

D.L. 152/99 ed ecotossicologia delle acque

Renato Baudo, CNR Istituto per lo Studio degli Ecosistemi

Introduzione

La risorsa acqua per definizione viene considerata una fonte “rinnovabile” in quanto la quantità teoricamente disponibile dipende essenzialmente dagli apporti meteorici.

Il bilancio idrico globale annuo del territorio italiano (ISTAT, 1984) indica un afflusso meteorico di 296 miliardi di m³ di acqua, una perdita del 43 % per evapotraspirazione (129 miliardi di m³) ed una “risorsa idrica superficiale” pari a 167 miliardi di m³, suddivisa in 155 miliardi di m³ di acque superficiali e 12 miliardi di m³ di acque sotterranee. Teoricamente, sarebbe quindi a disposizione un volume di circa 2700 m³ *pro capite* di acqua per i vari usi.

La *quantità* d’acqua a disposizione sarebbe dunque ampiamente sufficiente a coprire l’intero fabbisogno idropotabile, assumendo però che la sua *qualità* sia adeguata al suo utilizzo per le diverse attività umane.

Ma non è sempre così: ancora prima della nascita del metodo scientifico, l’uomo ha ben presto imparato a stabilire empiricamente quando l’acqua da utilizzare per scopi vari aveva particolari caratteristiche, positive (acque medicamentose) o negative (“acqua cattiva” per l’agricoltura o per l’alimentazione umana ed animale). E, a prescindere da pochi casi di acque fortemente mineralizzate per cause naturali, si è scoperto che solitamente era proprio la presenza stessa di insediamenti abitativi a determinare uno scadimento qualitativo delle acque.

Un esame della bibliografia (Adriaanse *et al.*, 1995; Fig. 1) dimostra facilmente che l’interesse per l’inquinamento delle acque è andato crescendo con l’avvento dell’industrializzazione, ma anche che nel tempo sono stati presi in considerazione via via gruppi diversi di potenziali contaminanti.

All’inizio di questo secolo, le indagini limnologiche precisano che la presenza di elevate quantità di metalli nelle acque può pregiudicarne la qualità al punto da renderle inadatte o sconsigliabili, almeno per alcuni usi (consumo umano, irrigazione, allevamento di animali, piscicoltura, usi industriali, balneazione).

In seguito sono stati rilevati casi di inquinamento dovuti anche a numerosi altri gruppi di contaminanti.

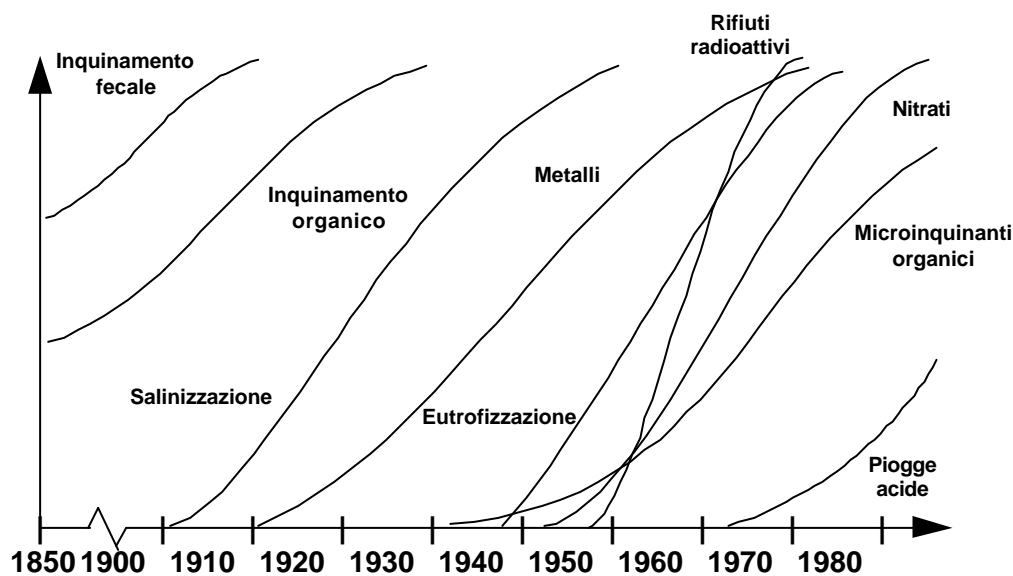


Fig. 1 - Evoluzione dell’interesse per i diversi tipi di contaminanti delle acque (tratta da Adriaanse *et al.*, 1995, modificata)

Ad esempio, considerando le informazioni disponibili per le acque potabili, secondo Marcomini *et al.* (1995) i parametri critici, che più facilmente superano le concentrazioni massime ammissibili, sono:

- pesticidi (acque sotterranee in Piemonte, Lombardia, Friuli Venezia Giulia, Marche; fiumi in Emilia Romagna e Toscana);
- composti organo clorurati alifatici (tetracloroetilene, tricloroetilene, 1,1,1,-tricloroetano: Lombardia, Veneto, Piemonte);
- nitrati (attività agricole e/o carenze nelle infrastrutture fognarie: Campania, Emilia Romagna, Marche, Piemonte, Veneto);
- manganese (origine naturale: Piemonte, Lombardia, Emilia Romagna, Campania);
- parametri batteriologici (sorgenti, falde, fiumi);
- metalli pesanti (corrosione delle tubazioni);
- alluminio (utilizzato come coagulante).

In effetti, la “pagella” compilata dal l’Istituto Superiore di Sanità nel 1995 attribuisce i seguenti voti alla qualità dell’acqua potabile nelle diverse Regioni:

- Valle d’Aosta = 8;
- Piemonte = 4 (metalli pesanti, composti organo-alogenati e antiparassitari a Torino, Alessandria, Cuneo e Vercelli; ammoniaca, ferro e manganese ad Asti e Novara);
- Lombardia = 4 (antiparassitari, composti organo-alogenati e nitrati in molte falde, ad eccezione di Sondrio);
- Trentino Alto Adige = 6 (fluoro naturale);
- Veneto = 4 (ferro, solfati, manganese, nitrati);
- Friuli Venezia Giulia = 5 (ammoniaca e ferro);
- Liguria = 8 (infiltrazione acqua marina in pozzi della provincia di Imperia);
- Emilia Romagna = 7 (nitrati e metalli pesanti);
- Toscana = 7 (acqua marina nelle falde, cadmio e cromo a Firenze e Pisa);
- Umbria = 8 (ferro, manganese, ammoniaca e nitrati a volte vicino ai limiti);
- Marche = 5 (nitrati e cloruri nella fascia costiera, fenoli, tensioattivi e idrocarburi a Macerata, composti organo-alogenati ad Ancona);
- Lazio = 9 (infiltrazioni acqua marina);
- Abruzzo = 9 (contaminazioni batteriche);
- Campania = 5 (inquinanti di sintesi, fluoro);
- Puglia = 8 (infiltrazioni acqua marina);
- Basilicata = 9;
- Calabria = 7 (eccessiva clorazione);
- Sicilia = 5 (contaminazioni batteriche);
- Sardegna = 5 (richiesti molti trattamenti).

Fin dagli anni ’70, è però apparso evidente che la verifica della contaminazione ambientale basata unicamente su una contabilità chimica non offriva sufficienti garanzie di protezione degli ecosistemi acquatici. È stato infatti osservato che:

- ✓ numerosi tossici vengono normalmente riscontrati solo a livello di tracce nelle acque (problema di sensibilità analitica);
- ✓ in qualsiasi corpo idrico le caratteristiche chimiche delle acque sono estremamente variabili e dinamiche (problema di rappresentatività spazio – temporale del campionamento);
- ✓ in genere è possibile effettuare le determinazioni quantitative solo per circa 30-40 sostanze, mentre sono più di 100.000 i prodotti chimici che potrebbero essere presenti nell’ambiente (problema di significatività della valutazione complessiva);

- ✓ nessuna metodologia chimica è in grado di stabilire con sicurezza qual è, sul totale presente, la frazione realmente biodisponibile e quindi in grado di interagire con il biota (problema di identificazione delle relazioni causa – effetto).

Per ovviare a questi inconvenienti e pervenire ad una rappresentazione più realistica, è stato allora suggerito di ricorrere agli strumenti della Ecotossicologia. Gli approcci possibili sono sostanzialmente due: la *stima della tossicità* di campioni opportunamente raccolti negli ambienti allo studio, oppure il *biomonitoraggio* diretto degli eventuali effetti indesiderati che sono avvenuti o avvengono nell'ambiente a causa dell'immissione di una singola sostanza o di una miscela di sostanze, almeno in parte potenzialmente tossiche, tenendo conto delle interazioni fisiche, chimiche e biologiche con le diverse componenti, biotiche ed abiotiche, dell'ambiente stesso.

Stima sperimentale della tossicità

Le prove sperimentali possono essere basate sulla stima della tossicità (ECETOC, 1993):

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

I test di tossicità acuta prevedono la misura di una risposta individuale (mortalità, metabolismo: germinazione, produzione primaria, produzione secondaria, uptake, escrezione, ...).

Una tossicità subletale misura la risposta dell'intero organismo (crescita, comportamento, patologia, ...), oppure una risposta interna (biochimica, istologia, fisiologia, ...).

La tossicità cronica prende in considerazione la risposta di popolazioni (parametri demografici), di comunità (interazioni tra specie), o dell'intero ecosistema ((interazioni totali).

In tutti i casi, la tossicità osservata solitamente è funzione di specie, età, sesso, alimentazione, condizioni dell'organismo, caratteristiche fisico-chimiche del mezzo.

Per l'esecuzione dei test, è possibile operare in laboratorio, cioè in condizioni controllate dall'operatore, utilizzando una singola specie o più specie diverse, in esperimenti indipendenti.

L'esposizione può essere statica (il mezzo contenente la sostanza viene preparato all'inizio dell'esperimento e non più modificato fino al termine dell'esperimento stesso), semi-statica (il mezzo viene periodicamente rinnovato), continua (il mezzo viene rinnovato di continuo).

Particolarmente critica è la scelta della (o delle) specie, che può essere effettuata sulla base di differenti criteri:

- tra specie indigene dell'ambiente da proteggere, in funzione di rilevanza ecologica (specie chiave nella catena alimentare), importanza economica, facilità di uso (disponibile e/o allevabile);
- tra specie particolari, in funzione della sensibilità ai tossici, della disponibilità di laboratorio, della standardizzazione delle metodologie.

Questi test permettono di determinare una relazione causa – effetto, ma non sono in genere sufficientemente realistici, in quanto i risultati ottenuti sono validi solo per le condizioni sperimentali utilizzate e non consentono di estendere le conclusioni ad altre specie o a sistemi naturali complessi (in quanto non possono tener conto delle interazioni complesse tra biota e ambiente).

Pertanto, una approfondita rassegna della bibliografia in materia (si veda ad esempio Jørgensen *et al.*, 1991; ECETOC, 1993) vede l'uso di numerosissimi organismi diversi (alghe, batteri, vegetali,

invertebrati, vertebrati) ed evidenza come, per diverse sostanze, ciascuno presenta una diversa sensibilità.

Non stupisce quindi che l'unico consenso finora raggiunto sia che ... non esiste una singola specie adatta a descrivere gli effetti di tutti i possibili tossici ed è quindi necessario utilizzare in ogni caso *una batteria* di test, che utilizzi almeno un batterio, un'alga ed un invertebrato.

L'uso di vertebrati, pur se auspicabile, in genere comporta notevoli complicazioni sperimentali, per le difficoltà di reperimento e mantenimento di soggetti adeguati ed i tempi più lunghi, in particolare nello studio di tossicità sub-letale e cronica: la vita di un vertebrato è infatti solitamente superiore di uno o più ordini di grandezza, rispetto ad alghe o invertebrati.

Tuttavia, anche l'uso di batterie di test non consente di verificare gli effetti sugli organismi in presenza di interazioni interspecifiche (un erbivoro od un predatore possono ad esempio essere danneggiati semplicemente perché il suo cibo risulta alterato, qualitativamente o quantitativamente, dall'esposizione ad un tossico).

Si possono allora effettuare degli esperimenti più complessi, con esposizione contemporanea multispecie (più specie che convivono nello stesso sistema sperimentale, ad esempio microcosmi o canali artificiali; Gillett, 1989; Gearing, 1989).

