



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Ambientali
ordinamento ex D.M. 270/2004

Tesi di Laurea Magistrale

**Valutazione degli effetti tossici dei
pesticidi methiocarb ed imidacloprid nei
confronti dei crostacei di elevata
rilevanza ecologica per gli ambienti
estuarini**

Relatore

Dott. Marco Picone

Laureando

Andrea Bertocco

Matricola 866988

Anno Accademico

2018 / 2019

ABSTRACT

Il carbammato metiocarb (MET) e il neonicotinoide imidacloprid (IMI) sono contaminanti emergenti i cui effetti negli ecosistemi estuari sono stati scarsamente studiati negli ultimi anni, nonostante la crescente preoccupazione per la loro presenza mondiale nelle acque superficiali e nella biota. Gli effetti di questi composti sui crostacei sono stati ampiamente studiati negli ecosistemi di acqua dolce, mentre i dati relativi alle specie marine ed estuarine sono scarsi, sebbene siano particolarmente vulnerabili agli effetti neurotossici esercitati da questi pesticidi. Nella presente tesi, l'attenzione è stata focalizzata su due specie di crostacei che occupano una posizione chiave sulla rete trofica della laguna di Venezia: l'anfipode bentonico *Monocorophium insidiosum* e il copepode calanoide nectonico *Acartia tonsa*. Gli effetti indotti dal MET e dall'IMI nei confronti degli anfipodi sono stati valutati usando un'esposizione acuta (96 ore) di giovani adulti di *M. insidiosum* a una serie di concentrazioni di pesticida. Per quanto riguarda i copepodi, gli effetti acuti sono stati valutati dopo un'esposizione di 48-h di adulti in fase riproduttiva, mentre le alterazioni dello sviluppo larvale sono state valutate esponendo le uova di *A. tonsa* all'aumento della concentrazione di tossici e misurando il rapporto naupli:copepoditi dopo 5 giorni di esposizione (test LDR di sviluppo larvale). In entrambi i casi, l'esposizione è stata eseguita a 20° C, utilizzando un fotoperiodo buio:luce di 16:8. Imidacloprid è risultato relativamente non tossico nei confronti degli anfipodi, con effetti rilevabili solamente a concentrazioni maggiori di 1 mg L⁻¹, mentre il methiocarb ha esercitato effetti significativi a concentrazioni inferiori a 100 µg L⁻¹. Gli anfipodi hanno mostrato una maggiore sensibilità al methiocarb rispetto ai copepodi, mentre i copepodi si sono dimostrati considerevolmente più sensibili a imidacloprid rispetto a *M. insidiosum*.

Sommario

ABSTRACT.....	2
Introduzione	5
I pesticidi emergenti.....	6
Imidacloprid.....	9
Methiocarb	10
Gli indicatori utilizzati	11
Uso degli anfipodi come indicatori.....	11
Uso dei copepodi come indicatori.....	12
Scelta di <i>Acartia tonsa</i> come bioindicatore	13
Impiego delle due specie nel presente lavoro	14
Materiali e metodi	16
Preparazione delle soluzioni dei pesticidi e delle diluizioni	16
Procedura del test di mortalità con <i>M. insidiosum</i>	17
Principio del saggio.....	17
Campionamento degli anfipodi.....	18
Allestimento vasche di stabulazione	18
Esecuzione del test	19
Programma di QA/QC	21
Espressione del risultato.....	22
Test di mortalità 48 h con <i>A. tonsa</i>	22
Principio del saggio.....	22
Origine degli organismi	22
Esecuzione del test	23
Programma di QA/QC	23
Espressione del risultato.....	24
Test di sviluppo larvale (LDR) con <i>A. tonsa</i>	24
Origine degli organismi	25
Fasi pre-test.....	26
Esecuzione del test.....	26
Procedura di QA/QC.....	27
Espressione del risultato.....	27
Risultati e discussione.....	29
Controllo di qualità dei dati (QA/QC)	29
Test acuto con <i>M. insidiosum</i>	29
Test acuto con <i>A. tonsa</i>	30

Test LDR con <i>A. tomsa</i>	31
Dati sperimentali su Imidacloprid e Methiocarb.....	31
Test acuto con <i>M. insidiosum</i>	33
Test acuto con <i>A. tomsa</i>	34
Test LDR con <i>A. tomsa</i>	35
Confronto tra indicatori.....	36
Possibili effetti sulla rete trofica	39
Conclusioni	41
Bibliografia	42
Appendice	48
Dati grezzi dei test su methiocarb con <i>M. insidiosum</i>	48
Dati grezzi dei test su imidacloprid con <i>M. insidiosum</i>	49
Dati grezzi dei test acuti a 24-h con <i>A. tomsa</i>	50
Dati grezzi dei test acuti a 48-h con <i>A. tomsa</i>	51
Dati grezzi del test LDR con <i>A. tomsa</i>	52
Analisi della varianza condotta sui dati del test LDR con <i>A. tomsa</i>	53

Introduzione

Al giorno d'oggi, conducendo varie analisi ambientali sulle acque, in particolare quelle salate o di ambienti di transizione, ci si può accorgere che tutte le acque superficiali del pianeta risultano essere più o meno inquinate, con i conseguenti rischi ambientali non solo per l'uomo, ma anche per le specie animali e vegetali che vivono nei suddetti ambienti (Geissen, 2015).

Un enorme numero di persone vive ancora in mancanza di servizi sanitari, ovvero di fognature, e i reflui urbani possono venir scaricati direttamente in acque superficiali senza alcun tipo di trattamento.

Questo è uno dei motivi per cui alcune analisi hanno riscontrato la presenza di più di 700 sostanze, tra contaminanti emergenti, loro metaboliti e prodotti di degradazione nelle acque europee, andando tutto questo a costituire un importante problema ambientale.

Molto spesso, infatti, i contaminanti direttamente immessi in ambiente vengono degradati secondo processi naturali, come per esempio attraverso reazioni con ozono e radicali in atmosfera: talvolta i prodotti di degradazione possono essere ancora più tossici delle sostanze da cui derivano (Cruz-Alcade, 2017).

Le classi principali che sono state finora individuate sono state: farmaceutici, pesticidi, prodotti per disinfezione, conservanti per legno e prodotti chimici industriali (Geissen, 2015). Naturalmente le diverse classi sono associate a differenti tipi di inquinamento, che vengono divisi in puntuali (urbano ed industriale) e diffuso (agricoltura): questo comporta che alcuni contaminanti vengano immessi in ambiente in un unico punto ma in quantità massicce (fonte puntuale), o in relativamente piccole quantità rispetto all'area su cui è distribuito, ma su superfici elevate, con immissioni quindi di grandi quantitativi (fonte diffusa).

Appunto, l'agricoltura è una delle fonti principali di contaminanti nelle acque, e spesso gli effetti tossicologici nei confronti di comparti diversi da quello bersaglio di queste stesse fonti non sono ancora del tutto chiari (Geissen, 2015). Questo è uno dei maggiori rischi ambientali per quanto riguarda il settore agricolo, in quanto i prodotti utilizzati per incrementare la produzione spesso risultano pericolosi anche per altri comparti ambientali, producendo importanti danni collaterali.

Un altro dei problemi di queste sostanze è che talvolta possono risultare comportarsi in modo multicompartimentale, cioè possono essere presenti in diversi comparti ambientali: la loro presenza può quindi essere vista nelle acque come sul suolo o in atmosfera allo stato gassoso. Tutto ciò rende difficile sia il loro monitoraggio, dal momento che spesso non si hanno abbastanza informazioni sul comportamento chimico della sostanza che si sta analizzando, come anche l'utilizzo e la

determinazione di un limite legislativo specifico. Ogni contaminante, poi, tende a comportarsi in maniera differente, e si hanno poche informazioni riguardo al loro trasporto da un comparto all'altro, anche se è documentata l'esistenza di alcuni modelli matematici (Geissen, 2015).

Molte sono tuttavia le difficoltà per quanto riguarda il confronto tra le concentrazioni in ambiente e quelle che effettivamente danno tossicità nei confronti degli organismi, e lo stesso accade nel determinare le Predicted No-Effect Concentration (PNEC) degli organismi, ovvero la concentrazione di una sostanza al di sotto della quale è prevedibile non ci siano effetti nocivi sull'ambiente. Per ottenere queste informazioni vengono impiegati molto spesso metodologie avanzate di analisi e previsioni come le metodologie Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) (Geissen, 2015).

Tuttavia, questi studi necessitano di essere accompagnati da metodi di prioritizzazione, utili ad identificare i pericoli di questi composti di trasformazione e metaboliti nei confronti delle sostanze di origine (Geissen, 2015), in modo da capire se i maggiori pericoli ed effetti dannosi per l'ambiente derivino dall'una o dall'altra sostanza, oppure da un altro contaminante ancora presente in ambiente.

Tutto questo attualmente viene codificato da due importanti documenti: il regolamento REACH a livello europeo, che registra, valuta, autorizza e limita l'uso di sostanze chimiche in presenza di acque superficiali nelle vicinanze, e la Water Framework Directive (Direttiva 2000/60/CE), che fa questo in maniera ancor più diffusa e capillare.

