiore valore ecologico.

Il vantaggio principale consiste nel fatto che queste informazioni possono essere utilizzabili per valutare con più ampi margini di realismo lo stato di qualità dei sedimenti e per poter formulare previsioni circostanziate sulle possibili attività di gestione dei sedimenti (dragaggio, movimentazione, ripascimenti) che rientrano oggi nella manutenzione ordinaria di aree deputate alle attività umane (porti, centri urbani costieri, impianti industriali prospicienti il mare) e che possono essere spese per dare un ulteriore contributo conoscitivo a chi deve gestire i sedimenti ed i problemi derivanti dalla loro contaminazione.

Nel lavoro svolto si è potuto sperimentare che l'utilizzo delle sacche da dialisi, già note per essere state brillantemente impiegate nei test *in situ* con il fitoplancton (Darlsgaard, 2006), seppur costoso e con dispendio di tempo maggiore rispetto all'esecuzione di altre metodiche (ad es. saggio su elutriato), ha permesso di superare alcuni dei principali problemi, presentati in letteratura relativamente ai saggi algali su sedimenti, quali lo shadowing o l'oggettiva difficoltà di recupero degli organismi frammisti a particelle di sedimento (Moreno Garrido, 2003; Adam e Stauber, 2004, Araujo *et al.* 2008, 2010).

La presenza di questo setto semiselettivo, in grado cioè di consentire gli scambi chimici tra acqua e sedimento, impedendo nel contempo la commistione tra cellule algali e granuli, ha permesso di ridurre significativamente la variabilità tra repliche, agevolare le operazioni di prelievo per i conteggi finali senza alterare il rapporto tra matrice-specie target.

Questa, come le altre metodiche presentate sui saggi algali su sedimento, sarà certamente migliorabile e migliorata con il proseguire delle esperienze e delle analisi su matrici solide di diversa natura granulometrica, ed, auspicabilmente, anche questa, come le altre, concorrerà a fornire un contributo alla corretta valutazione dello stato dei nostri mari e dei nostri fondali ed alla loro tutela.

5 Bibliografia

- Adam MS., Stauber JL. 2004. Development of a whole sediment toxicity test using a benthic marine microalga. *Environmental toxicology and Chemistry*, vol. 23 (8): 1957-1968.
- Ankley G.T., Schubauer-Berigan M.K. Dierkes J.R. 1991. Predicting the toxicity of bulk sediments to aquatic organisms with aqueous test fractions: pore water vs. Elutriate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10: 1359-1369.
- Araujo CVM., Diz FR, Tornero V, Lubian LM, Blasco J, Moreno Garrido. Ranking sediment samples from three spanish estuaries in relation to its toxicity for two benthic species: the microalga *Cylindrotheca closterium* and the copepod *Tisbe battagliai*. *Environm Toxicol Chem* 2010a; 29: 393-400.
- Araujo CVM, Tornero V, Lubian LM, Blasco J, van Bergeijk SA, Canavate P, et al. Ring test for whole sediment toxicity assay with a benthic marine diatom. *Sci total environm* 2010b: 408: 822-8.
- APAT-ICRAM (2007) “Manuale per la movimentazione di sedimenti marini”,
- Arensberg P., Hemmingsen VH, Nyholm N. A miniscale algal toxicity test. *Chemosphere* 1995; 30: 2103-15.
- ARPAT, 1998, Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico, ARPAT- CEDIF, Serie Ricerche e Formazione, Quaderno n, 8, Firenze, 191 pp,
- ARPAT (Draft), 2003 - Prova di tossicità con *Dunaliella tertiolecta*. Metodo in fase di revisione a cura della Commissione UNICHIM “Qualità dell’Acqua”, sottogruppo “Acque salate/salmastre e sedimenti” del GdL “metodi biologici”, 10 pp.
- ASTM. 1991. Guide for collection, storage, characterisation and manipulation of sediment for toxicological testing. A. Burton jr (ed):1-15.
- Baudo R., Beltrami M., Rossi D. 1999. Insitu tests to assess the potential toxicity of aquatic sediments. *Aquatic Ecosystem health and Management*, 2: 361-365.
- BLANCHARD GF, PATERSON DM, STAL LJ, RICHARD P, GALOIS R, HUET V. The effect of geomorphological structures on potential biostabilisation by microphytobenthos on intertidal mudflats. *Cont Shelf Res* 2000; 20: 1243-56.