Anche in questo caso però non è possibile cogliere appieno gli effetti delle interazioni interspecifiche possibili (infatti, possono essere valutate solo quelle tra le specie prescelte per l'esperimento, ma non quelle con altre specie, non testate, che negli ambienti naturali comunque coesistono)

L'alternativa consiste nel realizzare l'esposizione sul campo, utilizzando apposite enclosure (cioè delimitando fisicamente una parte dell'ecosistema, comprendente la comunità naturale del sito) e operando gli esperimenti in questi mesocosmi, nei quali le condizioni sono ancora parzialmente controllabili dallo sperimentatore.

Il caso più complesso è quello in cui i test vengono effettivamente condotti nell'ambiente allo studio, riducendo al minimo le manipolazioni (test *in situ*) e nei quali le condizioni rispecchiano quindi esattamente lo stato dell'ambiente.

Questo tipo di studi è quindi intermedio tra gli studi di laboratorio e l'esame estensivo dell'ambiente, realizzabile tramite il cosiddetto biomonitoraggio (vedere oltre).

In ognuno dei test di tossicità sperimentale è infine possibile (e, spesso, desiderabile) rilevare diversi **end point** (parametri che esprimono l'intensità dell'effetto), dai più immediati (mortalità), ai più informativi, in termini di spiegazione del meccanismo di azione del tossico.

Sostanzialmente, poiché ognuno degli approcci qui sinteticamente riassunti presenta vantaggi e svantaggi (Moriarty, 1983; Levin *et al.*, 1989), la scelta può essere diversa caso per caso, in quanto dipende essenzialmente dagli obiettivi dello studio.

Va comunque sottolineato che gli studi più veloci ed aventi come oggetto i livelli inferiori di organizzazione biologica dimostrano di essere in genere più sensibili, con buone possibilità di identificare le relazioni di causa ed effetto. Tuttavia, proprio perché tendono a semplificare la realtà per renderla interpretabile, sono difficilmente estrapolabili e, complessivamente, hanno una modesta rilevanza ecologica.

Al contrario, le indagini ai più elevati livelli di organizzazione sono effettivamente più rilevanti in termini ecosistemici, ma solitamente sono meno sensibili, estremamente laboriosi, lunghi e complicati anche da interpretare (Burton, 1991; Fig. 2).

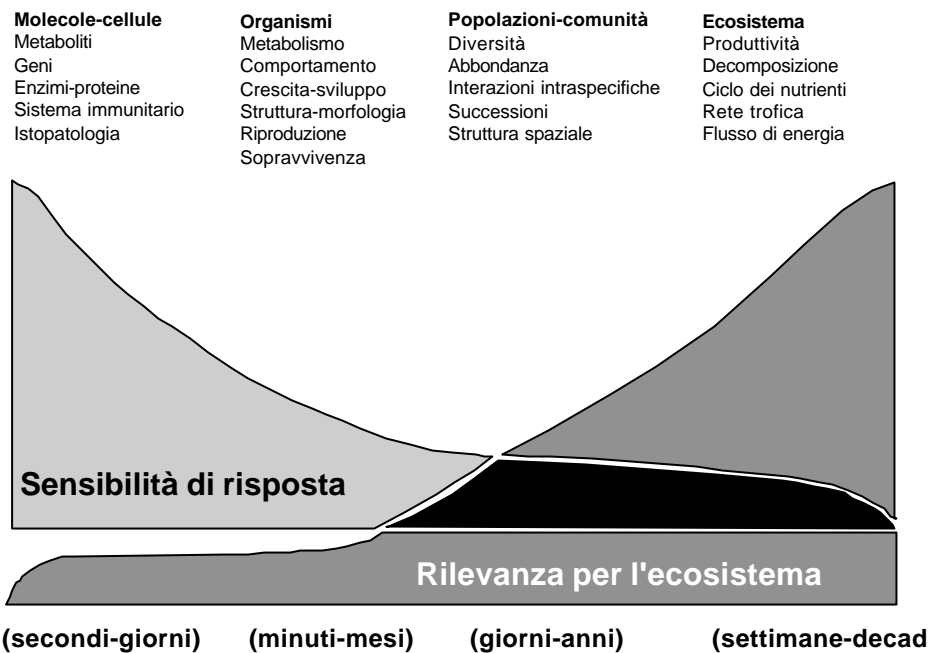


Fig. 2 - Sensibilità e rilevanza dei test ai diversi livelli di organizzazione biologica (Burton, 1991).

Biomonitoraggio

Uno dei metodi utilizzati per verificare se un certo ecosistema è affetto da una contaminazione tale da determinare effetti rilevanti a carico di una o più delle sue componenti è quello del biomonitoraggio biologico (AAVV, 1979; Moriarty, 1983; Herricks *et al.*, 1989; Clements, 1991; Loeb e Spacie, 1994; Munawar *et al.*, 1995; Bargagli, 1998). Questo termine è stato variamente utilizzato, ma sostanzialmente ha tre significati distinti:

- 1) Studio della biologia di organismi esposti, per rilevare effetti avversi che possono indicare esposizione a livelli tossici di sostanze nell'ambiente
- 2) Confronto dei livelli misurati in fluidi o appropriati tessuti con valori limite di riferimento da non superare per evitare effetti avversi
- 3) Misura di parametri biologici (biomarkers) che presentano una relazione con l'esposizione a sostanze tossiche

Nel primo caso (Ford, 1989; Levine, 1989; Weinstein e Birk, 1989; Coler e Rockwood, 1989; Ghetti, 1997), è necessario rilevare:

Numero di specie, abbondanza relativa, specie indicatrici (indici di ricchezza, diversità specifica, somiglianza, indici biotici)

Epidemiologia (patologie, parassitosi, malformazioni, forme tumorali, ...)

Comportamento (reazioni di fuga, abitudini sessuali, ...; Henry e Atchinson, 1991)

Un ovvio limite di questo approccio risiede nella necessità di confrontare le osservazioni per l'ecosistema con le stesse osservazioni in condizioni "normali", non perturbate, al fine di stabilire se e quanto siano stati indotti effetti avversi.

Nasce quindi la necessità di definire prima dei parametri di riferimento, poi di stabilire l'entità della differenza che configura un reale effetto avverso: in un determinato ambiente si può ad esempio rilevare una riduzione del numero di specie, rispetto ad un ambiente di riferimento (lo stesso ambiente prima della contaminazione, se esistono dati storici; oppure un ambiente con caratteristiche ecologiche molto simili, ma non interessato da un inquinamento). Ma è ancora

necessario stabilire se tale riduzione è ecologicamente rilevante. Infatti, l'ecosistema potrebbe spontaneamente ricostituire le condizioni originarie, superando quindi il periodo di condizioni avverse, magari attraverso una ricolonizzazione. Oppure, pur con un significativo cambiamento a livello di comunità, può comunque trovare un nuovo equilibrio. In questi casi, spesso la valutazione del danno viene operata da un punto di vista antropocentrico (lesione di interessi economici dell'uomo), piuttosto che dal punto di vista ecocentrico.

Allo stesso modo, sono solitamente difficilmente interpretabili le osservazioni su scomparsa di specie sensibili: gli apicoltori ad esempio possono osservare un aumento della mortalità nelle api, fenomeno che suggerisce la possibile contaminazione da pesticidi, ma tale osservazione da sola non è sufficiente a stabilire una relazione di causa – effetto.

Il secondo tipo di biomonitoraggio prevede in particolare di quantizzare, almeno nelle componenti biotiche più significative:

Bioconcentrazione (raggiungimento, in un organismo, di concentrazioni di una sostanza superiori che nel mezzo in cui vivono)

Bioaccumulo (raggiungimento, in un organismo, di concentrazioni di una sostanza superiori che nel mezzo in cui vivono tramite assunzione dal mezzo in cui vivono e dalla dieta)

Biomagnificazione (raggiungimento, in un organismo, di concentrazioni di una sostanza superiori che negli organismi che lo precedono nella catena alimentare)

Esempi di studi di bioconcentrazione sono quelli in cui vengono misurate le concentrazioni di inquinanti (metalli, biossido di solfo, ...) in vegetali bioindicatori, quali muschi e licheni (Bargagli, 1998): si assume cioè che la quantità di inquinanti incorporati sia funzione dell'esposizione.

Allo stesso modo, si possono utilizzare organismi animali diversi per tener conto dell'assunzione contemporanea da mezzo ambiente e cibo (bioaccumulo di metalli in molluschi, di Hg in lucci, DDT in uccelli piscivori, ...; Beeby, 1991; Newman e Heagler, 1991; Matis *et al.*, 1991).

Se questi studi prendono in considerazione più livelli trofici, è infine possibile quantizzare anche la biomagnificazione.

Va però ricordato che il bioaccumulo, di per sé, non costituisce un effetto avverso. In questo tipo di studi viene comunque utilizzato come indice di un possibile impatto e, in particolare, trova larga applicazione nella modellistica e nel calcolo di un indice di rischio (ECETOC, 1995; Vighi e Calamari, 1996).

Il terzo caso di biomonitoraggio prevede il rilevamento sistematico di particolari indicatori biochimici (biomarker), che evidenziano alterazioni di particolari percorsi metabolici (Foulkes, 1982; Klaverkamp *et al.*, 1991; Malins e Ostrander, 1994; Munawar *et al.*, 1995; Fossi: 2000):

Indicatori biochimici specifici (induzione citocromo P450 monoossigenasi = esposizione a inquinanti organici; inibizione della deidrasi dell'acido delta-aminolevulinico di eritrociti = esposizione al Pb; sintesi metallotioneine in fegato/reni = esposizione a metalli; perossidazione dei lipidi = azione di specie reattive dell'ossigeno su acidi grassi poliinsaturi nelle membrane cellulari)

Indicatori biochimici non specifici (risposte endocrine = alterazione del rilascio di catecolamine e ormoni corticosteroidi; risposte riproduttive = alterazione degli ormoni steroidi riproduttivi)

Risposte molecolari (espressione dei geni, formazione di addotti DNA, rottura di filamenti DNA = composti carcinogeni e genotossici)

In generale, il biomonitoraggio permette dunque di verificare se, in un dato ecosistema, sono stati indotti effetti avversi. Tuttavia, solitamente questa verifica non è sufficiente ad identificare la causa

che ha determinato tali effetti. È quindi necessario procedere ad una lunga e laboriosa analisi chimica delle varie componenti, finalizzata ad individuare, tra i diversi inquinanti che si ipotizza possano essere presenti, quale o quali possano essere responsabili dell'alterazione.

Spesso, vengono così determinati numerosi composti organici ed inorganici e si cerca di stabilire una relazione di causa – effetto attraverso una analisi statistica multivariata. Tuttavia, anche nel caso in cui venga effettivamente riscontrata una correlazione statisticamente significativa tra livello di inquinanti ed effetto osservato, questa non costituisce una prova, ma semplicemente suggerisce una ipotesi da verificare (è sempre possibile che la relazione osservata sia casuale, oppure dipendente da un fattore non riconosciuto che influenza contemporaneamente la distribuzione dell'inquinante e dell'effetto osservato).

Inoltre, tenendo conto che l'effetto in natura può essere dovuto non solo ai prodotti chimici che si ritiene siano stati immessi nell'ambiente, ma anche ai loro eventuali prodotti di trasformazione, è possibile che l'analisi chimica non prenda in considerazione i reali agenti causali.

Per ovviare a questo inconveniente, è stato suggerito di utilizzare una procedura di Identificazione della causa della tossicità (USEPA, 1991; Durhan *et al.*, 1993; Mount *et al.*, 1993), basata su tre diverse tappe:

1. dopo aver determinata la presenza di tossicità in un campione, questo viene opportunamente manipolato per rimuovere alcune categorie di inquinanti. Ripetendo quindi il test di tossicità, il campione nel quale tale tossicità non si manifesta più indica il possibile tipo di agente causale (fase di caratterizzazione);
2. l'analisi chimica mirata alla categoria di inquinanti rimossi consente poi di restringere il campo ad una serie di composti (fase di identificazione);
3. a questo punto, al campione originale vengono aggiunte dosi crescenti del o dei composti identificati e i test di tossicità, ripetuti su questi campioni, dovrebbero indicare una relazione proporzionale di causa – effetto (fase di verifica).