I pesticidi emergenti

Negli ultimi anni si è assistito nel campo agricolo, ma non solo, ad un'evoluzione dei mezzi di controllo delle "pests", ovvero dei fattori biologici che danneggiano la produzione agricola in vario modo: tra queste troviamo piante infestanti, funghi ed insetti dannosi per esempio. Anche in altri ambiti, diversi da quello agricolo, si è assistito all'introduzione di composti il cui impiego intensivo comporta un notevole rischio ambientale, di cui ci si è accorti solo negli ultimi anni. Qui sono coinvolte categorie di sostanze come prodotti farmaceutici e veterinari, ma anche composti legati alla produzione ed allo smaltimento di schermi solari, antibiotici e molto altro: tutti questi vengono generalmente chiamati "contaminanti emergenti". Tuttavia, dal momento che questo lavoro è focalizzato su due pesticidi, si farà in seguito riferimento a questa classe.

Ovviamente, la maggior parte di questi composti è di origine artificiale, cioè creati per via chimica dall'uomo, il che comporta un ulteriore rischio per l'ambiente per la maggior probabilità che non esista una via di degradazione naturale rapida.

L'utilizzo di quantità sempre più consistenti di questi composti in agricoltura, legato all'insorgere di resistenza ai pesticidi convenzionali nelle specie target ed alla necessità di ottenere produzioni sempre più alte dalle colture, ha comportato un forte aumento di queste sostanze sulla superficie dei campi e quindi nelle acque di dilavamento e nei fiumi, direttamente collegati poi alle acque della nostra Laguna e degli ambienti di transizione in generale.

Infatti, i fiumi funzionano come collettori delle sostanze che vengono raccolte lungo il loro corso in pianura. Le sostanze che generalmente vengono utilizzate, talvolta in eccesso, in agricoltura, vengono dilavate dalle acque meteoriche e portate fino alle acque di falda o all'interno dei fiumi, che raccolgono in questo modo tutte le sostanze chimiche e gli inquinanti trasportandoli con il loro corso. Quando poi questi corsi d'acqua sfociano in Laguna, o più in generale in un ambiente di transizione, avendo caratteristiche di salinità intermedie tra quello marino e quello fluviale, oltre a caratteristiche ecologiche, di salinità e granulometria dei sedimenti particolari, i contaminanti trasportati tendono ad accumularsi: ciò succede perché il ricambio d'acqua nella laguna di Venezia, ad esempio, è limitato alle tre bocche di porto esistenti (Lido, Malamocco, Chioggia). Essa ha una superficie di circa 550 km², ed è la più grande laguna presente in Italia, ricevente acqua da alcuni corsi d'acqua come il Dese, Marzenego, Naviglio del Brenta (Bettiol et al., 2005).

Essendo la Laguna di Venezia un ambiente piuttosto confinato e con scarso ricircolo, essa stessa diventa un ambiente critico per quanto riguarda l'accumulo di queste sostanze nelle acque. Diversi studiosi hanno cominciato ad interrogarsi recentemente sulle conseguenze dell'introduzione di sostanze in grado di alterare l'ambiente, ora che con la problematica imminente del riscaldamento globale e dello scioglimento dei ghiacci, si pone una nuova attenzione sulle condizioni di ecosistemi particolarmente instabili e delicati, nonché unici, come quello della Laguna di Venezia, che potenzialmente sono quelli che possono essere maggiormente colpiti e danneggiati.

Bisogna specificare che al giorno d'oggi non esiste ancora una definizione precisa e riconosciuta di "contaminante emergente". Appunto perché sostanze di nuova generazione, e data la continua introduzione di composti differenti ed innovativi, è difficile dare effettivamente una definizione di cosa sia un "contaminante emergente", dal momento che non si tratta di una classe precisa di prodotti, ma solo una classificazione generale per sostanze relativamente nuove e di difficile collocamento all'interno di altri gruppi.

In altre parole, i contaminanti emergenti non sono sostanze univocamente attribuibili ad una categoria in base ad un preciso gruppo funzionale nella loro struttura chimica, ma piuttosto comprendono diversi composti che presentano differenti strutture chimiche, ma hanno una discreta tossicità e possono creare problemi a livello ambientale. Si tratta quindi di una classificazione

pratica, piuttosto che una di tipo funzionale o standard. Di conseguenza, avendo diverse composizioni chimiche, non hanno un univoco meccanismo d'azione, ma anzi, tendono ad avere ognuno un meccanismo diverso dalle altre sostanze.

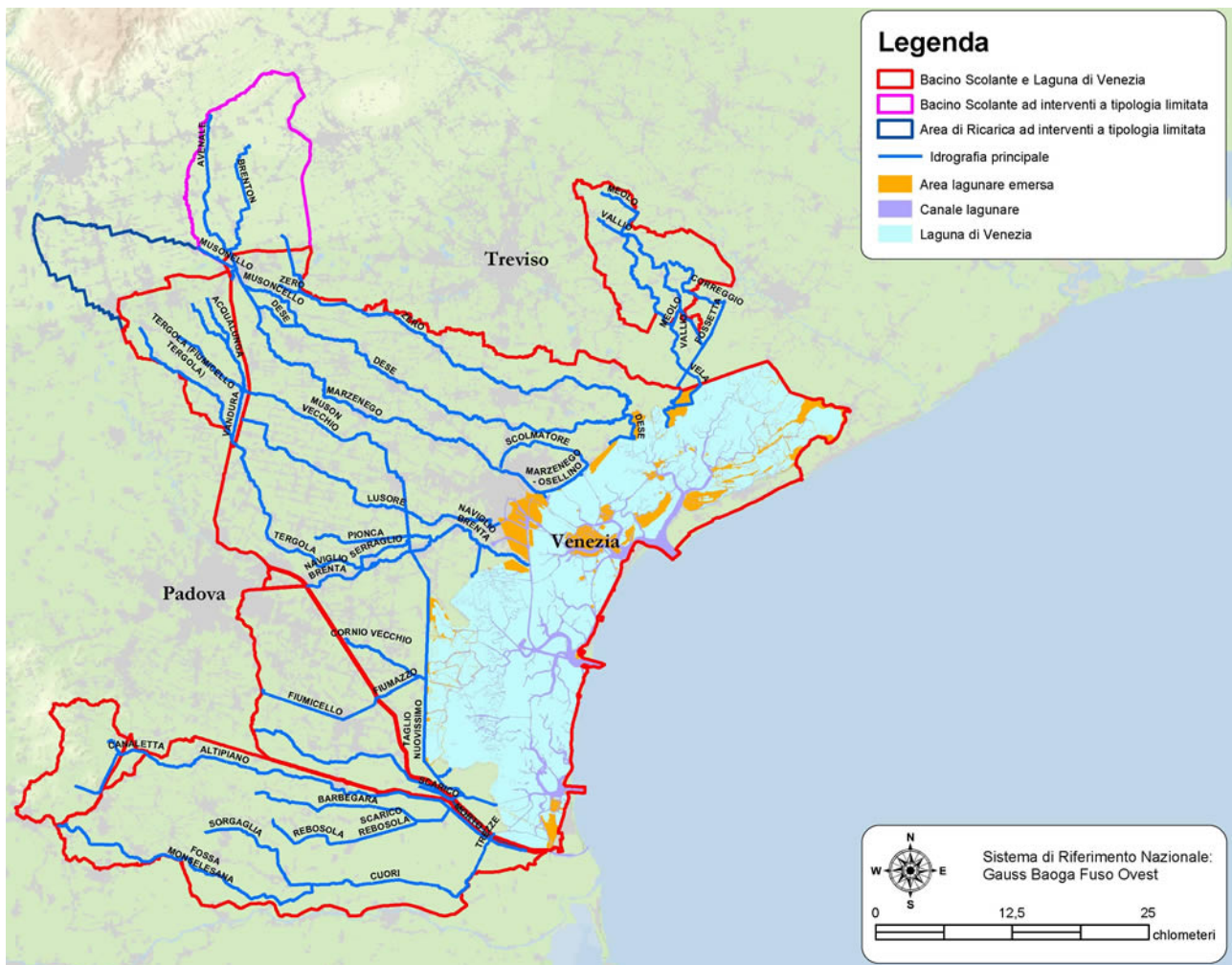


Figura 1. Reticolo fluviale scolante in laguna di Venezia con relativi bacini idrografici (cartina da Arpav)

Questo problema porta ad un'altra questione: come non esiste una vera e propria definizione di "contaminante emergente", allo stesso modo non esistono nemmeno protocolli standard e metodologie per l'analisi e la determinazione di soglie di tossicità univoche applicabili in ogni luogo del pianeta; inoltre, non esistono nemmeno leggi in grado di regolare e fornire dei limiti alla presenza di questi composti in ambiente.

Inoltre, per conformazione geografica, essendo provvista di isole barriera e avendo solo tre bocche di porto, la laguna di Venezia è provvista anche di uno scarso ricircolo d'acqua, come prima accennato, ed è quindi maggiormente soggetta all'accumulo ed all'azione tossica dei contaminanti. Inoltre, essendo un ecosistema di transizione, risulta essere un ambiente particolarmente importante da conservare, ed altrettanto delicato dal punto di vista degli equilibri al suo interno: basta infatti

l'introduzione di una sostanza per sbilanciare il suddetto equilibrio e causare dei danni importanti all'intero ecosistema.