BONIN D., DROOP M.R., MAESTRINI S.Y., BONIN M.C. 1986 Physiological features of six micro-algae to be used as indicators of seawater quality. *Cryptogamie, Algologie* 7(1):23-83.

Brady, J. T. (1996). Beneficial Use of Dredged Material from the Delaware River Main Channel Deepening Project to Create, Restore, and Protect Wetlands in the Delaware Bay. Philadelphia, Pennsylvania.

Brown, S. L., Warman, E. A, McGrorty, S., Yates, M., Pakeman, R. J., Boorman, L. A., Goss-Custard, J. D. and Gray, A. J. (1998). Sediment Fluxes in Inter-tidal Biotopes : BIOTA II. Marine Pollution Bulletin. Vol. 37. Nos. 3-7. 173-181. Elsevier Science Ltd.

Boni L., Ceredi A., Guerrini F., Milandri A., Pistocchi R., Poletti R., Pompei M., (2001), Toxic *Protoceratium reticulatum* (Peridiniales, Dinophyta) in the North-Western Adriatic Sea (Italy) in: Harmful Algal Blooms 2000. Hallegraeff G.M., Blackburn S.I., Bloch C.J., Lewis R.J. (eds.), Intergov. Oceangr. Comm., Paris., p.137-40

Cairns Jr J. Pratt Jr. The scientific basis of bioassays. *Hydrobiologia* 1989; 188/189: 5-20.

Cairns Jr J. Pratt Jr. Trends in ecotoxicology. *Sci total Environm* 1993; supplement 1:7-22.

Calow P. The choice and implemetation of environmental bioassays. *Hydrobiologia* 1989, 188/189:61-4.

Casado Martinez MC, Buceta JL, Forja JM, Del Valls TA, Ejercicio interlaboratorio de bioensayos marinos para la evaluacion de la calidad ambiental de sedimentos costeros. *Cien Mar* 2006a; 32: 121-8.

Chapman PM, Wang F. Assessing sediment contamination in estuaries. *Environmental Toxicol. Chem.* 2001; 20: 3-22.

Chapman PM. Integratin toxicology and ecology: putting the eco into ecotoxicology. *Mar Pollut Bull* 2002; 44: 7-15.

Chiaudani G., Gerletti M., Marchetti R., Provini A., Vighi M. 1978. Il problema dell'eutrofizzazione in Italia. *IRSA Quaderni* 42, pp 93.

Cicero A.M., Guerrera E., 2001. Saggi eco tossicologici in acqua di mare: quadro di confronto della normativa internazionale. *Biologia Marina Mediterranea* 8 (2):17-23.

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., MagnoS., Tartaglione L., Cangini M., Pompei M., Guerrini F., Boni L., Pistocchi R., (2006), Toxin profile of *Alexandrium*

ostenfeldii (Dinophyceae) from the Northern Adriatic Sea revealed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 47:597-604.

Dajoz R. 1993. Manuale di ecologia. ISEDI (ed), pp 447.

Del Valls TA, Andres A, Belzunce MJ, Buceta JL, Casado- Martinez MC, Castro R. Chemical and ecotoxicological guidelines for managing disposal of dredged material. *Trends Anal Chem* 2004, 23: 819:28.

De Bower JFC, de Deckere EMGT, Stal LJ. 2003. Distribution of extracellular carbohydrates in three intertidal mudflats in Western Europe. *Estuar Coastal shelf*, 56: 313-324.