Naturalmente, anche così non è semplice raggiungere una conclusione definitiva, perché spesso la tossicità osservata è una funzione complessa di più agenti causali, e non di uno solo.

Indagini sui sedimenti

La valutazione della potenziale contaminazione degli ambienti acquatici ha subito in tempi recenti una radicale trasformazione; infatti, i primi studi di ecotossicologia acquatica ponevano l'attenzione sulla qualità delle acque, tradizionali recettori di reflui urbani ed industriali, piuttosto che sui sedimenti, all'epoca ritenuti (a torto o a ragione) “ragionevolmente” puliti. Oggi, al contrario, grazie ad un maggior controllo ed a una efficace azione di prevenzione dell'inquinamento delle acque, il caso più comune è quello di un corpo idrico dalle acque quasi incontaminate, ma a contatto con depositi di fondo che, dopo lunghi periodi di inquinamento, hanno accumulato rilevanti quantità di svariati tossici. Sono proprio questi sedimenti a rappresentare ora il maggior rischio per l'ambiente (Burgess e Scott, 1992).

I sedimenti acquatici tendono ad essere contaminati da inquinanti inorganici ed organici perché questi, una volta adsorbiti od incorporati nel materiale particellato sospeso (biotico e/o abiotico), ne seguono il destino e vengono trasferiti per sedimentazione sul fondo, dove si stabilisce un equilibrio solido/liquido che, generalmente, comporta un arricchimento in elementi e composti tossici nell'acqua interstiziale (Knight, 1984; Cairns *et al.*, 1984; Salomons *et al.*, 1987; Tessier e Campbell, 1987; Chapman, 1987).

In tal modo, la contaminazione può interessare direttamente gli organismi bentonici (Ciborowski e Corkum, 1988; Giesy *et al.*, 1988a; Schloesser, 1988; Giesy e Hoke, 1989; 1990) o indirettamente altri organismi attraverso la catena alimentare o per fenomeni di risospensione e rilascio che

rendono di nuovo biodisponibili gli inquinanti (Lee et al., 1978; Jones e Lee, 1978; Malueg *et al.*, 1983; Nebeker et al., 1983).

Inoltre, come sottolineano Power e Chapman (1992), numerosi tossici vengono normalmente riscontrati solo a livello di tracce nelle acque, mentre gli stessi elementi e composti tendono generalmente ad essere accumulati nei sedimenti anche in concentrazioni estremamente elevate. Infatti, i sedimenti tendono ad integrare nel tempo gli apporti di sostanze chimiche. Per questo, i sedimenti possono essere considerati sia come “deposito” che come “fonte” per tali inquinanti. Non a caso, un recente volume della Commissione Europea (Adriaanse *et al.*, 1995) indica che i sedimenti sono ormai il mezzo di elezione per lo studio dei fenomeni di contaminazione da parte di fosforo (elemento eutrofizzante), metalli, PAHs, VOX, HCB, PCBs, pesticidi organoclorurati, fenoli clorurati, olii, ecc.

Per lungo tempo l'approccio tradizionalmente seguito è stato quello della raccolta e successiva analisi chimica dei campioni di sedimento (Förstner, 1990); è però ora evidente come questo tipo di approccio soffra di un grave difetto: da solo, infatti, non consente di stabilire con sicurezza quali sono, o potrebbero essere, gli effetti a carico degli organismi esposti a sedimenti contaminati. Già Chapman e Long (1983) sottolineavano come, in assenza di verifiche sulla potenziale tossicità, i risultati ottenibili potevano essere fuorvianti. Infatti, questi Autori suggerivano una “triade di qualità dei sedimenti” che affiancava all'analisi chimica una misura della tossicità dei campioni (bioassay funzionali) e lo studio di composizione specifica e densità del biota residente (bioassay strutturale).

Purtroppo, mentre la bibliografia è ricca di esempi di accurate descrizioni della composizione chimica dei sedimenti di ambienti variamente contaminati, non sono invece altrettanto diffusi gli studi volti a descrivere i possibili effetti diretti della contaminazione dei sedimenti sulla flora e la fauna acquatica (Dickson e Rogers, 1985). In parte ciò è dovuto alla complessità dei fenomeni di interazione tra sedimenti ed acqua, o tra sedimenti e biota (Dickson *et al.*, 1987), che si riflette ad esempio in una vera o presunta mancanza di precisione dei test di tossicità con i sedimenti (McIntyre, 1984; Giesy e Allred, 1985).

Rispetto ai test di tossicità su campioni d'acqua, quelli sui sedimenti risultano obiettivamente più complicati perché i sedimenti stessi hanno una matrice eterogenea, comprendente 3 componenti principali:

- ✓ una fase liquida, l'acqua interstiziale, in una frazione variabile dal 20 - 30 % nei sedimenti profondi, che può arrivare al 90 % del volume del sedimento negli strati superficiali non consolidati;
- ✓ una fase solida inorganica, costituita da granuli minerali derivanti dall'erosione del bacino imbrifero e dalla precipitazione/coprecipitazione di sali;
- ✓ una fase solida organica, costituita da particellato organico autoctono ed alloctono.

Un eventuale inquinamento, direttamente su un corpo idrico, o indirettamente nel suo bacino imbrifero, comporta solitamente un arricchimento dei tossici nella frazione particellata inorganica e organica. In seguito, dopo la sedimentazione, ci può essere un arricchimento anche nell'acqua interstiziale, in funzione del pseudo-equilibrio dinamico tra fase liquida e fase solida dei sedimenti. In un test di tossicità, quindi, gli organismi risultano esposti a tossici in soluzione, tossici adsorbiti sulle particelle e tossici incorporati in tali particelle. L'esposizione può dunque avvenire per contatto (superfici corporee) o per ingestione. Ciò significa che anche il percorso metabolico di un inquinante, ed il suo effetto, può essere variabile, a parità di concentrazione nel sedimento tal quale di origine, in funzione della ripartizione di tale inquinante nelle diverse fasi del sedimento.

Si può a questo proposito ricordare che negli ambienti acquatici è virtualmente possibile ritrovare letteralmente migliaia di composti chimici potenzialmente tossici (Giesy e Hoke, 1990) e che, generalmente, gli effetti prodotti dipendono dalla effettiva biodisponibilità dei tossici (Babich e Stotsky, 1977; Ward e Young, 1984; Oliver, 1985; Tessier e Campbell, 1987) e da fenomeni sinergici, antagonisti, ecc., che coinvolgono l'intera gamma degli elementi e composti presenti nell'ambiente.

Per questo spesso i risultati di tali test non presentano una chiara relazione dose-effetto, del tipo solitamente riscontrato in esperimenti con singoli contaminanti, e quindi la misura delle concentrazioni di inquinanti può non riflettere la reale tossicità potenziale dei sedimenti (Giesy e Hoke, 1989).

D'altra parte, i diversi organismi esibiscono una differente sensibilità ai vari tossici, anche in funzione di parametri fisiologici o metabolici legati a sesso, età, stato di salute, ecc., e delle condizioni ambientali; nella review di Giesy e Hoke (1990), vengono pertanto precisati i requisiti di un ideale test di tossicità dei sedimenti:

1. Gli organismi da utilizzare per i test dovrebbero essere facilmente allevabili in laboratorio ed essere disponibili in ogni momento.
2. La risposta dovrebbe essere prevedibile e costante.
3. Gli organismi dovrebbero rispondere in maniera simile alle diverse classi di tossici, oppure organismi con risposte sufficientemente differenziate dovrebbero essere inclusi in una batteria di test.
4. I risultati dei test dovrebbero poter essere posti in relazione con processi ecologicamente rilevanti nelle effettive condizioni ambientali.
5. I risultati dovrebbero rispecchiare gli standard ed i criteri di qualità per acqua e sedimenti.
6. I test dovrebbero essere applicabili ai diversi tipi possibili di sedimenti ed ambienti.
7. Le modalità dei test ed i metodi di diluizione dovrebbero essere opportunamente scelti, così da fornire informazioni correlabili con gli effetti realmente osservabili sul campo.
8. Il test dovrebbe essere rapido, ripetibile, poco costoso e facilmente modificabile per rispondere a diverse condizioni di applicazione.
9. Il test dovrebbe essere standardizzato (Davis, 1977).
10. Il test dovrebbe essere sufficientemente sensibile ed in grado di discriminare tra i vari tossici, per consentire di identificare il potenziale problema dei sedimenti studiati e di stabilire una graduatoria di tossicità tra campioni diversi.

Una dettagliata analisi dei vantaggi e degli svantaggi dei bioassay più utilizzati ha così permesso di calcolare la loro validità relativa rispetto a vari parametri operativi (rapidità, semplicità, ripetibilità, costo, standardizzazione, sensibilità, capacità di discriminare tra tossici diversi e di identificare gli stress ambientali effettivamente operanti, utilità per sviluppare standard applicativi) ed alla effettiva significatività ecologica (Tab. 1).

Tuttavia, poiché nessun organismo, da solo, offre garanzie di poter essere utilizzato in tutti i casi, viene spesso suggerito di non limitare gli esperimenti ad una sola specie, ma di utilizzare batterie di test (Giesy *et al.*, 1988a; 1988b; 1989), che comprendano almeno un batterio, un animale bentonico, un crostaceo od un pesce ed un'alga (Giesy e Hoke, 1989).

Purtroppo, allo stato attuale delle conoscenze non è possibile stabilire regole precise e spesso è necessario ricorrere a complesse serie di test letali e subletali e, nel caso particolare dei sedimenti, valutare accuratamente vantaggi e svantaggi dell'uso del sedimento tal quale o di sue fasi operativamente definite (Tab. 2). L'uso di elutriati, estrazioni chimiche selettive o acqua interstiziale è stata infatti proposta di volta in volta per studiare i meccanismi di ripartizione dei vari tossici ed i processi che portano alla manifestazione di effetti indesiderati sugli organismi viventi; tuttavia, nessuno di questi sistemi è esente da critiche, tanto che Burton (1991) conclude che non esiste un metodo "ottimale" per verificare la tossicità dei sedimenti.

Ciascuno di questi approcci è stato criticamente esaminato da numerosi autori, tra i quali Giesy e Hoke (1990), Burton (1991; 1992) e Cairns *et al.*, (1992), che ne hanno messo in evidenza pregi e difetti.

In particolare, indipendentemente dalla fase utilizzata, si pone sempre il problema della rappresentatività del campionamento (Baudo, 1990; Mudroch e MacKnight, 1991; Burton, 1992) e

dei controlli: idealmente, in questi test i controlli dovrebbero essere condotti sulla stessa matrice, ovviamente in assenza dei contaminanti.