In questo lavoro verranno analizzati gli effetti di due particolari pesticidi, che al giorno d'oggi vengono usati in modo abbastanza diffuso, ovvero l'Imidacloprid ed il Methiocarb.

Imidacloprid

Tra i pesticidi emergenti senza alcun dubbio più pericolosi per gli ambienti di transizione troviamo i neonicotinoidi: essi sono principalmente utilizzati come insetticidi, in particolare come prodotti ad azione sistemica (Wood and Goulson, 2017). Sono quindi sostanze che vengono assimilate dai vegetali e fungono da protezione contro gli insetti che le infestano, agendo da dentro il vegetale stesso.

Solitamente questi composti vengono applicati o in trattamenti presemina, o in campo, con l'effetto collaterale in quest'ultimo caso di dare anche notevoli effetti tossici su insetti utili quali gli impollinatori.

Essendo sostanze solitamente ad ampio spettro d'azione, non solo possono agire, come appena detto, sugli insetti target, ma potenzialmente anche su organismi non target, compresi gli organismi acquatici con fisiologia simile agli insetti.

Molto spesso sono contaminanti di cui si possono ritrovare residui nel nettare, nel polline e nei semi delle piante trattate, dal momento che hanno anche un tempo di emivita lungo, essendo persistenti: questo va ad influenzare come detto anche insetti utili quali gli impollinatori, ma anche alcune attività dell'uomo come la raccolta del miele, legata appunto agli impollinatori come le api.

La presenza di questi contaminanti a livello dei semi delle piante e la loro persistenza li rende pericolosi anche per gli uccelli granivori, ed è questo il motivo per cui si vedono sempre meno passeriformi nelle nostre campagne, agendo sui meccanismi di formazione dei gusci delle uova impedendo la calcificazione, come accade con i neonicotinoidi.

Recenti lavori, tuttavia, hanno evidenziato una bassa efficacia da parte di queste sostanze sui molluschi, che risultano quindi poco colpiti (Pisa et al., 2015): potrebbero però essere colpite altre classi di organismi acquatici, e poiché non esistono informazioni su organismi tipici delle aree costiere ed estuarine, si è condotto questo lavoro sperimentale.

Tra i neonicotinoidi, uno dei principi attivi di maggiore impiego è l'imidacloprid. La sua tossicità è dovuta alla presenza di due anelli eterociclici aromatici alogenati, per cui particolarmente reattivi; inoltre è presente anche un gruppo nitriliminico che ne incrementa la reattività. Come prima

accennato, agisce a livello di trasmettitori dell'impulso nervoso, saturando i recettori nicotinici post-sinaptici (nACh-receptor) dell'acetilcolina (ACh).

Esso è un contaminante che viene immesso nel comparto acquoso attraverso il dilavamento delle superfici dei campi, dove viene distribuito e dove è adsorbito dal suolo: tuttavia, la quantità in eccesso, solitamente è facilmente trasportata e dilavata dalle acque meteoriche, che tendono a trasportare il contaminante in questione e a portarlo nei fiumi ed in generale nelle acque superficiali.

Per questo contaminante specifico alcune analisi preliminari hanno fornito un tempo di emivita in ambiente pari a 0,57 anni, il che significa che il contaminante in ambiente resta attivo e può generare effetti tossici per circa sei mesi dopo l'immissione (Wood and Goulson, 2017).

Uno dei pericoli fondamentali dato da questo contaminante è il fatto che sia ampiamente utilizzato in tutto il mondo, e per questo risulta il neonicotinoide maggiormente presente in tutti gli ambienti. La letteratura dimostra che gli effetti tossici dell'imidacloprid non sono limitati agli insetti e ai crostacei (molti dati sono infatti riferiti ai test con *Daphnia magna*), ma si manifestano anche negli uccelli ed in insetti non target come emetteri e larve di coleotteri (Wood and Goulson, 2017).

Methiocarb

Per quanto riguarda il Methiocarb, invece, è un pesticida carbammato che di solito viene usato come repellente per uccelli, come insetticida, acaricida e molluschicida. Presenta il medesimo meccanismo di azione dei pesticidi organofosforici. Una volta entrati negli organismi, infatti, carbammati ed organofosforici agiscono sull'enzima acetilcolinesterasi (AChE), che ha il compito di modulare la trasmissione dell'impulso nervoso idrolizzando l'eccesso di ACh nello spazio intersinaptico e liberando i recettori post-sinaptici. Questi contaminanti si legano covalentemente ed idrolizzano l'enzima AChE, impedendole di modulare la trasmissione dell'impulso nervoso. L'effetto finale è la sovraeccitazione e, alla fine, la morte.

Queste molecole risultano particolarmente efficaci dal momento che presentano le caratteristiche principali utili all'utilizzo di una sostanza come pesticida: sono sostanze specifiche, per cui hanno azione su una sola molecola (in questo caso l'acetilcolinesterasi), legandosi in modo covalente ed irreversibile con questa.

Inoltre, hanno anche un tempo di emivita in ambiente piuttosto lungo, e quindi risultano persistenti, per cui i loro effetti tossici sugli organismi target durano per un lungo periodo di tempo. Questa è una caratteristica fondamentale e ricercata in un composto utilizzato per scopi di controllo di pests specialmente in agricoltura, poiché per minimizzare i costi e ridurre i trattamenti si preferiscono

molecole che risultino efficaci per lunghi periodi di tempo una volta distribuiti i prodotti in campo, diminuendo così il numero di trattamenti necessari e la quantità di prodotto utilizzata, con anche conseguente minor inquinamento.

Per questa serie di motivi, i carbammati risultano tra le sostanze maggiormente impiegate in agricoltura, agendo già a concentrazioni molto basse e presentando le caratteristiche sopra elencate; tuttavia, essendo stati utilizzati in quantità piuttosto ingenti e continuando ad essere impiegati, risulta necessario stabilire limiti di impiego e di presenza in ambiente in modo da non avere fenomeni di tossicità collaterali.

Gli indicatori utilizzati

Gli indicatori biologici che sono stati identificati come target principale dell'attività di tesi sono il crostaceo anfipode *Monocorophium insidiosum* ed il copepode calanoide *Acartia tonsa*.

Questi organismi sono stati utilizzati al fine di determinare sia effetti acuti che subcronici dei due pesticidi Imidacloprid e Methiocarb, utilizzando sia procedure standard (ovvero un test acuto e LDR con i copepodi), sia utilizzando procedure sperimentali non standardizzate messe a punto *ad hoc* per questo lavoro di tesi, in particolare allo scopo di ridurre il quantitativo di scarti e di organismi nei test.

Uso degli anfipodi come indicatori

Tra gli organismi infaunali, che occupano microhabitat al di sotto dell'interfaccia acqua-sedimento e quindi sono più esposti agli inquinanti presenti nel sedimento, sicuramente gli anfipodi sono quelli impiegati più diffusamente e con maggiore frequenza in tutto il mondo (Ingersoll, 1995). Il motivo del loro ampio utilizzo risiede nel fatto che, complessivamente, gli anfipodi soddisfano molti dei criteri richiesti per poter essere utilizzati come indicatore biologico nei saggi di tossicità (Volpi Ghirardini and Pellegrini, 2001). In particolare, gli anfipodi sono caratterizzati da:

- Eccellente rilevanza ecologica (Onorati et al., 1999; Bigongiari et al., 2001);
- Breve ciclo vitale che consente la messa a punto di saggi di tossicità cronica o sub-cronica (USEPA 1992, 2001; Bigongiari et al., 2001);
- Buona capacità discriminatoria verso un'ampia gamma di inquinanti, tra cui composti organici (Reichert et al., 1985; Plesha et al., 1988; Ciarelli et al., 1997; Brown et al., 1999) e metalli pesanti (Erdem and Meadows, 1980; Bryant et al., 1984, 1985 a, b; Bat and Raffaelli, 1998; Bat et al., 1998);
- Facilità di mantenimento in laboratorio e tolleranza alla manipolazione (stress determinati

da campionamento, trasporto e mantenimento in laboratorio) (Bigongiari et al., 2001).

Uno degli anfipodi più utilizzati come indicatori per test di tossicità è *M. insidiosum*, utilizzato soprattutto per test acuti. Questo organismo è un crostaceo strettamente bentonico e caratteristico di aree estuarine, per cui particolarmente indicato per quanto riguarda questo studio, di piccole dimensioni e facile da reperire, in quanto ogni volta che serve l'organismo per fare un test, esso viene campionato direttamente in ambiente (come è stato fatto per questo lavoro). Appunto perché facilmente reperibile in ambienti come la Laguna di Venezia, in quanto caratteristico di aree di transizione come le estuarine, questo organismo si presta benissimo a fungere da indicatore per la qualità dei suddetti ambienti.

L'utilizzo di questi organismi come indicatori nei test ecotossicologici è iniziato negli anni '70 del secolo scorso, in particolare per le sue caratteristiche biologiche ed ecologiche, che rendono questo particolare gruppo di organismi teoricamente perfetto per i test con sostanze quali l'imidacloprid ed il methiocarb.