De Jonge, Coljiin F. 1994. Dynamic of mycrophytobenthos biomass in the EMS estuary. *Marine Ecology Progress in Series*, 104: 158-96.

Environment Canada, 1992, Biological test method: growth inhibition test using the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*, Environmental Protection Conservation and Protection Environment Canada, Report EPS 1/RM/25, 64 pp.

Focardi S., Leonzio C. i bionindicatori nel monitoraggio costiero. 2001. *Biologia Marina Mediterranea*, 8 (2): 136-145.

FOWLER/COHEN 1993. Statistica per ornitologi e naturalisti. Ed. Franco Muzzio, 240pp.

GIESY J.P., HOKER R.A., 1989. Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection. *J. Great Lakes Res.*, 15: 539-569.

GLASS C., SILVERSTEIN J. (1998). Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water research* vol.32 n.3:831-839.

Frignani M., Turci C. 1981. Il ruolo dei sedimenti nei fenomeni di eutrofizzazione costiera. *CNR AQ/2/12* pp.101.

Guerrini F., Cangini M., Boni L., Trost P., Pistocchi R., (2000), Metabolic responses of the diatom *Achnanthes brevipes* (bacillariophyceae) to nutrient limitation, *J. Phycol.* 36,882-890.

Harkey G.A., Landrum P.F., Klaine S.J. 1994. Comparison of whole sediment, elutriate, porewater exposures for use in assessing sediment associated organic contaminants in bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 (8): 1315-1329.

Hall L.W., Gidding J.M, 2000. The need of multiple lines of evidence for predicting site-specific ecological effects. *Human Ecological Risk Assessment*, 6 (4): 679-710.

Hogan AC., Stauber JL., Pablo F., Adams MS., Lim RP. 2005. The development of marine toxicity identification evaluation (TIE) procedures using the unicellular *Nitzschia closterium*. Arch Environm Contam Toxicol 48: 433-43.

IRSA-CNR, APAT 2003 – Metodi analitici per le acque 29/2003. Metodi ecotossicologici Volume III.

ISO, 2006. Water quality – Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*. Reference number: ISO10253: 1995 (E), 8 pp.

LAMBERTSON J.O., DE WITT T.H., SWARTZ R.C., 1992. Assessment of sediment toxicity to marine benthos. In: Burton G.A. Jr (ed), Sediment Toxicity Assessment Lewis Publ., 183-211.

Lambolez I., Vasseur P., Ferardi JF., Gisbert T. 1994. The environmental risks of industrial waste disposal: an experimental approach including acute and chronic toxicity studies. Ecotox environm Safety 28: 317-28.

Lib W., Ahlf W. 1997: evidence for whole sediment, porewater and elutriate testing in toxicity assessment of contaminated sediments. Ecotoxicology and Environmental Safety, 36:140-147.

MacIntyre H.L., Kana T.M., Anning T., Geider R.. Photoacclimation of Photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria, J. Phycol 38, 17-38(2002).

MINISTERO DELL'AMBIENTE – Servizio Difesa Mare e ICRAM, 2000. “Qualità degli ambienti marini costieri italiani 1996 – 1999”. 272 pp. Roma.

Miller DC., Geider RJ., Mac Intyre HL. 1996. Microphytobenthos: the ecological role of the “seagrass garden” of unvegetated, shallow waters marine habitats. Estuaries, 19 (2A): 202-212.

MORENO Garrido I, Hampel M, Lubian LM, Blasco J. Sediment toxicity test using benthic marine microalgae *Cylindrotheca closterium*. Ecotoxicol Environ Saf 2003 a; 54: 290-5.

MORENO Garrido I, Hampel M, Lubian LM, Blasco J. Marine benthic microalgae *Cylindrotheca closterium* as a tool for measuring toxicity of linear alkylbenzene sulfonate in sediments. Bull Environm Contam Toxicol 2003b; 70: 242-7.