Tab. 1 – Classificazione dei test per sedimenti (modificata da Giesy e Hoke, 1990: 1 – scarso; 2 – sufficiente; 3 – buono; 4 eccellente. Punteggio totale massimo possibile = 40)

Test	Rapidità	Semplicità	Ripetibilità	Costo	Standardizzazione	Sensibilità	Discriminazione	Rilevanza ecologica	Condizioni naturali	Utilizzo normativo	Totale	Riferimento Bibliografico
Politox	4	4	2	4	4	2	4	1	1	1	27	Elnabarawy <i>et al.</i> , 1988
Microtox	4	4	4	4	4	3	4	1	1	1	30	Bulich, 1984 Giesy <i>et al.</i> , 1988b
Protozoi	3	2	2	2	1	3	3	4	2	1	23	Cairns, 1979
Alghe (bottiglia)	3	3	3	3	4	3	3	2	2	2	28	Anon., 1978
Alghe (micropiastra)	4	3	3	3	2	3	2	2	2	2	26	Blaise <i>et al.</i> , 1986
Alghe (citometria)	4	2	3	1	2	3	3	2	2	2	24	Berglund <i>et al.</i> , 1988
Alghe	4	4	2	4	2	3	2	2	2	2	27	Rawson <i>et al.</i> , 1987
Oligocheti	3	3	2	3	2	2	2	4	4	2	27	Horning, 1980 Keilty <i>et al.</i> , 1988
Molluschi	1	2	2	2	2	2	2	4	4	2	23	Daube <i>et al.</i> , 1985
Anfipodi	2	2	2	2	2	2	4	4	4	2	26	Nebeker <i>et al.</i> , 1986 Nebeker e Miller, 1988
<i>Daphnia magna</i>	3	3	4	3	4	3	2	3	3	4	32	Schuyttema <i>et al.</i> , 1984 Nebeker <i>et al.</i> , 1984; 1986
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	3	2	3	3	3	4	2	3	3	3	29	Hoke <i>et al.</i> , 1990
Hexagenia	2	1	2	1	2	4	1	4	4	2	23	Prater e Anderson, 1977 Malueg <i>et al.</i> , 1983 Giesy <i>et al.</i> , 1990
<i>Chironomus tentans</i>	2	2	3	2	3	2	4	4	4	2	28	Wentzel <i>et al.</i> , 1977 Adams <i>et al.</i> , 1985 Giesy <i>et al.</i> , 1988a
<i>Pimephales promelas</i>	2	2	3	2	4	3	2	3	3	4	28	Hoke <i>et al.</i> , 1990 Dawson <i>et al.</i> , 1988

È stato quindi proposto di utilizzare opportuni “sedimenti di riferimento”, aventi cioè le stesse macrocaratteristiche dei sedimenti studiati, ma prelevati in zone non contaminate; oppure sedimenti artificiali (Walsh *et al.*, 1990; 1992; Suedel e Rodgers, 1994; Naylor e Rodrigues, 1995; Suedel e Rodgers, 1996), composti ad esempio da sabbia (~ 70 %), silt/argilla (~ 20 %), e carbonio organico (~ 1 - 10 % di torba di sfagno). Anche così, difficilmente i sedimenti artificiali approssimano a sufficienza le reali condizioni di un campione naturale; l’uso di sedimenti standardizzati può tuttavia servire per confrontare la tossicità di particolari tossici.

Tab. 2 - Fasi del sedimento utilizzate in test di tossicità.

Fase	Vantaggi	Svantaggi	Uso di routine
Estrazione con solventi non acquosi	Per ogni tipo di sedimento Estrazione sequenziale per frazioni a vario grado di biodisponibilità La maggior varietà di endpoint Risposta funzione di dose	Realismo per l'ecosistema: biodisponibilità sconosciuta alterazioni chimiche	Esame preliminare rapido Endpoint unici, componenti di batterie di test
Estrazione con acqua (elutriato)	Per ogni tipo di sedimento Frazioni facilmente disponibili Simula i processi di ambienti anossici Grande varietà di endpoint Metodo relativamente standardizzato Risposta funzione di dose	Realismo per l'ecosistema: una sola condizione di ossidazione; un solo rapporto solido/acqua; esposizioni per tempi prolungati di una condizione monofase che non si verifica mai <i>in situ</i> o all'equilibrio	Esame preliminare rapido Endpoint non possibili con sedimento tal quale Valutazione per dragaggio
Acqua interstiziale	Via diretta di esposizione per alcune specie Fase semidiretta di esposizione per alcune specie Grande varietà di endpoint Metodo relativamente standardizzato Risposta funzione di dose Criteri di qualità per i sedimenti	Non possibile per alcuni tipi di sedimento Limitato volume d'acqua Metodo ottimale di raccolta sconosciuto, alterazioni possibili con tutti i metodi Fase di esposizione alterata chimicamente e fisicamente quando separata dal sedimento Flusso tra acqua sovrastante e sedimento sconosciuto Relazioni per e tra alcuni organismi incerta: scavatori, epibentonici, liberamente natanti, filtratori e filtratori selettivi, ciclo vitale durante l'esposizione all'acqua interstiziale	Esame preliminare rapido Endpoint non possibili con sedimento tal quale Studio iniziale
Sedimento tal quale	Per ogni tipo di sedimento Elevato realismo relativo Risposta funzione di dose Approccio olistico (approccio riduzionista nei tipi precedenti) Criteri di qualità per i sedimenti Acqua del sito o ricostituita per isolare i fattori tossici	Alcune alterazioni fisiche/chimiche/ microbiologiche rispetto alle condizioni in campo Risposta in funzione della dose ancora a livello di tentativi Esperimenti più difficili per alcune specie o tipi di sedimenti Pochi metodi standardizzati Biota indigeno può essere presente nel campione	Esame preliminare rapido Studi cronici Studio iniziale Criteri per i sedimenti
In situ	Misura reale che integra tutti i fattori chiave ed elimina influenze estranee Criteri di qualità per i sedimenti Verifica degli effetti di risospensione/ solidi sospesi	Pochi metodi e endpoint Più lento di altri test Variabili mesocosmi Predazione da parte di biota indigeno	Effetto della risospensione Sistemi di monitoraggio intensivi Criteri per i sedimenti

Alterazioni delle comunità residenti

Il principio sul quale si basa questo tipo di accertamento è molto semplice: se una comunità è sottoposta a stressori tali da influenzarne il funzionamento, il confronto tra comunità di siti contaminati e incontaminati, o tra comunità nello stesso sito in tempi diversi, deve produrre delle differenze significative.

L'applicazione, però, è molto più complessa perché è necessario innanzi tutto stabilire dei valori di riferimento, cioè quelli di una tipica comunità in condizioni "naturali" o "non perturbate" per ciascuno dei parametri considerati, ad esempio (Diaz, 1992; La Point e Fairchild, 1992):

- ✓ composizione specifica
- ✓ distribuzione degli individui di ciascuna specie
- ✓ indici di diversità
- ✓ indici di somiglianza
- ✓ biomassa dei vari livelli trofici
- ✓ presenza o assenza di specie indicatrici (sensibili, tolleranti, resistenti, ecc.)

In alternativa o, meglio, in aggiunta, dovrebbero poi essere valutati alcuni parametri funzionali (Cairns *et al.*, 1992):

- ✓ velocità di produzione della biomassa
- ✓ produzione primaria
- ✓ respirazione della comunità
- ✓ velocità di assunzione/rigenerazione dei nutrienti
- ✓ velocità di decomposizione
- ✓ regolazioni biologiche

Questo tipo di approccio è ecologicamente molto rilevante, ma pone notevoli problemi di rappresentatività (tipo, numero e frequenza di campionamento) e di rappresentazione sintetica (generalmente, richiedente l'uso di modellistica di tipo avanzato). Per questo, non stupisce che trovi solo sporadiche applicazioni: la più frequente resta l'Indice Biotico Esteso, limitatamente ai corsi d'acqua, e con notevoli problemi di trasposizione dei risultati da una situazione all'altra.

Secondo Giesy e Hoke (1989), i test di tossicità sui sedimenti offrono indiscussi vantaggi rispetto ad analoghi esperimenti condotti sulle acque o a costose e complicate ricerche di monitoraggio sugli effetti in situ sugli organismi indigeni. Ad esempio, l'assenza/presenza di determinate specie, od anche una variazione quali-quantitativa delle comunità acquatiche, difficilmente può essere posta in diretta relazione con una contaminazione ambientale anche quando una estesa caratterizzazione fisico-chimica prende in considerazione tutte le possibili forme di disturbo.

Purtroppo, lo stesso Chapman (Chapman *et al.*, 1992; Power e Chapman, 1992) è poi giunto alla conclusione che anche il sistema della Triade non è sufficiente a caratterizzare completamente la rete di interazioni tra tossici e biota. Sarebbe infatti necessario integrare questi studi con ricerche anche sulla chimica dei tessuti degli organismi, nonché sulla loro patologia, poiché spesso effetti indesiderati sugli organismi possono essere dovuti a fenomeni di bioaccumulo e/o di generale indebolimento dei meccanismi di difesa nei confronti dei patogeni: l'esempio classico è quello dei fenomeni di eutrofizzazione, che possono facilmente incrementare la morbilità ittica.

L'approccio integrato prevede dunque che vengano studiati i processi di bioaccumulo (Lee, 1992; Mac e Schmitt, 1992), oppure, in organismi opportunamente prescelti, biomarker specifici, cioè delle risposte biochimiche, fisiologiche o patologiche all'esposizione a contaminanti presenti nei sedimenti. Questi biomarker possono essere ormoni corticosteroidi, glicogeno, lipidi, componenti del sangue (ad esempio, transaminasi del siero, aspartato aminotransferasi, alanina aminotransferasi), il rapporto RNA/DNA, o altri indicatori istopatologici.

Per il sistema immunitario, Benson e Di Giulio (1992) suggeriscono ad esempio uno schema in tre stadi:

Stadio I: Screening generale

- ✓ Conteggio completo e differenziale delle cellule del sangue
- ✓ Peso degli organi
- ✓ Integrità istologica
- ✓ Attività cellulare dei Natural Killer (cellule con recettori per la porzione effettrice della molecola tossica)
- ✓ Fagocitosi dei macrofagi (su marker fluorescenti, cellule di lievito colorate, batteri)
- ✓ Attività lisante

Stadio II: Valutazione comprensiva

- ✓ Quantificazione delle cellule immunitarie
- ✓ Quantizzazione delle immunoglobuline native
- ✓ Test per cellule formanti placche
- ✓ Blastogenesi dei linfociti
- ✓ Risposta mista leucocitaria
- ✓ Attività citotossica delle cellule T
- ✓ Risposta dei macrofagi (accumulo di melanina, chemiotassi, pinocitosi)

Stadio III: Resistenza degli ospiti (esposti agli appropriati batteri, virus, patogeni parassiti, cellule tumorali)

- ✓ Mortalità
- ✓ Batteriemia, viremia, parassitemia, quantificazione durata dei tumori
- ✓ Quantizzazione di anticorpi specifici

Naturalmente, è impensabile che l'approccio integrato di Chapman *et al.* (1992) possa essere utilizzato come metodo di routine; d'altra parte, è necessario arrivare a definire un set minimo di parametri da esaminare.

Purtroppo, neanche un apposito Workshop su Ecological Risk Assessment of Contaminated Sediments (Ingersoll *et al.*, 1997) è riuscito a trovare un accordo operativo, identificando invece numerosi settori nei quali è indispensabile un approfondimento di ricerca.

Di conseguenza, solitamente ciascun investigatore utilizza una soluzione di compromesso, in funzione delle risposte specifiche cercate: ad esempio, Reynoldson e Zarull (1989) hanno proposto un preciso schema metodologico (Fig. 3) che prevede l'uso di numerosi test di tossicità in ogni caso in cui i sedimenti sono potenzialmente la causa di effetti indesiderati nell'ambiente studiato.

Viene comunque generalmente ammesso che gli studi di laboratorio da soli non bastano e devono essere validati sul campo. Infatti, per il semplice fatto che i campioni, una volta prelevati e trasportati in laboratorio, sono soggetti a condizioni fisico-chimiche (luce, temperatura, potenziale redox, ecc.) diverse da quelle originali, la ripartizione liquido-solido e le caratteristiche di reattività dei potenziali tossici possono subire alterazioni anche rilevanti.

Per questo, sono stati recentemente proposti numerosi metodi di studio della tossicità *in situ*, che prevedono quindi una esposizione di organismi test direttamente nell'ambiente allo studio, con una minima o nulla alterazione delle condizioni esterne.