Viene utilizzato come indicatore perché risulta essere un organismo particolarmente sensibile alla presenza di contaminanti sia in acqua che nel sedimento, reagendo in tempi brevi all'immissione della sostanza in acqua. Inoltre, reagisce in modo proporzionale alla quantità di contaminante presente.

Uso dei copepodi come indicatori

L'impiego di crostacei copepodi adulti come bioindicatori è da molti anni diffuso in tutto il mondo e sono disponibili protocolli standard per eseguire test acuti di mortalità a 48-h o 96-h su sostanze pure, effluenti e acque marine per le principali specie impiegate (*Acartia tonsa* Dana, *Nitocra spinipes* Boeck e *Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco) (ISO, 1999).

In epoca più recente, numerosi gruppi di lavoro hanno sviluppato dei protocolli per test cronici e subcronici su fase liquida con le fasi larvali di copepodi calanoidi (*A. tonsa*) ed arpacticoidi (*N. spinipes*, *T. battagliai*, *Tigriopus japonicus* Mori, *Tigriopus fulvus* Fischer, *Eurytemora affinis* Pope) (Hutchinson et al., 1999 a,b; Andersen et al., 2001; Breiholtz and Bengtsson, 2001; Marcial et al., 2003; Faraponova et al., 2005, Forget-Leray et al., 2005) ed è stata pubblicata una linea guida ASTM (2004) per test semistatico in fase liquida sul ciclo vitale del copepode meiobentonico *Amphiascus tenuiremis* Brady & Robertson.

La scelta è ricaduta su questi *taxa* per le particolari applicazioni cui si prestano e per alcune caratteristiche che li rendono validi organismi da impiegare in saggi di tossicità:

- Sono facilmente allevabili in laboratorio (Wollenberg, 2005);

- Sono particolarmente sensibili a composti organici quali pesticidi ed “endocrine disruptors” (Hutchinson et al., 1999, a,b; Breiholtz et al., 2003; Forget-Leray et al., 2005)
- Possibilità di esecuzione di test acuti, sub-cronici e cronici su matrici acquose e fase solida (Picone et al. 2018);
- Possibilità di utilizzare diversi endpoint (mortalità dei diversi stadi di sviluppo, sviluppo larvale, produzione di uova, dimensioni degli organismi, rapporto tra i sessi).

La specifica sensibilità che gli stadi larvali dei copepodi dimostrano verso gli “endocrine disruptors” e alcuni pesticidi li ha resi di grande interesse per la comunità scientifica, anche se al momento il loro impiego è limitato a test su sostanze pure (Hutchinson et al., 1999 a,b; Breiholtz and Wollenberg, 2003; Breiholtz et al., 2003; Forget-Leray et al., 2005), pur essendo abbastanza agevole l’adattamento del test a matrici ambientali (Picone et al., 2018).

Scelta di *Acartia tonsa* come bioindicatore

Per quanto riguarda questo lavoro sperimentale, l’attenzione è stata rivolta al calanoide pelagico *Acartia tonsa*, diffuso in acque marine ed estuarine di tutto il mondo, inclusa la Laguna di Venezia (Camatti, 2000) dove spesso rappresenta la specie dominante dello zooplancton (Bianchi et al., 2003). Numerose sono le informazioni riguardanti biologia ed ecologia della specie in bibliografia. *A. tonsa* abita acque marine ed estuarine a salinità compresa tra 10 psu e 35 psu, si ciba di microalghe planctoniche e rappresenta un importante anello di congiunzione tra i produttori primari e gli organismi superiori della catena trofica marina, essendo predata da larve di pesci e invertebrati di maggiori dimensioni. Si riproduce per via sessuata e le femmine, sprovviste di sacco ovigero, rilasciano le uova individualmente nella colonna d’acqua; in condizioni controllate in laboratorio, la produzione di uova arriva fino a 60 uova per femmina al giorno a 20°C (Wollenberg, 2005). La specie presenta dimorfismo sessuale ed i principali caratteri sessuali secondari sono:

- Dimensioni: le femmine (1 mm) sono più grandi dei maschi (0.8 mm);
- Forma del corpo: arrotondata nelle femmine, più squadrata nei maschi;
- Antenne: geniculate e ripiegate nei maschi, dritte nelle femmine;
- Urosoma: 4 segmenti nelle femmine, di cui il secondo molto grande e prolungato, 5 nei maschi il cui secondo ha forma arrotondata.

Durante la copulazione i maschi trasferiscono lo sperma riponendo una spermatofora nei pressi del dotto ovigero delle femmine, le quali conservano lo sperma anche dopo l’accoppiamento, cosicché sono in grado di produrre uova fertilizzate per un periodo di tempo relativamente lungo. In condizioni ottimali di temperatura (15-20°C) le uova di *A. tonsa* si schiudono entro 24 ore dal

rilascio e le larve raggiungono lo stadio adulto in un periodo variabile dai 9 ai 20 giorni. Lo sviluppo larvale, prima del primo stadio naupliare possiede tre paia di appendici e ad ogni successiva muta le appendici sviluppano ulteriori *setae* e segmenti. Le copepoditi hanno la stessa forma degli adulti, anche se sono di dimensioni inferiori e con l'addome non completamente segmentato.

Relativamente alle applicazioni in ecotossicologia di *A. tonsa*, un ampio database di dati di tossicità acuta (48-96 h) è disponibile per i metalli (Sosnowski and Gentile, 1978; Sosnowski et al., 1979; Lussier and Cardin, 1985 a,b), microinquinanti organici (Chen, 1991), pesticidi (Thompson, 1989; USEPA, 2000), "endocrine disruptors" (Andersen et al., 2001) ed organostannici (U'Ren, 1983; Bushong, 1988; Kusk and Petersen, 1997).

Meno spazio è dedicato ai test sub-cronici e cronici, i quali sono per altro di recente introduzione in ecotossicologia; il principale protocollo impiegato è quello sviluppato alla Danish Technical University di Lyngby (Kusk and Wollenberg, 2005).

Sono disponibili dati di tossicità su sostanze pure per test su intero ciclo vitale (life-cycle test) e test di sviluppo larvale (Larval Development Test) per organostannici, alcuni pesticidi, sostanze endocrine naturali e di derivazione sintetica ed essenze sintetiche per detersivi (Kusk and Petersen, 1997; Andersen et al., 2001; Wollenberg et al., 2003, 2005; Wollenberg, 2005).

Studi preliminari indicano, inoltre, che test di sviluppo larvale (LDR) e di mortalità degli stadi giovanili (ELS), considerati come endpoints con *A. tonsa*, sono risultati molto più sensibili rispetto ai test standard di mortalità con gli anfipodi, almeno per quanto riguarda alcuni tipi di contaminanti (Picone et al., 2018b).

Impiego delle due specie nel presente lavoro

Le due specie di organismi vengono impiegate nel presente lavoro per due tipologie di test diverso: *M. insidiosum* viene utilizzato per un test a 96 ore di tossicità acuta, mentre *A. tonsa* viene utilizzata per un test acuto a 48 ore con controllo della mortalità anche dopo 24 ore, e per un test di sviluppo larvale, con durata 120 ore, in cui si va a vedere lo scostamento dallo sviluppo ideale degli organismi mediante il rapporto LDR, che verrà spiegato in seguito.

La scelta di effettuare questi due tipi di test garantisce la determinazione di concentrazioni di effetto che possano dare una visione abbastanza generale del comportamento della sostanza in ambiente, comprendendo sia effetti acuti, e quindi a breve termine, che effetti subcronici e relativi ad uno spettro temporale più elevato.

Questi due organismi si prestano molto facilmente a test per la determinazione di LC_{50} ed EC_{50} , che saranno poi l'obiettivo del lavoro, e solitamente è uso comune proprio utilizzarli per questo tipo di studio anche per altre sostanze.

Dalla definizione di questi indici si potrà in seguito dare una valutazione dello stato di salute di ambienti di transizione e costieri quali la Laguna di Venezia, anche per inquinamenti da contaminanti emergenti.

Materiali e metodi

Preparazione delle soluzioni dei pesticidi e delle diluizioni

Le soluzioni madre di contaminante vengono preparate sciogliendo il composto puro allo stato solido in un volume predeterminato di acqua milliQ in un matraccio.

Per quanto riguarda l'Imidacloprid la soluzione è stata preparata pesando 1 mg di sostanza, che si trova allo stato solido (PESTANAL® analytical standard, Sigma-Aldrich, lot#BCBT2267) che viene disciolta con acqua milli-Q in un matraccio da 100 mL portato a volume.

Anche per il Methiocarb (PESTANAL® analytical standard, Sigma-Aldrich, lot#SZBF106XV) la soluzione madre viene preparata pesando 1 mg di sostanza, sciolta poi in un matraccio da 100 mL con acqua MilliQ e poi portato a volume. Per garantire il completo scioglimento del prodotto, è stato utilizzato acetone come solvente, ad una concentrazione del 6%.