Moreno Garrido I, Lubian LM, Jimenez B, Soares AMVM, Blasco J. Estuarine sediments toxicity test on diatoms: sensitivity and comparison for three species. Estuar Coastal Shelf Sci 2007; 71: 278-86.

- NYHOLM N., KALLQVIST (1989). Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol.8 689-703.
- OECD. 1984. Alga, growth inhibition test. OECD guidelines for testing of chemicals. N. 201.pp 14.
- ONORATI F., 1998. Criteri di valutazione per i sedimenti da movimentare: valori naturali e saggi biologici. In atti della giornata di studio *Dragaggi portuali: qualità e gestione dei materiali*. Roma, 18 febbraio 1998.
- PARNELL P.E., 2003. The effects of sewage discharge on water quality and phytoplankton of Hawai'ian coastal waters. *Marine Environmental Research* 55:293-311.
- PELLEGRINI D., AUSILI A., ONORATI F., CIUFFA G., GABELLINI M., BIGONGIARI N. DE RANIERI S. 1999. Characterization of harbour and coastal sediments: specific destinations of dredged material. *Aquatic ecosystem health & management* 2 (4): 455 - 464.
- Pistocchi R., Cangini M., Totti C., Urbani R., Guerrini F., Romagnoli T., Sist P., Palamidesi S., Boni L., Pompei M., (2005), Relevance of the Dinoflagellate *Gonyaulax fragilis* in mucilage formations of the Adriatic Sea. *Sci Tot Env* 307-316.
- POSTMA J.F., DE VALK S., DUBBELDARN M., MAAS J.L., TONKES M., SCHIPPER C.A., KATER B.J., 2002. Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicology and environmental safety* 53:226-237.
- RANDALL C., BARNARD J., STENSEL H. (1992). Design and retrofit of wastewater treatment plants for biological nutrient removal. Technomic pub.
- Sarni A., Onorati F., 2009. Controls variability in algal growth inhibition test on *Dunaliella tertiolecta* as possible scale threshold. *Biologia Marina Mediterranea Special Issue* vol.14 (1).
- Sassoon Brickson G., Burton G.A. 1991. In situ and laboratory sediment toxicity testing with *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 10, 201 pp.
- Sbrilli G. et al. (2003): "Effects of Nutrients and Salinity on the Algal Assay Using *P. subcapitata* (Korshikov) Hindak", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 71, 609-616.
- Sbrilli G., Limberti A., Caldini G., Corsini A. 1998. Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico. ARPAT - CEDIF , Serie Ricerche e Formazione, Quaderno n. 8 Firenze: 191 pp.

SIMPSON SL, MICEVSKA T, ADAMS MS, STONE A, MAHER WA. Establishing cause-effects relationship in hydrocarbon contaminated sediments using a sublethal response of the benthic marine alga *Entomoneis Punctulata*. Environ Toxicol Chem 2007; 26: 163-70.

STIMSON J., S.T. LARNED, 2000. Nitrogen efflux from the sediment of a subtropical bay and the potential contribution to macroalgal nutrient requirements. Journal of experimental marine biology and ecology 252: 159-180.

UNITED STATES OF AMERICA CORPS OF ENGINEERS (USACE). 1991. Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal. Testing manuals USEPA 503-8-90/02: 219 pp.

US-EPA. Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to marine and estuarine organisms. EPA/600/4-887/028.

Volpi Ghirardini A, Pellegrini D. 2001. I saggi di tossicità nella valutazione della qualità di acque e sedimenti di ambienti marini e di transizione: indicazioni per la scelta, la messa a punto, la valutazione e l'utilizzo dei metodi. Biologia Marina Mediterranea, 8(2): 1-16.

WALSH G.E. 1988 "Principles of toxicity testing with marine unicellular algae". Environmental Toxicology and Chemistry 7: 979-987.

Van Dam RA, Harford AJ, Houston MA, Hogan, Negri Ap. 2008. Tropical marine toxicity testing in Australia. Australian Journal of Ecotoxicology, 14: 55-88.