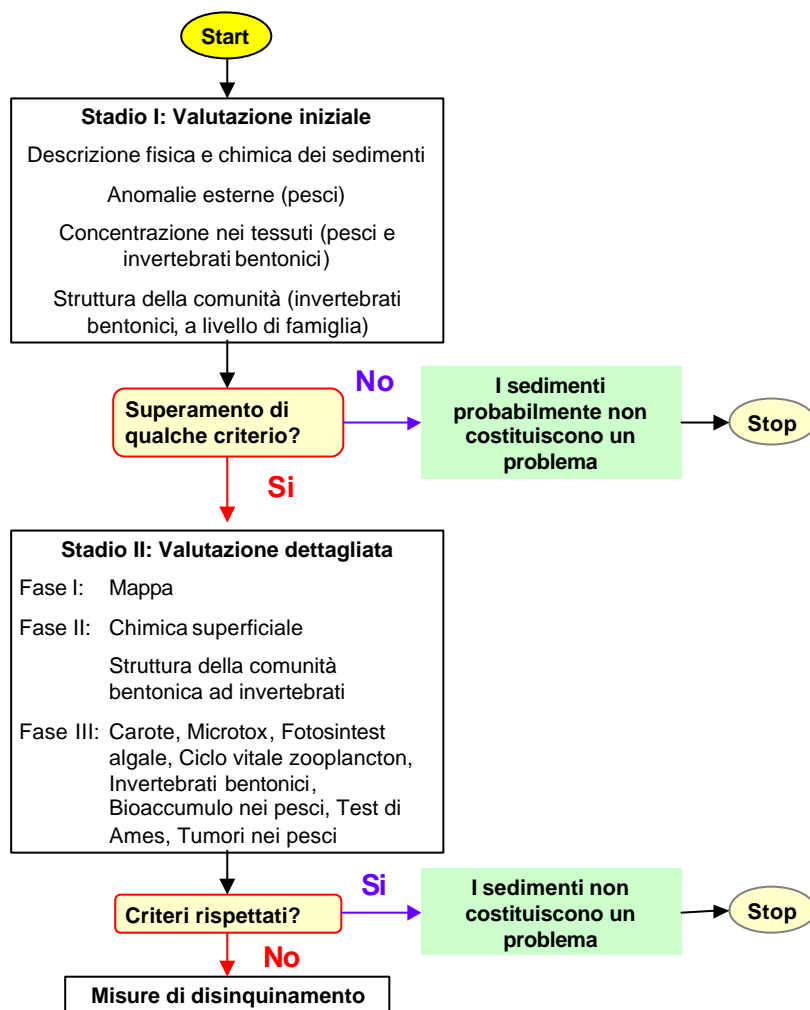


Fig. 3 – Scherma di valutazione della qualità dei sedimenti

Test *in situ*

In sintesi, questi test si propongono di studiare l'esposizione a sedimenti contaminati direttamente nell'ambiente da controllare.

Una prima applicazione è una diretta derivazione del metodo della bottiglia chiara e scura, largamente impiegato negli studi sulla produzione primaria fitoplanctonica; Munawar *et al.* (1989), ad esempio, hanno utilizzato questa tecnica per determinare in situ la tossicità nei confronti del fitoplancton delle acque dei Great Lakes.

In teoria, lo stesso metodo può essere applicato anche allo zooplancton ed essere esteso a studi sul bioaccumulo (chimica dei tessuti) e sulla patologia degli organismi utilizzati.

Allo stesso modo, possono poi essere utilizzati anche i pesci, sospendendoli in acqua o ponendoli a contatto dei sedimenti in apposite gabbie (Mac *et al.*, 1990).

Ma l'esempio più noto è certamente quello del "mussel watch", che prevede l'utilizzo di molluschi acquatici (Widdows *et al.*, 1981). Questa tecnica consente di rilevare facilmente effetti tossici e fenomeni di bioaccumulo per una serie di tossici, semplicemente trapiantando i molluschi, in apposite reti, da allevamenti o siti di riferimento a siti potenzialmente contaminati che si intendono studiare.

Kramer *et al.* (1989) hanno addirittura realizzato un apparecchio che registra automaticamente la frequenza di apertura e chiusura delle valve, utilizzata quale indice dello stress cui è sottoposto il mollusco.

In alternativa agli organismi animali, è poi possibile utilizzare anche vegetali acquatici, ad esempio i muschi, particolarmente adatti per studi sul bioaccumulo (Mouvet, 1989).

Anche gli studi sulla struttura della comunità bentonica, e quindi eventuali alterazioni indotte dalla contaminazione dei sedimenti, possono essere studiate *in situ*, ad esempio utilizzando il metodo dei substrati di colonizzazione (Fig. 4) del tipo suggerito dalla Norma Internazionale ISO 9391 (1993).

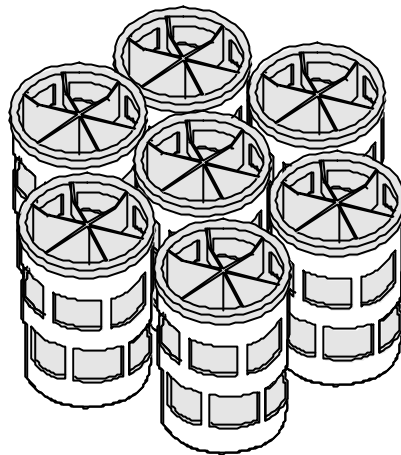


Fig. 4 – Unità di colonizzazione ISO 9391.

Lo strumento più completo rimane comunque il cosiddetto “mesocosmo” (Odum, 1984; SETAC-Europe, 1991); isolando opportunamente una porzione dell’ambiente allo studio è infatti possibile effettuare direttamente sul posto studi di dinamica di popolazione, test di tossicità, ricerche sul bioaccumulo e sulla patologia. Poiché il corretto impiego di questa tecnica impone che il mesocosmo includa i sedimenti (SETAC-Europe, 1991), anche la chimica di questo comparto può dunque essere tenuta in considerazione.

Purtroppo, questa tecnica è estremamente complessa (e costosa), limitandone fortemente l’applicazione; inoltre, proprio per le difficoltà inerenti al suo impiego di routine, raramente è possibile compiere gli esperimenti con un numero adeguato di repliche.

È dunque desiderabile sviluppare nuove metodologie, specificatamente studiate per effettuare test di tossicità *in situ*. Essenzialmente, queste prevedono di realizzare opportuni contenitori, con aperture coperte da una rete, che possano contenere gli organismi test desiderati ed essere posizionate a contatto dei sedimenti (Sasson-Brickson e Burton, 1991; Snyder-Conn, 1993; Baudo *et al.*, 1995; Rossi *et al.*, 1998), o addirittura essere inserite al loro interno (Skalski *et al.*, 1990; Figura 5). La presenza di una rete ottiene lo scopo di trattenere gli organismi all’interno del contenitore, senza però impedire il flusso bidirezionale di soluti (e particelle di dimensioni inferiori alle maglie della rete).

Queste tecniche sono state utilizzate ad esempio per studiare *in situ* la tossicità dei sedimenti del lago d’Orta (Baudo *et al.*, 1995). In questo caso, la tossicità *in situ* nei confronti di *Daphnia magna* è risultata essere molto superiore a quella evidenziata con diversi test di laboratorio (Microtox, Thamnotoxkit, Rototoxkit, germinazione ed allungamento radicale di semi diversi), effettuati con campioni di acqua, acqua interstiziale e sedimenti del lago d’Orta.

Ad una conclusione analoga erano del resto giunti anche Sasson-Brickson e Burton (1991), che hanno rilevato differenze significative tra test *in situ* e di laboratorio, poiché nel loro caso si era in presenza di tossici fotodegradabili ed i test di laboratorio risentivano della manipolazione, e quindi esposizione alla luce, dei campioni.

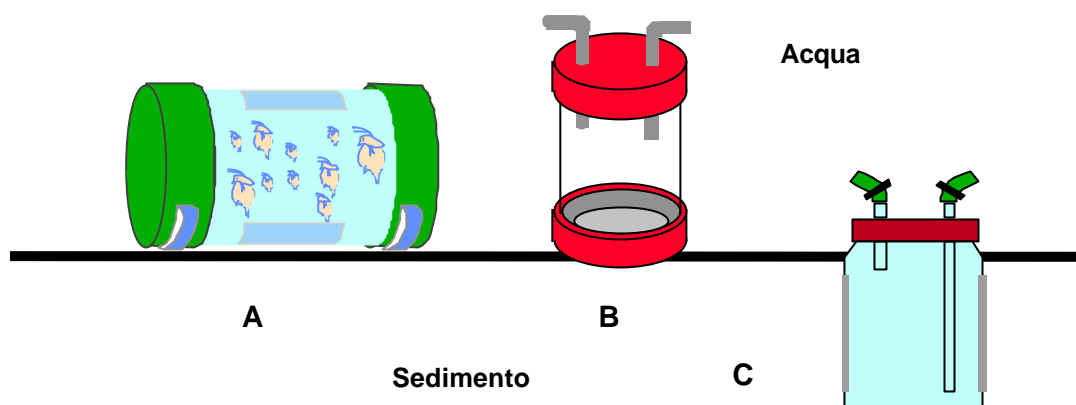


Fig. 5 - Esempi di camere per la determinazione della tossicità in situ (A = Baudo, 1995; B = Sasson-Brickson e Burton, 1991; C = Skalski et al., 1990)

In definitiva, i test di tossicità *in situ* si propongono come buoni candidati per consentire di arrivare ad una realistica interpretazione delle condizioni di contaminazione di un dato ecosistema. Naturalmente, per poter risalire alle relazioni di causa ed effetto, è però necessario completare lo studio con le opportune analisi chimiche e biologiche, ed eventualmente con test di tossicità in laboratorio. Tuttavia, sembrerebbe logico iniziare tale studio con i test di tossicità *in situ*, e passare alle altre fasi solo se e quando i risultati dello screening preliminare ne indichino la necessità, fino ad arrivare ai complessi schemi di identificazione dei tossici presenti. La principale limitazione è costituita dalla necessità di lavorare a profondità limitate, accessibili da una imbarcazione o tramite operatori subacquei; purtroppo, attualmente questa difficoltà può essere superata solo utilizzando costosi e complessi sistemi telecomandati o sommergibili appositamente attrezzati. La diffusione di questo tipo di ricerche è comunque auspicabile, per arrivare a definire tecniche standardizzate. E, dando libero sfogo alla fantasia, sarà forse possibile sviluppare analoghe metodiche per una determinazione *in situ* anche dei parametri fisici, chimici e biologici per una completa interpretazione delle condizioni esistenti.

Disposizioni legislative: La situazione attuale in Italia

Il Decreto Legislativo 11 maggio 1999, n. 152, aggiornato con il D.Lgs. 18 agosto 2000, n. 258 (che recepisce le direttive 91/271/CEE “trattamento delle acque reflue urbane” e 91/676/CEE “protezione delle acque dall’inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole”: Cernetti Spriano e Parodi, 2001), sostanzialmente comporta l’abrogazione delle normative precedenti (Merli, acque da potabilizzare, di balneazione, idonee alla vita dei pesci, destinate alla vita dei molluschi, ...) e delega alle Regioni il compito di identificare, per ciascun corpo idrico, la classe di qualità di appartenenza, in funzione di un monitoraggio e della classificazione delle acque in funzione di precisi obiettivi di qualità ambientale. Senza entrare in eccessivi dettagli, per i corpi idrici questi obiettivi prevedono di definire:

Stato ecologico (“espressione della complessità degli ecosistemi acquatici e della natura fisica e chimica delle acque e dei sedimenti, delle caratteristiche del flusso idrico e della struttura fisica del corpo idrico, considerando comunque prioritario lo stato degli elementi biotici dell’ecosistema”), sulla base di parametri chimici e fisici di base relativi al bilancio dell’ossigeno e allo stato trofico. Per i corsi d’acqua, deve essere inoltre applicato l’Indice Biotico Esteso (Ghetti, 1997), basato sull’inventario della comunità macrobentonica, nonché la rilevazione e valutazione degli elementi biologici e morfologici. L’ANPA, entro 2 anni dalla data di emanazione del Decreto, dovrà precisare i protocolli metodologici da utilizzare.

Stato chimico (definito in base alla presenza di microinquinanti ovvero di “sostanze chimiche pericolose”). Prevede quindi che venga verificato il rispetto di limiti di concentrazione, stabiliti in

base a LC50 o EC50 su tre livelli trofici, completati da studi sui sedimenti e su effetti esercitati sull'ambiente. Anche per questo, l'ANPA, entro 2 anni dalla data di emanazione del Decreto, dovrà precisare i protocolli metodologici da utilizzare.

Stato ambientale (“grado di scostamento rispetto alle condizioni di un corpo idrico di riferimento”). Come abbiamo già visto, esistono a questo proposito difficoltà obiettive per definire tali condizioni di riferimento. Il Decreto apparentemente supera questo problema perché i corpi idrici di riferimento possono essere identificati “anche in via teorica”.