Per favorire ulteriormente la dissoluzione dei contaminanti in acqua, questi vengono posti anche in bagno ad ultrasuoni a 30°C per dieci minuti, ripetendo la procedura fino a completa dissoluzione: in questo modo si dovrebbe ottenere una soluzione completamente omogenea di contaminante.

Le soluzioni madre di contaminante vengono poi conservate, sigillate con parafilm, in frigorifero per evitare la degradazione del contaminante disciolto dovuta a fenomeni determinati dalla temperatura. Queste poi vengono riutilizzate per i test seguenti, in modo da uniformare tra loro i dati, avendo utilizzato sempre la stessa soluzione madre per effettuare le diluizioni necessarie, evitando anche il dover ripetere la preparazione della soluzione madre per ogni test, risparmiando in questo modo tempo.

Le diluizioni dei pesticidi a cui esporre gli indicatori vengono effettuate ponendo circa 80 mL di acqua di mare artificiale o Svensk medium in un matraccio da 100 mL, aggiungendo poi l'aliquota di contaminante necessaria per ottenere le concentrazioni desiderati, ed in seguito portando a volume aggiungendo altra acqua di mare standard o Svensk medium.

Le modalità di preparazione dell'acqua marina artificiale e dello Svensk medium sono riportate nei seguenti paragrafi, relativi ai test con anfipodi (acqua marina artificiale; Tabella 1) e copepodi (Svensk medium; Tabella 3).

La soluzione viene agitata sia appena dopo l'aggiunta del contaminante, sia dopo aver portato a volume, in modo da garantire un'ottimale miscelazione del composto che risulta in questo modo il più omogeneo possibile. Questo risulta importante per non avere stratificazioni di densità nella soluzione, affinché, quando la soluzione viene posta all'interno dei pozzetti per il test, non si

verifichi una distribuzione preferenziale del contaminante in questi ultimi, influenzando anche la mortalità degli organismi.

L'impiego dell'acetone come solvente per la preparazione del Methiocarb presuppone la necessità di effettuare un ulteriore controllo (bianco procedurale) consistente nella preparazione di una piastra in cui si testa la tossicità di una soluzione contenente solo acqua di diluizione e il solvente, nella stessa quantità utilizzata nella preparazione della soluzione. In questo modo è possibile riuscire a differenziare le due diverse tossicità, isolando quella determinata univocamente dal contaminante da quella causata dall'acetone. Si ottiene così una sorta di “fattore di correzione”, che nei risultati fa ottenere la tossicità effettiva del contaminante rispetto a quella del solvente.

Procedura del test di mortalità con *M. insidiosum*

Principio del saggio

Il saggio biologico con anfipodi consiste nell'esposizione al campione di acqua con le concentrazioni di contaminanti da analizzare di 5 organismi per replica (per un totale di 6 repliche) per complessive 96 ore (test di tossicità acuta), in condizioni di temperatura e salinità controllate. Al fine di assicurare lo svolgimento del saggio in condizioni standardizzate ed ottimali per gli organismi esposti, all'inizio ed alla fine del test vengono misurati anche temperatura, salinità e pH e si verifica che tali parametri siano collocati entro l'intervallo di accettabilità previsto dal metodo standard di riferimento (ISO, 2005).

Al termine dell'esposizione si verifica il numero di organismi ancora vivi. La risposta degli organismi esposti ai campioni di acqua contaminata da saggiare viene comparata con la risposta degli organismi esposti al controllo negativo, ovvero acqua marina standard ricostituita, secondo norme ASTM:

Tabella 1. Composizione dell'acqua marina artificiale secondo le norme ASTM (ASTM E728-98). Le quantità si intendono da aggiungere per ogni litro di acqua ultrapura utilizzato come diluente. Il medium così ottenuto ha una salinità di 34 ± 1 psu.

Sale	Quantità
SrCl₂ · 6H₂O	20 mg
H₃BO₃	30 mg
KBr	100 mg
KCl	700 mg
CaCl₂ · 2H₂O	1470 mg
Na₂SO₄	4000 mg
MgCl₂ · 6H₂O	10780 mg
NaCl	23500 mg
Na₂SiO₃ · H₂O	20 mg
NaHCO₃	200 mg

Campionamento degli anfipodi

Il campionamento degli anfipodi è stato eseguito il giorno precedente alla messa in posa del test presso il sito di riferimento del Canale di Pordelio, in Laguna Nord (latitudine 45°27'29.96"N, longitudine 12°26'45.38"E) dove sono presenti colonie stabili e periodicamente monitorate di *M. insidiosum*.

Il sedimento superficiale (primi 3-5 cm), raccolto mediante una paletta in modo da non disturbare troppo il campione stesso, è stato setacciato *in situ* utilizzando una pila di due setacci (1000 µm e 500 µm), mantenendo i setacci sempre immersi in acqua per evitare uno stress eccessivo agli organismi. Tutto il materiale trattenuto dal setaccio di maglia 1000 µm è stato scartato, mentre il materiale trattenuto dal setaccio di maglia 500 µm (in cui sono presenti gli organismi di taglia idonea per l'esecuzione del saggio) è stato stoccato provvisoriamente in una vaschetta di PE parzialmente riempita con acqua del sito.

Il protocollo prevede che un'aliquota di sedimento setacciato a secco a 500 µm venga portata in laboratorio per la preparazione delle vasche di stabulazione. Tutti i contenitori e le attrezzature utilizzate durante il campionamento devono essere risciacquati con acqua del sito prima di essere utilizzate. Tuttavia, poiché gli organismi in questo caso vengono prelevati e direttamente usati nei test, non è stata fatta una stabulazione degli organismi in questi esperimenti.

Le fasi di campionamento, trasporto e stabulazione degli animali sono state eseguite secondo le indicazioni riportate nelle guide standard internazionali (ASTM 1999; ISO 2005).

Allestimento vasche di stabulazione

Le vasche di stabulazione sono state predisposte in laboratorio, trasferendo uno strato di 2-4 cm di sedimento del sito di riferimento (setacciato a 500 µm) sul fondo del contenitore. Appena raccolti col setaccio, gli animali sono stati trasferiti nelle vasche già riempite con il sedimento setacciato a cui è stata poi aggiunta acqua marina naturale del sito di campionamento. In tal modo gli organismi hanno avuto la possibilità di infossarsi. Questo consente di diminuire eventuali stress a cui gli animali possono essere sottoposti durante il trasferimento in laboratorio.

La procedura dispone che in laboratorio, gli animali siano stati mantenuti in vasche di stabulazione in condizione di aerazione costante per tutto il periodo di acclimatazione; il protocollo prevede che l'acclimatazione sia condotta in camera termostatica per almeno 4 giorni e comunque per un periodo non superiore ai 10 giorni, portando gradualmente gli anfipodi alle condizioni test, ovvero

con periodico ricambio dell'acqua delle vasche con acqua marina artificiale aerata e termostata alla temperatura desiderata (ogni 24-48h).

Nel presente test invece, la stabulazione ha avuto una durata minore, giusto per consentire agli organismi indicatori di adattarsi alle nuove condizioni, e per non sottoporli ad un eccessivo stress dovuto al cambiamento di ambiente.

Esecuzione del test

Una volta terminata l'acclimatazione degli organismi come sopra descritto si è proseguito all'esecuzione del saggio biologico, secondo i seguenti passaggi:

- Preparazione delle piastre per il test con il tossico di riferimento (Cu) su fase liquida. Il controllo positivo con Cu si effettua utilizzando almeno 4 concentrazioni di Cu (0.4, 0.8, 1.6 e 3.2 mg L⁻¹) ed un controllo negativo (acqua marina artificiale). Il test si esegue in piastre di polistirene da 6 pozzetti, ognuno con capacità di 15 mL. In ciascuno dei 6 pozzetti si inoculano 10 mL di soluzione di rame.
- Preparazione delle piastre con le soluzioni di contaminante. Le piastre con le soluzioni di pesticida si preparano esattamente come le piastre relative al controllo positivo con Cu. Il numero delle concentrazioni tuttavia è più elevato e variabile in funzione del prodotto sottoposto a test. Nel caso del methiocarb è stato esplorato l'intervallo 10 - 320 µg L⁻¹; per imidacloprid invece è stato valutato l'intervallo 10 - 5000 µg L⁻¹. Gli intervalli di lavoro sono stati determinati in seguito all'esecuzione di range-finding test mirati ad identificare l'ordine di grandezza in cui rientra la LC₅₀ per i due prodotti¹.
- Sorting degli individui prelevati dalla vasca di stabulazione. Il giorno dell'esecuzione del test si predispose tutto il materiale per la selezione degli anfipodi (setacci e vasche in PE) e si misurano temperatura, salinità, pH. Si rimuove parzialmente l'acqua dalle vasche di stabulazione degli anfipodi e quindi, mediante setacciatura del sedimento a 500 µm, si separano gli organismi dal sedimento. Tutto il materiale trattenuto dal setaccio va trasferito in una vasca di sorting (di PVC, PE o PP) contenente acqua marina artificiale filtrata, termostata alla temperatura di condizione del saggio. Questa vasca è a fondo

¹ I range finding test si sono resi necessari per la mancanza di informazioni di letteratura relative alla sensibilità di anfipodi e copepodi ai 2 contaminanti presi in considerazione. Nel caso del Methiocarb il range finding test è stato condotto sull'intervallo di concentrazioni 1 - 1000 µg L⁻¹; nel caso di Imidacloprid il range investigato è sempre stato 10 - 5000 µg L⁻¹

chiaro, poiché in questo modo è più semplice individuare gli organismi per prelevarli. Gli anfipodi vengono quindi prelevati uno ad uno dalla vasca di selezione usando una pipetta Pasteur invertita, e sono distribuiti in sequenza tra diversi contenitori (tanti quanti sono i becher che verranno usati per il saggio) di plastica contenenti acqua marina artificiale, finché non si raggiunge il numero desiderato per il test. Questa prima fase del sorting consente di stabilire se si dispone di un numero sufficiente di organismi per la conduzione del saggio (30 individui per ogni concentrazione); permette inoltre, se necessario, di procedere al riconoscimento degli organismi al fine di verificarne l'appartenenza alla stessa specie, mediante osservazione con stereoscopio, sulla base di chiavi tassonomiche disponibili per anfipodi corofidi.

- Esposizione. Gli anfipodi presenti nei contenitori di pre-selezione sono trasferiti nei pozzetti di esecuzione del saggio uno ad uno, utilizzando una pipetta Pasteur invertita. Nel trasferire gli anfipodi dal contenitore di pre-selezione intermedio ai pozzetti si deve fare attenzione a non prelevare troppo liquido con la pipetta, in modo da non alterare la diluizione del contaminante all'interno del pozzetto quando si colloca l'organismo.
- Conta degli organismi vivi e morti dopo le 96 ore di esposizione. Gli anfipodi inattivi ma non palesemente morti vanno osservati con lo stereoscopio, e vanno considerati come vivi se si muovono dopo leggera stimolazione meccanica. Eventuali organismi mancanti sono da considerare come morti.

Le condizioni sperimentali in cui è stato eseguito il saggio, in accordo con quanto previsto dalla norma ISO (2005) sono le seguenti: $T = 20 \pm 2^\circ\text{C}$, $S = 34 \pm 3$ psu, illuminazione continua a 500-1000 lux. In questo modo vengono garantite le condizioni ottimali agli organismi per lo svolgimento del test, in modo che l'unico stress che subiscano sia quello del contaminante, in modo da poter fare una correlazione diretta tra la mortalità e la concentrazione di contaminante presente in acqua durante il test.

Rispetto alla procedura standard ISO per i test acuti con anfipodi, sono state apportate modifiche finalizzate a produrre una minore quantità di scarti inquinanti e l'impiego di un minor numero di organismi. I protocolli attualmente utilizzati a livello internazionale (ISO 2005; ASTM 2004), infatti, prevedono l'utilizzo di un gran numero di organismi (100 per ogni concentrazione), con l'utilizzo e la relativa contaminazione di grandi volumi di acqua di mare (almeno 1,5 litri per ogni concentrazione). La procedura standard implica, quindi, anche costi ambientali maggiori per lo smaltimento di questi scarti una volta terminati i test.

Si è pensato quindi di ridurre sia il quantitativo di organismi utilizzati per ogni test, mantenendo comunque un numero minimo per avere dati statisticamente significativi, sia i volumi di soluzione utilizzati, garantendo il volume minimo vitale per ogni organismo, che viene considerato, sulla base di dati di letteratura, attorno ai 2 mL di soluzione per ogni organismo.

Programma di QA/QC

La procedura di controllo qualità prevede l'esecuzione di un controllo positivo con una sostanza di riferimento (Cu) e di un controllo negativo con acqua marina ricostituita. Le condizioni sperimentali di esecuzione della prova con tossico di riferimento sono riportate sinteticamente in Tabella 2.

Affinché i risultati ottenuti con i campioni possano essere considerati attendibili devono essere rispettate le seguenti condizioni sperimentali:

- Nel saggio con il controllo negativo la mortalità degli organismi nel bianco (sola acqua marina naturale filtrata) deve essere minore del 10%;
- Nel saggio con il controllo positivo (Cu) la LC₅₀ deve rientrare all'interno della carta di controllo intralaboratorio.

Al momento non è disponibile una carta di controllo definitiva per il Cu, dal momento che questa sostanza di riferimento 1) è stata da poco introdotta al posto del Cd per motivi legati alla sicurezza degli operatori di laboratorio e 2) il design sperimentale su piastre è stato introdotto *ad hoc* per questo lavoro di tesi.

I valori ottenuti nei test finora condotti con design standard (test in becher e non in piastra) sono comunque compresi nell'intervallo 0.50 – 1.50 mg L⁻¹ che coincidono con le informazioni presenti in letteratura riguardo *M. insidiosum* (EC₅₀ = 0.47 mg L⁻¹, Prato et al., 2006), quindi ci si attende che la risposta a Cu di *M. insidiosum* sia nell'intorno di questo range anche per il design sperimentale su piastra..

Tabella 2. Riepilogo delle condizioni di esecuzione del test di tossicità acuta con *M. insidiosum*.

Parametro	Condizioni
1. Tipo di test	Test su fase liquida
2. Serie di diluizioni	Controllo ed almeno 4 concentrazioni: 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mg L ⁻¹ di Cu;
3. Sostanza di riferimento	CuCl ₂ ; CuSO ₄ ; Cu(NO ₃) ₂
4. Temperatura	20°C
5. Salinità	35 psu
6. Fotoperiodo	Illuminazione continua a 500-1000 lux
7. Dimensioni degli organismi	2-4 mm (selezionati con setacci da 1000 e 500 µm)
8. Camere test	Piastre in polistirene con 6 pozzetti da 15 mL

9. Volume di soluzione	10 mL
10. Numero di organismi per camera-test	5
11. Numero di repliche per trattamento	6
12. Aerazione	Continua
13. Acqua di diluizione	Acqua marina artificiale ASTM
14. Durata del test	96-h
15. Endpoint	Mortalità
16. Accettabilità del test	Sopravvivenza nel controllo > 90%

Espressione del risultato

I risultati dei test con la sostanza di riferimento e con le sostanze disciolte in matrice acquosa sono riportati:

- registrando la percentuale di mortalità media per replica;
- calcolando la LC_{50} a 96-h utilizzando il metodo Trimmed Spearman-Kärber (Trimmed Spearman-Kärber Program version 1.5) (USEPA, 2002).

Test di mortalità 48 h con *A. tonsa*

Principio del saggio

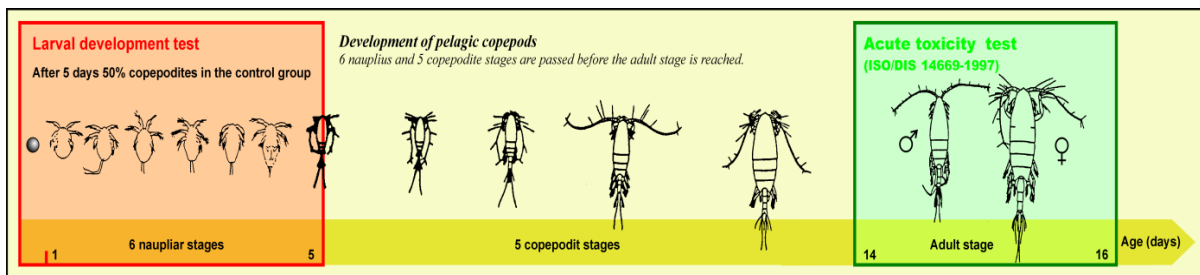
Secondo il protocollo attualmente utilizzato, il test acuto di mortalità con *A. tonsa* consiste nell'esposizione di almeno 20 individui ad una serie di diluizioni di campione ambientale o sostanza pura e nella verifica della mortalità dopo 24 ore (opzionale) e 48 ore (endpoint obbligato). L'obiettivo del saggio è il calcolo della concentrazione che causa la morte del 50% degli organismi esposti.

Origine degli organismi

La norma Standard ISO 14669 (1999) prevede che gli organismi da utilizzare nel test debbano provenire da colture di laboratorio oppure da allevamenti specializzati nella fornitura di bioindicatori per saggi di tossicità. Per gli organismi forniti da terzi, prima dell'esecuzione del saggio è opportuno mantenere i batch di copepodi in acclimatazione alle condizioni del saggio ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) al fine di evitare di riscontrare nei campioni mortalità dovuta allo stress legato al trasporto.

Nel caso del seguente progetto, sono stati utilizzati organismi forniti dalla Guernsey Sea Farms di Port Vale, Guernsey. Gli individui utilizzati per il saggio sono organismi al quinto stadio di copepodite o individui adulti, la cui vitalità è stata valutata allo stereomicroscopio prima dell'impiego nel saggio.