Complessivamente, in una prima fase conoscitiva della durata di 24 mesi, sarà dunque necessario classificare i corpi idrici superficiali in 5 categorie (Tab. 3):

Tab. 3 - Stato ambientale dei corpi idrici superficiali

ELEVATO	Non si rilevano alterazioni dei valori di qualità degli elementi chimico-fisici ed idromorfologici per quel dato tipo di corpo idrico in dipendenza degli impatti antropici, o sono <i>minime</i> rispetto ai valori <i>normalmente</i> associati allo stesso ecotipo in <i>condizioni indisturbate</i> . La qualità biologica sarà caratterizzata da una composizione e un'abbondanza di specie corrispondente totalmente o <i>quasi</i> alle condizioni <i>normalmente</i> associate allo stesso ecotipo. La presenza di microinquinanti, di sintesi e non di sintesi, è paragonabile alle concentrazioni di fondo rilevabili nei corpi idrici <i>non influenzati</i> da alcuna pressione antropica
BUONO	I valori degli elementi della qualità biologica per quel tipo di corpo idrico mostrano <i>bassi</i> livelli di alterazione derivanti dall'attività umana e si discostano <i>solo leggermente</i> da quelli <i>normalmente</i> associati allo stesso ecotipo in <i>condizioni non disturbate</i> . La presenza di microinquinanti, di sintesi e non di sintesi, è in concentrazioni da non comportare effetti a breve e lungo termine sulle comunità biologiche <i>associate al corpo idrico di riferimento</i>
SUFFICIENTE	I valori degli elementi della qualità biologica per quel tipo di corpo idrico si discostano <i>moderatamente</i> da quelli <i>di norma</i> associati allo stesso ecotipo in <i>condizioni non disturbate</i> . I valori mostrano segni di alterazione derivanti dall'attività umana e sono <i>sensibilmente più disturbati</i> che nella condizione di “buono stato”. La presenza di microinquinanti, di sintesi e non di sintesi, è in concentrazioni da non comportare effetti a breve e lungo termine sulle comunità biologiche <i>associate al corpo idrico di riferimento</i>
SCADENTE	Si rilevano alterazioni <i>considerevoli</i> dei valori degli elementi di qualità biologica del tipo di corpo idrico superficiale, e le comunità biologiche interessate si discostano <i>sostanzialmente</i> da quelle di <i>norma</i> associate al tipo di corpo idrico superficiale <i>inalterato</i> . La presenza di microinquinanti, di sintesi e non di sintesi, è in concentrazioni da comportare effetti a medio e lungo termine sulle comunità biologiche <i>associate al corpo idrico di riferimento</i>
PESSIMO	I valori degli elementi di qualità biologica del tipo di corpo idrico superficiale presentano alterazioni <i>gravi</i> e mancano <i>ampie</i> porzioni delle comunità biologiche di <i>norma</i> associate al tipo di corpo idrico superficiale <i>inalterato</i> . La presenza di microinquinanti, di sintesi e non di sintesi, è in concentrazioni da <i>gravi</i> effetti a breve e lungo termine sulle comunità biologiche <i>associate al corpo idrico di riferimento</i>

Già una prima analisi di questa graduatoria evidenzia la totale mancanza di basi ecotossicologiche **obiettive**: le parole in corsivo, infatti, evidenziano infatti il carattere **soggettivo** delle valutazioni (*scarsa o grave alterazione, stato normale o inalterato, corpo idrico di riferimento, ...*) e sicuramente apre la strada ad annosi contenzioni giudiziari sull'interpretazione dei dati effettivamente rilevati.

In secondo luogo, il Decreto stabilisce anche che nella **Fase a regime**, se lo stato del corpo idrico è classificato come Elevato o Buono, il successivo monitoraggio viene ridotto solo ai parametri di base (con buona pace dell'Ecotossicologia).

Per i corpi idrici sotterranei, la definizione dello stato ambientale è decisamente più facile, poiché si prevede solo una classificazione chimica e la classificazione ambientale si basa dunque solo sull'eventuale rilevamento di inquinanti chimici.

Per i corsi d'acqua, viene dedicata un po' più di attenzione al biota e si prevede infatti una analisi di base (IBE) ed alcune analisi supplementari (non obbligatorie), con saggi biologici per effetti a breve o lungo termine. Tra queste analisi supplementari vengono considerati prioritari:

- 1) test di tossicità su campioni acquosi concentrati su *Daphnia magna*;
- 2) test di mutagenicità e teratogenicità su campioni acquosi concentrati;
- 3) test di crescita algale;
- 4) test su campioni acquosi concentrati con batteri luminescenti

Altri test "opportuni" sono poi l'accumulo di contaminanti primari (PCB, DDT e Cd) su tessuti muscolari di specie ittiche residenti o su organismi macrobentonici, oppure studi sui sedimenti. Anche in questo caso, però, sono prioritari gli studi chimici:

- 1) inorganici e metalli (As, Cd, Zn, Cr totale, Hg, Ni, Pb, Cu);
- 2) organici (Idrocarburi Policiclici Aromatici presunti cancerogeni o cancerogeni, Composti Organoclorurati; Policlorobifenili, Diossine)

Solo "se necessario" vengono effettuati:

- 1) saggi su estratti di sedimento
- 2) saggi sul sedimento in toto
- 3) saggi su acqua interstiziale

Prioritari sia per saggi acuti che (sub)cronici: *Oncorhynchus mykiss*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Chironomus tentans* e *C. riparius*, *Pseudokirchneriella subcapitata* (erroneamente ancora chiamato *Selenastrum capricornutum*) e batteri luminescenti (metodi da precisare da parte dell'ANPA).

In definitiva, la classificazione dei corsi d'acqua sarà basata sulla combinazione delle informazioni su:

Stato ecologico = IBE + livello inquinamento macrodescrittori (6 parametri chimici + *Escherichia coli*)

Stato di qualità ambientale = Stato Ecologico + concentrazione (\leq o $>$ di valori limite) per inquinanti organici e inorganici

In questa combinazione, l'unico dato ecotossicologico rilevante è quindi l'Indice Biotico Esteso. Tuttavia, se lo stato ambientale complessivo risulterà essere < buono (caso molto probabile), e soprattutto se l'IBE darà una indicazione peggiore dei macrodescrittori, vengono richieste analisi supplementari, test di tossicità e accumulo in sedimenti o biota.

Inoltre, se i test di tossicità e/o il bioaccumulo risultano significativi, lo stato ambientale viene automaticamente classificato come scadente.

Anche per i laghi, le valutazioni saranno basate su:

- 1) Indagini sulle acque:
parametri di base (13 parametri fisico-chimici + clorofilla)
parametri aggiuntivi: microinquinanti organici e inorganici
- 2) Indagini sui sedimenti: come corsi d'acqua
- 3) Biota: come corsi d'acqua (salvo nuove indicazioni ANPA)

La relativa classificazione sarà ancora:

Stato ecologico = Trasparenza, ossigeno ipolimnico, clorofilla a, fosforo totale

Stato di qualità ambientale = Stato Ecologico + concentrazione (\leq o $>$ di valori limite) per inquinanti organici e inorganici.

In questo caso, però, poiché attualmente non esiste un IBE per i laghi, la valutazione ecotossicologica è completamente inesistente. Acquista qualche importanza solo nel caso in cui la valutazione complessiva dello stato ambientale sia inferiore a buono, quando cioè sono richieste analisi supplementari, test di tossicità e accumulo in sedimenti o biota. Come per i corsi d'acqua, se vengono prodotte evidenze di tossicità e/o bioaccumulo, lo stato ambientale è automaticamente considerato scadente.

Per le acque marine costiere, il Decreto prevede analisi:

- 1) delle acque (parametri di base: 11 parametri fisico-chimici + enterococchi + clorofilla);
- 2) dei sedimenti (prioritari: granulometria, IPA, metalli pesanti bioaccumulabili, C organico, PCB e pesticidi, saggi biologici su diversi gruppi tassonomici);
- 3) del biota (prioritari: accumulo metalli e contaminanti organici - IPA, PCB e pesticidi - in bivalvi Mytilidae - *Mytilus galloprovincialis* - o Ostreidae - *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* - Se non reperibili, Telloidea - *Donax trunculus*- e Veroidea - *Tapes decussata*, *Tapes philippinarum*-; aggiuntivi: biocenosi di maggior pregio ambientale - fanerogame, coralligeno, ... - ; saggi biologici a breve o lungo termine, su diversi gruppi tassonomici, privilegiando specie autoctone o con protocolli standardizzati)

La relativa classificazione dipenderà dunque da:

- 1) Indice trofico (clorofilla a, ossigeno disciolto, fosforo totale, azoto [nitrico + nitroso + ammoniacale])
- 2) Stato di qualità ambientale (ELEVATO: Buona trasparenza, assenza anomale colorazioni, assenza di sottosaturazione bentica ossigeno; BUONO: Occasionali intorbidamenti, occasionali anomale colorazioni, occasionale sottosaturazione bentica ossigeno; MEDIOCRE: Scarsa trasparenza, anomale colorazioni, ipossie e occasionali anossie bentiche, sofferenza ecosistema bentico; SCADENTE: Elevata torbidità, diffuse e persistenti colorazioni anomale, diffuse e persistenti ipossie/anossie bentiche, morie organismi bentiche, alterazione/semplificazione comunità bentiche, danni economici turismo pesca acquacoltura). Se tossicità e/o bioaccumulo, stato ambientale = scadente.

Infine, per le acque di scarico in acque superficiali o fognature sono obbligatorie le analisi per:

- 49 parametri fisico-chimici
- *Escherichia coli*
- Saggio di tossicità acuta (LC50 o LC80 24 h *Daphnia magna*)

E, facoltativi, i saggi di tossicità acuta (*Ceriodaphnia dubia*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, batteri luminescenti, *Artemia salina*, altro secondo indicazioni ANPA)

Se i reflui urbani e industriali recapitano invece sul suolo, sono obbligatori:

- 37 parametri fisico-chimici
- *Escherichia coli*
- Saggio di tossicità acuta (LC50 24 h *Daphnia magna*)

E ancora facoltativi i saggi di tossicità acuta (*Ceriodaphnia dubia*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, batteri luminescenti, *Artemia salina*, altro secondo indicazioni ANPA).

Per tutti i reflui, se vengono effettuati più test, si considera il risultato peggiore. Il risultato positivo non determina sanzioni, ma “determina altresì l’obbligo di approfondimento delle indagini analitiche, la ricerca delle cause di tossicità e la loro rimozione”.

In conclusione, sembra che l’Italia abbia finalmente scoperto l’Ecotossicologia, o quanto meno il suo potenziale uso “ufficiale”; ma una sua concreta applicazione nella maggior parte dei casi è ancora soggetta a due condizioni: l’indicazione “chimica” che gli ambienti allo studio sono contaminati da un certo numero di inquinanti organici o inorganici; la predisposizione di appositi protocolli metodologici da parte dell’ANPA.

La prima condizione riflette una concezione “storica” (e ormai decisamente datata) della verifica della contaminazione ambientale attraverso una contabilità chimica, con tutti i limiti ampiamente evidenziati da questo approccio riduttivo; per la seconda, una critica in chiave ecotossicologica deve necessariamente attendere che l’ANPA definisca la strategia di controllo ed i mezzi concreti per la sua implementazione.

È il caso comunque di sottolineare che questa futura strategia dovrà necessariamente soddisfare tanto i requisiti tossicologici che quelli ecologici, privilegiando essenzialmente la standardizzazione dei metodi anche nell’interpretazione statistica dei risultati (eliminando quindi le incertezze dei “quasi normale”, “moderatamente o gravemente compromesso”, ecc.).

Si può comunque rilevare che, in chiaro contrasto con questa impostazione, il Decreto prevede però la disposizione automatica: tossicità e/o bioaccumulo = stato ambientale scadente.

Anche ammettendo (e non è così scontato) che lo strumento utilizzato per misurare la tossicità possa essere adeguato ed avere una effettiva rilevanza ecologica, grosse riserve esistono per il parametro bioaccumulo (ribadendo ancora una volta che il bioaccumulo, di per sé, non costituisce un effetto avverso).

Rimane poi una perplessità: cosa succederà nel caso, non certo improbabile, in cui qualche controllo volontario, cioè non reso necessario (quindi non giustificato a priori) da evidenze di tipo chimico, evidenzi qualche tipo di tossicità (magari addirittura al di fuori di quella prescritta dall’ANPA)? Per finire un augurio: che l’applicazione della nuova normativa abbia sorte migliore, ad esempio, della Legge Merli e che gli strumenti di controllo vengano effettivamente ed efficacemente utilizzati.