Figura 2- Stadi dello sviluppo larvale di *A. tonsa*



Esecuzione del test

Il saggio è stato eseguito in piastre di polistirene da 6 pozzetti di capacità 15 ml. Il test è stato condotto su un minimo di 7 concentrazioni di pesticida (10 - 20 - 40 - 80 - 160 - 320 - 640 - 1280 $\mu\text{g L}^{-1}$ per Methiocarb; 40 - 80 - 160 - 320 - 640 - 1280 - 2560 $\mu\text{g L}^{-1}$ per Imidacloprid) ottenute diluendo la soluzione madre di pesticida con Svensk medium filtrato a 0.2 μm con filtri di nitrato di cellulosa. Per ciascuna concentrazione del campione sono state predisposte 10 repliche da 10 ml, in ognuna delle quali sono stati disposti due individui di *A. tonsa*, garantendo quindi un volume minimo vitale di 5 mL di soluzione per ciascun copepode, come richiesto dalla norma ISO 14669 (1999).

Il volume di liquido in ciascuno dei pozzetti è stato ottenuto prelevando due aliquote da 5 ml mediante una pipetta tarata.

L'esposizione dei copepodi al campione è stata condotta in cella termostatica, ad una temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con fotoperiodo impostato a 16 ore di luce ed 8 di buio.

La determinazione della mortalità è stata condotta dopo 24 e 48 ore di esposizione, utilizzando uno stereomicroscopio e una sorgente di luce fredda per facilitare la verifica dello stato di salute dei copepodi. I singoli individui sono stati considerati come "morti" se a seguito di uno stimolo meccanico, ovvero dopo essere stati toccati con un puntale sterile, non hanno presentato alcuna reazione entro 10 secondi di tempo.

Programma di QA/QC

La procedura di controllo qualità prevede l'esecuzione di un controllo positivo con una sostanza di riferimento, il 3,5-diclorofenolo (3,5-DCP) e di un controllo negativo con la sola acqua di diluizione (Svensk medium), da eseguirsi contestualmente alle analisi sui campioni ambientali, o quantomeno per ogni coltura o lotto di copepodi acquistato.

I criteri di accettabilità sono i seguenti:

- Nel controllo la mortalità degli organismi deve essere minore o uguale al 10%;

- Nel saggio con il controllo positivo il valore di EC₅₀ deve essere compreso nell'intervallo 0.5 – 1.5 mg l⁻¹ di 3,5-DCP (ISO, 1999).

L'acqua di diluizione utilizzata come controllo negativo è lo Svensk medium, che si prepara secondo le modalità riportate nella tabella seguente.

Tabella 3. Micronutrienti necessari e aliquote da aggiungere per la composizione dello Svensk medium per la coltura e la diluizione delle soluzioni test.

Sol. nr.	Sali	g L ⁻¹ in stock solution	mL L ⁻¹ di medium
1	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O FeSO ₄ · 7H ₂ O	1.020 0.394	0.1
2	LiCl	0.610	0.1
3	RbCl	0.203	0.1
4	Na ₂ Mo ₂ O ₄ · 2H ₂ O	0.126	0.1
5	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.728	0.1
6	ZnCl ₂	0.104	0.1
7	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.080	0.1
8	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.034	0.1
9	KI	0.027	0.1
10	Na ₂ SeO ₃	0.018	0.1
11	NH ₄ VO ₃	0.005	0.1
12	NaNO ₃	2.158	0.1
13	K ₂ HPO ₄	2.368	0.1
14	Tiamina Biotina Cianocobalamina	0.020 0.001 0.001	0.5

Espressione del risultato

I risultati dei test con la sostanza di riferimento e con le sostanze disciolte in matrice acquosa sono riportati:

- registrando la percentuale di mortalità media per replica;
- calcolando la LC₅₀ a 24-h e 48-h utilizzando il metodo Trimmed Spearman-Kärber (Trimmed Spearman-Kärber Program version 1.5) (USEPA, 2002).

Test di sviluppo larvale (LDR) con *A. tonsa*

Il saggio di sviluppo larvale o LDR (Larval Development Rate) consiste nell'esposizione a diverse concentrazioni di tossico di un numero determinato (50-80) di uova di *A. tonsa* rilasciate al massimo da 48-h e mantenute in frigorifero fino all'esecuzione del saggio per evitare che si schiudano prima dell'esecuzione del test.

Origine degli organismi

Le uova di *A. tonsa* utilizzate per l'allestimento dell'allevamento sono state ottenute da individui adulti di *A. tonsa* forniti dalla Guernsey Sea Farms di Port Vale, Regno Unito.

La coltura è stata allestita inserendo circa 400-600 uova in bottiglie di vetro da 2 L riempite con Svensk medium, posta in camera termostatica ad una temperatura di 20°C in regime di fotoperiodo controllato (16:8 L:D) con illuminazione a bassa intensità mantenuta da lampade fluorescenti. Aeratori elettrici forniscono continuamente le colture di aria atmosferica sterile, filtrata attraverso filtri in cellulosa di porosità 0.2- μm . Tale aerazione, oltre a garantire lo scambio di gas con l'atmosfera, garantisce il mantenimento in sospensione dell'alimento somministrato ad *A. tonsa*.

Dopo un periodo di 10-12 giorni gli animali iniziano a produrre le uova, che sono continuamente rilasciate dalle femmine e si accumulano sul fondo delle bottiglie. Nei primi 10-12 giorni il fondo della coltura va pulito 3-4 volte per eliminare le alghe morte, le feci e le uova che non si sono schiuse. Successivamente la pulizia delle colture va effettuata, se possibile, quotidianamente per prelevare le uova, al fine di recuperare il materiale necessario per il test e/o per nuove colture e per evitare il rischio di sovrappopolazione. La pulizia del fondo viene effettuata con una pipetta di vetro da 10-20 mL connessa ad un tubo di gomma per acquario. L'acqua rimossa viene raccolta in una beuta e successivamente fatta passare attraverso due filtri, uno di maglia 180- μm , per trattenere nauplii e/o copepoditi eventualmente aspirati nelle operazioni di pulizia, l'altro di maglia 45- μm , per trattenere le uova. Le larve ed i juveniles vengono quindi reimmessi nella coltura, mentre le uova vengono raccolte in beute e successivamente impiegate per i test o per l'allestimento di nuove colture. Ogni giorno alle colture di *Acartia* viene somministrata una dose di circa $6 \cdot 10^4$ cell mL^{-1} di coltura di *Rhodomonas salina* e *Rhinomonas reticulata*, tramite l'impiego di una pompa peristaltica che fornisce automaticamente l'alimento 3 volte al giorno, prelevandolo da colture mantenute in agitazione continua.

Le alghe sono coltivate in un medium (B medium) costituito da acqua marina artificiale a salinità 18 psu, arricchita in nutrienti secondo le modalità riportate in Tabella 4.

Le colture sono mantenute ad una temperatura di 15°C in condizioni di illuminazione continua e sono rinnovate ogni 7-14 giorni aggiungendo aliquote variabili da 50 a 80 mL di colture in fase di crescita esponenziale ad 1 L di medium; una volta pronte per essere somministrate come alimento (4-5 giorni) assumono un colore rosso intenso e possono essere conservate in frigorifero per 3 giorni.

Tabella 4. Micronutrienti necessari e aliquote da aggiungere per composizione del B medium

Sol. nr.	Sali	g L ⁻¹ in stock solution	mL L ⁻¹ di medium
1	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	45.00	1
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	1.30	
2	LiCl	0.610	1
3	RbCl	0.203	1
4	Na ₂ Mo ₂ O ₄ · 2H ₂ O	0.126	1
5	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.728	1
6	ZnCl ₂	2.10	1 mL in soluzione 5
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	2.00	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.90	
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.00	

Fasi pre-test

Il giorno di esecuzione del saggio (giorno-0), si misura il pH delle soluzioni e si stima la densità della sospensione di uova conservata in frigorifero; una aliquota di 0,5 mL viene filtrata attraverso dei filtri in cellulosa con griglia (diametro 47 mm, porosità 0,45 µm) e si contano allo stereoscopio le uova presenti. Eventuali nauplii vanno eliminati. Dal numero di uova contate si stima il volume di sospensione da filtrare di volta in volta per ottenere il numero desiderato di uova (50-80).

Esecuzione del test

Una volta stimata la densità delle uova, utilizzando una siringa si sciacqua il filtro trasferendo così le uova direttamente nelle camere test (becher da 100 mL), utilizzando l'acqua contaminata contenuta nel becher.

Per il saggio su fase acquosa le uova sono inizialmente esposte in 25 mL di soluzione test e ad almeno 4-5 concentrazioni di campione, più un controllo costituito da sola acqua artificiale. Si usano 12 repliche per il controllo e 6 repliche per ogni concentrazione/diluizione. Una volta aggiunte le uova a tutti i becher si somministra l'alimento ad una concentrazione di $5 \cdot 10^4$ cell mL⁻¹. Il giorno 2 (o giorno 3) si misurano il pH e l'ossigeno disciolto delle soluzioni da rinnovare e successivamente si aggiungono altri 25 mL di soluzione e l'alimento ($5 \cdot 10^4$ cell mL⁻¹). Si tratta infatti di un test con rinnovo della soluzione; tuttavia per evitare che i nauplii siano rimossi dal becher durante l'operazione di rinnovo della soluzione è preferibile aggiungere della nuova soluzione anziché sostituirla (Kusk and Wolleberger, 2005). Il giorno-5 alla scadenza esatta delle 120-h di test, si preleva una replica del controllo, si fissa aggiungendo 0,5 mL di lugol, si filtra il contenuto e si contano quanti nauplii e copepoditi sono presenti. Se il rapporto nauplii:copepoditi è di circa 50:50, si procede alla terminazione del test anche negli altri becher, altrimenti, se c'è ancora una netta prevalenza di nauplii, si attende un paio di ore e si ripete la procedura. In Figura 2 è

riportato schematicamente lo sviluppo embrionale di *A. tonsa*. In rosso sono evidenziati gli stadi larvali interessati dal test LDR.