Bibliografia

AAVV. 1979. *Animals as Monitors of Environmental Pollutants*. U.S. National Academy of Sciences: 421 pp.

Adams, W.J., R.A. Kimerle and R.G. Mosher. 1985. Aquatic safety assessment of chemicals sorbed to sediments. In: R.D. Cardwell, R. Purdy and R.C. Bahner (Eds.). *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. ASTM STP 854: 429-453.

- Adriaanse, M., H.A.G. Niederländer and P.B.M. Stortelder. 1995. Monitoring water quality in the future. Vol. 1. Chemical monitoring. Min. Housing, The Netherlands: 100 pp.
- Anon. 1978. *The Selenastrum capricornutum Printz Algal Assay Bottle Test*. U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR. EPA-600/9-78-018.
- Babich, H. and G. Stotsky. 1977. Reductions in the toxicity of cadmium to microorganisms by clay minerals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 696-705.
- Bargagli, R. 1998. *Trace Elements in Terrestrial Plants. An Ecophysiological Approach to Biomonitoring and Biorecovery*. Springer: 324 pp.
- Baudo, R. 1990. Sediment Sampling, Mapping, and Data Analysis. In : R. Baudo, J. Giesy and H. Muntau. 1990. *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants*. Lewis Publ., Chelsea, MI: 15-60.
- Baudo, R., J. Giesy and H. Muntau. 1990. *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants*. Lewis Publ., Chelsea, MI: 405 pp.
- Baudo, R., M. Beltrami, D. Rossi, A. Gronda, A.M. Abdel-Monem and G.A. Burton. 1995. Sediment toxicity testing of lake Orta after liming. *2nd SETAC World Congress*, Vancouver, 5-9 November 1995.
- Beeby, A. 1991. Toxic Metal Uptake and Essential Metal Regulation in Terrestrial Invertebrates: A Review. In: M.C. Newman and A.W. McIntosh (Eds.). *Metal Ecotoxicology. Concepts & Applications*. Lewis Publ.: 65-89.
- Benson, W.H. and R.T. Di Giulio. 1992. Biomarkers in Hazard Assessments of Contaminated Sediments. In: G.A. Burton (Ed.). *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publ.: 241-265.
- Berglund, D.L., S. Strobel, F. Sugawara and G.A. Strobel. 1988. Flow cytometry as a method for assaying the biological activity of phytotoxins. *Plant Sci.*, 56: 183-188.
- Blaise, C., R. Legault, N. Bermingham, R. Van Coillie and P. Vasseur. 1986. A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Tox. Assess.*, 1: 261-281.
- Bulich, A.A. 1984. Microtox - A bacterial toxicity test with several environmental applications. In: D. Liu and B.J. Dutka (Eds.). *Toxicity Screening Procedures Using Bacterial Systems*. Marcel Dekker, New York: 55-64.
- Burgess, R.M. and K.J. Scott. 1992. The Significance of In-Place Contaminated Marine Sediments on the Water Column: Processes and Effects. In: Burton G.A. (Ed.). *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publ.: 129-165.
- Burton, G.A. 1991. Assessing Toxicity of Freshwater Sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10: 1585-1627.
- Burton, G.A., Jr. 1992. *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publ.: 457 pp.
- Burton, G.A., Jr. 1992. Sediment Collection and Processing: Factors Affecting Realism. In: G.A. Burton (Ed.). *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publ.: 37-66.
- Cairns, J., Jr. 1979. A strategy for use of protozoans in the evaluation of hazardous substances. In: S. James (Ed.). *Biological Indicators of Water Quality*. University of Newcastle upon Tyne, U.K.: 6/1-6/7.
- Cairns, J., Jr., A.V. Nebeker, J.H. Gakstatter and W. Griffis. 1984. Toxicity of copper-spiked sediments to freshwater invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 3: 435-446.
- Cairns, J., B.R. Niederlehner and E.P. Smith. 1992. The Emergence of Functional Attributes as Endpoints in Ecotoxicology. In: G.A. Burton (Ed.). *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publ.: 111-128.
- Cervetti Spriano, F. e C. Parodi. 2001. *La nuova tutela delle acque*. Giuffrè: 680 pp.
- Chapman, P.M. 1987. Marine sediments toxicity tests. In: *Symposium on Chemical and Biological Characterization of Sludges, Sediments, Dredge Spoils and Drilling Muds*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. ASTM STP 976: 391-402.
- Chapman, P.M. 1990. The Sediment Quality Triad Approach to Determining Pollution-Induced Degradation. *Sci. Tox. Environ.*, 97-8: 815-825.

- Chapman, P.M. and E.R. Long. 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar. Pollut. Bull.*, 14: 81-84.
- Chapman, P.M. and R.O. Brinkhurst. 1984. Lethal and sublethal tolerances of aquatic oligochaetes with reference to their use as a biotic index of pollution. *Hydrobiologia*, 115: 139-144.
- Chapman, P.M., E.A. Power and G.A. Burton. 1992. Integrative Assessments in Aquatic Ecosystems. In: G.A. Burton (Ed.). *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publ.: 313-340.
- Ciborowski, J.J.H. and L.D. Corkum. 1988. Organic contaminants in adult aquatic insects of the St. Clair and Detroit rivers, Ontario, Canada. *J. Great Lakes Res.*, 14: 148-156.
- Clements, W.H. 1991. Community Responses of Stream Organisms to Heavy Metals: A Review of Observational and Experimental Approaches. In: M.C. Newman and A.W. McIntosh (Eds.). *Metal Ecotoxicology. Concepts & Applications*. Lewis Publ.: 363-391.
- Coler, R.A. and J.P. Rockwood. 1989. *Water Pollution Biology. A Laboratory/Field Handbook*. Technomic Publ. Co.: 107 pp.
- Daube, D.D., D.S. Daly and C.S. Abernathy. 1985. Factors affecting the growth and survival of the Asiatic clam, *Corbicula* sp. under controlled laboratory conditions. In: R.D. Cardwell, R. Purdy and R.C. Bahner (Eds.). *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. ASTM STP 854: 134-144.
- Davis, J.C. 1977. Standardization and protocols of bioassays - their role and significance for monitoring research and regulatory usage. In: W.R. Parker, E. Pessah, P.G. Wells and G.F. Westlake (Eds.). *Proceedings of the 3rd Aquatic Toxicity Workshop*. Environmental Protection Service Report, Halifax, Nova Scotia, Canada. EPS-5-AR-77-1: 1-14.
- Dawson, D.A., E.F. Stebler, S.L. Burks and J.A. Bantle. 1988. Evaluation of the developmental toxicity of metal-contaminated sediments using short-term fathead minnow and frog embryo-larval assays. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7: 27-34.
- Diaz, R.J. 1992. Ecosystem Assessment Using Estuarine and Marine Benthic Community Structure. In: G.A. Burton (Ed.). *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publ.: 67-85.
- Dickson, K.L. and J.H. Rodgers, Jr. 1985. Assessing the hazards of effluents in the aquatic environment. In: H.L. Bergman, R.A. Kimerle and A.W. Maki (Eds.). *Environmental Hazard Assessment of Effluents*. Pergamon Press, Elmsford, N.Y.: 209-215.
- Dickson, K.L., A.W. Maki and W.A. Brungs (Eds.). 1987. *Fate and Effects of Sediment-bound Chemicals in Aquatic Systems*. Pergamon Press, New York: 445 pp.
- Durhan, E.J., T.J. Norberg-King, L.P. Burkhard, G.T. Ankley, M.T. Lukaszewicz, M.K. Schubauer – Berigan and J.A. Thompson. 1993. *Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase II toxicity identification procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity*. EPA, Washington D.C. EPA/600/R-92/080.
- ECETOC. 1993. *Aquatic Toxicity Data Evaluation*. ECETOC: 64 pp.
- ECETOC. 1995. *The Role of Bioaccumulation in Environmental Risk Assessment: The Aquatic Environment and Related Food Webs*. ECETOC: 128 pp.
- Elnabarawy, M.T., R.R. Robideau and S.A. Beach. 1988. Comparison of three rapid toxicity test procedures: Microtox, Polytox and activated sludge respiration inhibition. *Tox. Assess.*, 3: 361-370.
- Ford, J. 1989. The effects of chemical stress on aquatic species composition and community structure. In: S.A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly and K.D. Kimball (Eds.). *Ecotoxicology: Problems and Approaches*. Springer-Verlag: 99-144.
- Förstner, U. 1990. Inorganic Sediment Chemistry and Elemental Speciation. In: Baudo R., Giesy J. and Muntau H. *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants*. Lewis Publ.: 61-105.
- Fossi, M.C. 2000. *Biomarkers. Strumenti di diagnosi e prognosi ambientale*. Rosini Editrice: 134 pp.
- Foulkes, E.C. (Ed.). 1982. *Biological Roles of Metallothionein*. Elsevier: 327 pp.

- Gearing, J.N. 1989. The role of aquatic microcosms in ecotoxicologic research as illustrated by large marine systems. In: S.A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly and K.D. Kimball (Eds.). *Ecotoxicology: Problems and Approaches*. Springer-Verlag: 411-472.
- Ghetti, P.F. 1997. Indice Biotico Esteso (I.B.E.). *I macroinvertebrati nel controllo della qualità degli ambienti di acque correnti*. Provincia Autonoma di Trento: 222 pp.
- Giesy, J.P. and P.M. Allred. 1985. Replicability of aquatic multispecies test systems. In: J. Cairns, Jr. (Ed.). *Multispecies Toxicity Testing*. Pergamon Press, New York: 187-247.
- Giesy, J.P. and R.A. Hoke. 1989. Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design. *J. Great Lakes Res.*, 15: 539-569.
- Giesy, J.P. and Hoke R.A. 1990. Freshwater Sediment Quality Criteria: Toxicity Bioassessment. In: Baudo R., Giesy J. and Muntau H. *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants*. Lewis Publ.: 265-348.
- Giesy, J.P., C.J. Rosiu, R.L. Graney and M.G. Henry. 1990. Benthic invertebrate bioassays with toxic sediment and pore water. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9: 23-248.
- Giesy, J.P., R.L. Graney, J.L. Newsted, C.J. Rosiu, A. Benda, R.G. Kreis, Jr. and F.J. Horvath. 1988a. Comparison of three sediment bioassay methods using Detroit River sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7: 483-498.
- Giesy, J.P., C.J. Rosiu, R.L. Graney, J.L. Newsted, A. Brenda, R.G. Kreis, Jr. and F.J. Horvath. 1988b. Toxicity of Detroit River sediment interstitial water to the bacterium, *Photobacterium phosphoreum*. *J. Great Lakes Res.*, 14: 502-513.
- Gillett, J.W. 1989. The role of terrestrial micorcosms and mesocosms in ecotoxicological research. In: S.A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly and K.D. Kimball (Eds.). *Ecotoxicology: Problems and Approaches*. Springer-Verlag: 367-410.
- Henry, M.G. and G.J. Atchinson. 1991. Metal Effects on Fish Behavior – Advances in Determining the Ecological Significance of Responses. In: M.C. Newman and A.W. McIntosh (Eds.). *Metal Ecotoxicology. Concepts & Applications*. Lewis Publ.: 131-143.
- Herricks, E.E., D.J. Schaeffer and J.A. Perry. 1989. Biomonitoring: closing the loop in the environmental sciences. In: S.A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly and K.D. Kimball (Eds.). *Ecotoxicology: Problems and Approaches*. Springer-Verlag: 351-366.
- Hoke, R.A., J.P. Giesy, G.T. Ankley, J.L. Newsted and J.R. Adams. 1990. Toxicity of sediments from Western Lake Erie and the Maumee River at Toledo, Ohio, 1987: Implications for current dredged material disposal practices. *J. Great Lakes Res.*, 16: 457-470.
- Horning, C.E. 1980. *Use of Aquatic Oligochaete, Lumbriculus variegatus, for Effluent Biomonitoring*. U.S. Environmental Protection Agency, Environ. Res. Brief. EPA-600/D-80-005.
- Ingersoll, C.G., T. Dillon and G.R. Biddinger (Eds.). 1997. *Ecological Risk Assessment of Contaminated Sediments*. SETAC Special Publication: 389 pp.
- ISTAT. 1984. *Statistiche Ambientali*. ISTAT, Roma: Vol. 1, 140 pp.
- Jones, R.A. and G.F. Lee. 1978. *Evaluation of the Elutriate Test as a Method of Predicting Contaminant Release During Open Water Disposal of Dredged Sediment and Environmental Impact of Open Water Dredged Material Disposal. Volume I: Discussion*. U.S. Army Corps of Engineers, Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS. Technical Report D78-45.
- Jørgensen, S.E., S.N. Nielsen and L.A. Jørgensen. 1991. *Handbook of Ecological Parameters and Ecotoxicology*. Elsevier: 1263 pp.
- Keilty, T.J., D.S. White and P.F. Landrum. 1988. Short-term lethality and sediment avoidance assays with endrin-contaminated sediment and two oligochaetes from Lake Michigan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 17: 95-101.
- Klaverkamp, J.F., M.C. Dutton, H.S. Majewski, R.V. Hunt and L.J. Wesson. 1991. Evaluating the Effectiveness of Metal Pollution Controls in a Smelter by Using Metallothionein and Other

- Biochemical Responses. In: M.C. Newman and A.W. McIntosh (Eds.). *Metal Ecotoxicology. Concepts & Applications*. Lewis Publ.: 33-64.
- Knight, A.W. 1984. *The evaluation of contaminated sediments employing selected benthic freshwater invertebrates*. Final Report of the USEPA Cooperative Agreement No. CR-808424. University of California, Davis, CA. USEPA, Environmental Research Laboratory, Corvallis, OR.
- Kramer, K.J., H.A. Jenner and D. de Zwart. 1989. The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia*, 188/189: 433-443.
- La Point, T.W. and J.F. Fairchild. 1992. Evaluation of Sediment Contaminant Toxicity: The Use of Freshwater Community Structure. In: G.A. Burton (Ed.). *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publ.: 87-110.
- Lee, G.F., R.A. Jones, F.Y. Saleh, G.M. Mariani, D.H. Homer, S.S. Butler and P. Bandyopadhyay. 1978. *Evaluation of the Elutriate Test as a Method of Predicting Contaminant Release During Open Water Disposal of Dredged Sediment and Environmental Impact of Open Water Dredged Material Disposal. Volume II: Data Report*. U.S. Army Corps of Engineers, Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS. Technical Report D78-45.
- Lee, H. II. 1992. Models, Muddles, and Mud: Predicting Bioaccumulation of Sediment-Associated Pollutants. In: G.A. Burton (Ed.). *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publ.: 267-293.
- Levin, S.A., M.A. Harwell, J.R. Kelly and K.D. Kimball (Eds.). 1989. *Ecotoxicology: Problems and Approaches*. Springer-Verlag: 547 pp.
- Levine, S. N. 1989. Theoretical and methodological reasons for variability in responses of aquatic ecosystem processes to chemical stresses. In: S.A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly and K.D. Kimball (Eds.). *Ecotoxicology: Problems and Approaches*. Springer-Verlag: 145-179.
- Loeb, S.L. and A. Spacie (Eds.). 1994. *Biological monitoring of aquatic systems*. Lewis Publ.: 381 pp.
- Mac, M.J. and C.J. Schmitt. 1992. Sediment Bioaccumulation Testing with Fish. In: G.A. Burton (Ed.). *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publ.: 295-311.
- Mac, M.J., G.E. Noguchi, R.J. Hesselberg, C.D. Edsall, J.A. Shoesmith and J.D. Bowker. 1990. A bioaccumulation bioassay for freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9: 1405-1414.
- Malins, D.C. and G.K. Ostrander (Eds.). 1994. *Aquatic Toxicology. Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publ.: 539 pp.
- Malueg, K.W., G.S. Schuytema, J.H. Gakstatter and D.F. Krawczyk. 1983. Effect of *Hexagenia* on *Daphnia* response in sediment toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2: 73-82.
- Marcomini, A., Altissimo L., Beretta G.P., Conio O., Francani V., Meucci L., Navazio G., Riganti V. e Zavatti A. 1995. La difesa dell'acqua potabile. In: Bertini I., Cipollini R. & Tundo P. (a cura di). *La protezione dell'ambiente in Italia*. Società Chimica Italiana: 403-477.
- Matis, J.H., T.H. Miller and D.M. Allen. 1991. Stochastic Models of Bioaccumulation. In: M.C. Newman and A.W. McIntosh (Eds.). *Metal Ecotoxicology. Concepts & Applications*. Lewis Publ.: 171-206.
- McIntyre, A.D. 1984. What happened to biological effects monitoring? *Mar. Pollut. Bull.*, 15: 391-392.
- Miller, W.E., S.A. Peterson, J.C. Greene and C.A. Callahan. 1985. Comparative toxicology of laboratory organisms for assessing hazardous waste sites. *J. Environ. Qual.*, 14: 569-574.
- Moriarty, F. 1983. *Ecotoxicology. The Study of Pollutants in Ecosystems*. Academic Press: 289 pp.
- Mount, D.J., T.J. Norberg-King, G.T. Ankley, L.P. Burkhard, E.J. Durham, M.K. Schubauer – Berigan and J.A. Thompson. 1993. *Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase III toxicity confirmation procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity*. EPA, Washington D.C. EPA/600/R-92/081.
- Mouvet, C. 1989. *Utilisation des mousses aquatiques pour la surveillance de la pollution des milieux aquatiques par les métaux lourds et les micropolluants organiques*. Lab. Ecologie, Univ. Metz: 149 pp.

- Mudroch, A. and S.D. MacKnight. 1991. *Handbook of Techniques for Aquatic Sediment Sampling*. CRC Press: 210 pp.
- Munawar, M., I.F. Munawar and G.G. Leppard. 1989. Early warning assays: an overview of toxicity testing with phytoplankton in the North American Great Lakes. *Hydrobiologia*, 188/189: 237-246.
- Munawar, M., O. Hänninen, S. Roy, N. Munawar, L. Kärenlampi and D. Brown. 1995. *Bioindicators of environmental health*. SBP Academic Publ.: 265 pp.
- Naylor, C. and C. Rodrigues. 1995. Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere*, 31: 3291-3303.
- Nebeker, A.V. and C.E. Miller. 1988. Use of the amphipod crustacean *Hyalella azteca* for freshwater and estuarine sediment toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7: 1027-1033.
- Nebeker, A.V., J.K. McCrady, R.M. Shar and C.K. McAuliffe. 1983. Relative sensitivity of *Daphnia magna*, rainbow trout and fathead minnows to endosulfan. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2: 69-72.
- Nebeker, A.V., M.A. Cairns, J.H. Gakstatter, K.W. Malueg, G.S. Schuytema and D.F. Krawczyk. 1984. Biological methods for determining the toxicity of contaminated freshwater sediments to invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 3: 617-630.
- Nebeker, A.V., S.T. Onjukka, M.A. Cairns and D.F. Krawczyk. 1986. Survival of *Daphnia magna* and *Hyalella azteca* in cadmium spiked water and sediment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 5: 993-938.
- Newman, M.C. and M.G. Heagler. 1991. Allometry of Metal Bioaccumulation and Toxicity. In: M.C. Newman and A.W. McIntosh (Eds.). *Metal Ecotoxicology. Concepts & Applications*. Lewis Publ.: 91-130.
- Odum, E.P. 1984. The mesocosm. *Bioscience*, 34: 558-562.
- Oliver, B.A. 1985. Desorption of chlorinated hydrocarbons from spiked and anthropogenically contaminated sediments. *Chemosphere*, 14: 1087-1106.
- Power, E.A. and P.M. Chapman. 1992. Assessing Sediment Quality. In: Burton G.A. (Ed.). *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publ.: 1-18.
- Prater, B.L. and M. Anderson. 1977. A 96-hr sediment bioassay of Duluth and Superior harbor basins using *Hexagenia limbata*, *Asellus communis*, *Daphnia magna* and *Pimephales promelas* as test organisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 13: 159-169.
- Rawson, D.M., A.J. Willmer and M.F. Cardosi. 1987. The development of whole cell biosensors for on-line screening of herbicide pollution of surface waters. *Tox. Assess.*, 2: 325-340.
- Reynoldson, T.B. and M.A. Zarull. 1989. The biological assessment of contaminated sediments - the Detroit River example. *Hydrobiologia*, 188/189: 463-476.
- Rossi, D., R. Baudo, M. Beltrami, M. Contesini e A. Pranzo. 1998. Valutazione della tossicità dei sedimenti del Lago d'Orta mediante esposizione di organismi *in situ* e test di laboratorio. *Acqua Aria*, 6/98: 105-115.
- Salomons, W., N.M. de Rooij, H. Kerdijk and J. Bril. 1987. Sediments as a source for contaminants. *Hydrobiologia*, 149: 13-30.
- Sasson-Brickson, G. and G.A. Burton, Jr. 1991. *In situ* and Laboratory Sediment Toxicity Testing with *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10: 201-201.
- Schloesser, D.W. 1988. Zonation of mayfly nymphs and caddisfly larvae in the St. Marys River. *J. Great Lakes Res.*, 14: 227-233.
- Schuytema, G.S., P.O. Nelson, K.W. Malueg, A.V. Nebeker, D.F. Krawczyk, A.K. Ratcliff and J.H. Gakstatter. 1984. Toxicity of cadmium in water and sediment to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 3: 293-308.
- SETAC-Europe. 1991. Guidance document on *Testing Procedures for Pesticides in Freshwater Static Mesocosms*. Workshop 3-4 July 1991, Monks Wood Exp. St., UK.
- Skalski, C., R. Fisher and G.A. Burton, Jr. 1990. An *In situ* Interstitial Water Toxicity Test Chamber. Abstr. Annu. Meet. SETAC, Arlington, VA. P058, p. 132.

- Snyder-Conn, E. 1993. *In Situ Toxicity Testing with Locally Collected Daphnia*. U.S. Dept. Interior, Fish and Wildlife Service, Biol. Rep. 15: 14 pp.
- Suedel, B.C. and J.H. Rodgers, Jr. 1994. Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175.
- Suedel, B.C., E. Deaver and J.H. Rodgers, Jr. 1996. Formulated sediments as a reference and dilution sediment in definitive toxicity tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 30: 47-52.
- Tessier, A. and P.G.C. Campbell. 1987. Partitioning of trace metals in sediments: relationships with bioavailability. *Hydrobiologia*, 149: 43-52.
- USEPA. 1991. *Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase I toxicity characterization procedure*. EPA, Washington D.C., 2nd Ed. EPA/600/6-91/003.
- Vighi, M. e S. Calamari. 1996. Indici e scale di impatto ecotossicologico. In: R. Vismara e A. Zavatti (a cura di). *Indicatori e scale di qualità*. Pitagora Editrice Bologna: 353-364.
- Walsh, G.E., D.E. Weber, L.K. Brashers and T.L. Simon. 1990. Artificial sediment for use in tests with wetland plants. *Environ. Exp. Botany*, 30: 391-396.
- Walsh, G.E., D.E. Weber, L.K. Esry, M.T. Nguyen, J. Noles and B. Albrecht. 1992. Synthetic substrata for propagation and testing of soil and sediment organisms. *Pedobiologia*, 36: 1-10.
- Ward, T.J. and P.C. Young. 1984. Effects of metals and sediment particle size on the species composition of the epifauna of *Pinna bicolor* near a lead smelter, Spencer Gulf, South Australia. *Est. Coast. Shelf Sci.*, 18: 79-95.
- Weinstein, D.A. and E.M. Birk. 1989. The effects of chemicals on the structure of terrestrial ecosystems: mechanisms and patterns of change. In: S.A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly and K.D. Kimball (Eds.). *Ecotoxicology: Problems and Approaches*. Springer-Verlag: 181-209.
- Wentzel, R., A. McIntosh and G. Atchison. 1977. Sublethal effects of heavy metals contaminated sediment on midge larvae (*Chironomus tentans*). *Hydrobiologia*, 56: 153-156.
- Widdows, J., D.K. Phelps and W. Galloway. 1981. Measurement of physiological condition of mussels transplanted along a pollution gradient in Narragansett Bay. *Mar. Environ. Res.*, 4: 181-194.