Procedura di QA/QC

Parallelamente ad ogni serie di test sui campioni si eseguono a) un test di controllo positivo con il tossico di riferimento (3,5-DCP) e b) dei controlli negativi con la sola acqua marina artificiale (Svensk medium).

La prova con la sostanza di riferimento si esegue su almeno 5 soluzioni di 3,5-DCP più un controllo con la sola acqua marina filtrata. Il test va eseguito almeno in 6 repliche o, nel caso vi siano molti campioni da saggiare, in 5. Dopo le 120 ore di esposizione si valuta la percentuale di copepoditi sul numero complessivo di stadi giovanili presenti (nauplii + copepoditi), quindi determinare la LC_{50} ; il valore di riferimento deve essere compreso nell'intervallo di accettabilità ricavato dalla carta di controllo. Il test viene considerato valido se vengono soddisfatti i seguenti criteri:

- La percentuale media di copepoditi nel controllo deve essere pari a $50 \pm 20\%$ degli animali sopravvissuti alla fine dell'esposizione;
- Per ogni serie di organismi campionati deve essere condotto un saggio con sostanza di riferimento (3,5-DCP); il risultato deve ricadere all'interno dell'intervallo $50-350 \mu\text{g L}^{-1}$;
- L'ossigeno disciolto deve essere sempre: $>70\%$ di saturazione in test su fase acquosa

Espressione del risultato

I risultati del LDR test, sia su fase liquida, sia su sedimento, sono espressi come LDR-ratio:

$$LDR_{ratio} = N. \text{ copepoditi} / (N. \text{ nauplii} - N. \text{ copepoditi})$$

In seguito a normalizzazione rispetto ai dati ottenuti con il controllo, i dati possono essere espressi in termini di percentuale di inibizione della metamorfosi rispetto al controllo secondo la seguente equazione:

$$\% \text{ inibizione} = 1 - (LDR\text{-diluizione} / \text{concentrazione}) / LDR\text{-controllo}$$

Per quanto riguarda i test con la sostanza di riferimento e/o sostanze pure in fase liquida, i risultati vengono riportati come EC_{50} , calcolato tramite l'utilizzo dei programmi statistici Log457 sviluppati presso la Danmarks Tekniske Universitet per il trattamento di dati con risposta continua (Andersen, 1994).

Per il calcolo della concentrazione di non effetto (NOEC: No Observed Effect Concentration) e della più bassa concentrazione di effetto (LOEC: Lowest Observed Effect Concentration) è stata

utilizzata l'analisi della varianza (ANOVA) ad una via, accoppiata al test-t di Dunnett. Normalità e omogeneità delle varianze dei dati grezzi sono state valutate utilizzando i test di Kolmogorov-Smirnoff e di Levene, rispettivamente.

Risultati e discussione

Controllo di qualità dei dati (QA/QC)

I test di controllo positivo con Cu e 3,5-DCP condotti durante il periodo sperimentale servono per verificare la sensibilità degli organismi e la confrontabilità nel tempo dei risultati del test. In altre parole, servono per verificare che il metodo funzioni e per avere dei dati di riferimento che consentano di valutare l'affidabilità dei risultati ottenuti con le sostanze tossiche di interesse (in questo caso Imidacloprid e Methiocarb).

Il fatto che poi nel caso degli anfipodi si sia utilizzato un protocollo sperimentale *ad hoc*, non testato in precedenza, diminuendo i volumi di acqua e il numero di organismi utilizzati ad ogni replica, rende necessario l'esecuzione del test con la sostanza di riferimento al fine di valutare se le condizioni sperimentali ed il design del test *ad hoc* producono dei risultati affidabili rispetto alle procedure standard. Infatti, se anche con la metodologia *ad hoc* adottata qui si ottengono risultati quantomeno simili a quelli riportati in letteratura, allora il metodo si può ritenere applicabile e si può ritenere il risultato ottenuto con la metodologia nuova confrontabile anche per altri contaminanti nuovi che si vanno a testare.

I risultati dei test condotti con le sostanze di riferimento, che sono rame (Cu) per quanto riguarda i test *M. insidiosum* e 3,5-DCP per quanto riguarda i test con *A. tonsa*, sono riportati e discussi nei seguenti paragrafi.

Test acuto con *M. insidiosum*

Sono stati condotti 7 test con la sostanza di riferimento (Cu), che hanno prodotto una 96-h LC₅₀ media di 0.42 ± 0.17 mg L⁻¹ di Cu. Il dettaglio dei dati è riportato in Tabella 5.

Tabella 5. Riepilogo delle LC₅₀ ottenute con la sostanza di riferimento (Cu) per il test di mortalità con M. insidiosum. Nella tabella i dati tra parentesi rappresentano i limiti di confidenza al 95% forniti dallo Spearman-Kärber per il calcolo della LC₅₀.

n. test	96 h LC ₅₀ (mg L ⁻¹)
1	0,41 (0,32 – 0,53)
2	0,38 (0,35 – 0,43)
3	0,14 (0,13 – 0,15)
4	0,40 (0,37 – 0,44)
5	0,57 (0,51 – 0,64)
6	0,68 (0,57 – 0,82)
7	0,39 (0,30 – 0,46)

I risultati del test con il design sperimentale prodotto *ad hoc* per questo lavoro di tesi sono dunque in accordo con i dati riportati in letteratura per test condotti secondo la norma standard ISO (EC₅₀ = 0.47 mg L⁻¹, Prato et al., 2006). Invece, i dati sono relativamente più bassi rispetto a quanto

riportato in Picone et al. (2018) per la popolazione lagunare di *M. insidiosum*, ma rispetto a questa esperienza c'è una significativa differenza nelle temperature di esecuzione del saggio (T = 15°C in Picone et al, 2019; T = 20°C in questo lavoro).

Bisogna notare che:

- i dati ottenuti in questa sede presentano una buona sovrapposibilità, a certificare la riproducibilità e la replicabilità del risultato ottenuto con il test. Questo ovviamente comporta che anche i risultati ottenuti con le sostanze test (Imidacloprid e Methiocarb) durante il periodo sperimentale risultino confrontabili;
- l'unico dato che si discosta in maniera rilevante rispetto agli altri è quello relativo al test n. 3 in cui gli anfipodi hanno subito una stabulazione più lunga (15 giorni) rispetto agli altri test (4/5 giorni), il che sottolinea come sia importante mantenere una standardizzazione anche nei periodi di stabulazione;
- la sopravvivenza del controllo negativo fatto con la sola acqua marina artificiale (ASTM) è risultata sempre molto alta (sempre maggiore dell'85%, con una media nei 7 test di $97\pm 4\%$) ad indicare che lo stato di salute degli individui utilizzati era ottimale.

La sopravvivenza nel controllo negativo con l'acetone al 6% ha evidenziato una sopravvivenza più bassa ($85\pm 4\%$; n = 3) ad indicare un effetto del solvente sulla sopravvivenza.

Test acuto con *A. tonsa*

In questo caso è stato necessario effettuare un solo test con la sostanza di riferimento, ovvero, come detto prima, 3,5-DCP, il quale ha prodotto una 24h-LC₅₀ di 757 µg L⁻¹ ed una 48h-LC₅₀ di 415 µg L⁻¹. Non sono stati fatti più test di questo tipo poiché tutti i test acuti con *A. tonsa* sono stati effettuati con un singolo batch di copepodi.

Inoltre, si tratta anche di una procedura standard, e per questo motivo non è necessario acquisire dati per la valutazione di ripetibilità del metodo. Il risultato ottenuto dopo 48 ore di esposizione è inoltre in accordo con l'intervallo di accettabilità riportato nella norma ISO (1999): (0.5 – 1.5 mg l⁻¹ di 3,5-DCP).

È importante far notare che, per l'accettabilità del test, le norme ISO impongono che la sopravvivenza nel controllo con la sola acqua di diluizione (in questo caso Svensk medium) sia superiore al 90%. Anche questo parametro è stato rispettato nel test condotto in quanto sono state ottenute:

- sopravvivenza del 95% nel controllo dopo 24-h;

- sopravvivenza del 90% nel controllo dopo 48-h.

In entrambi i casi, dai dati raccolti con l'esecuzione del test, siamo all'interno dei criteri di accettabilità riportati, e perciò riteniamo accettabili anche i risultati ottenuti.

Test LDR con *A. tonsa*

Nel test LDR con *A. tonsa* si è fatto, come nel caso del test acuto, un solo test con la sostanza di riferimento, che anche qui è stata 3,5-DCP; è stata ottenuta una EC_{50} di $71 \mu\text{g L}^{-1}$, che risulta comunque all'interno del range di accettabilità dei risultati ($50\text{-}350 \mu\text{g L}^{-1}$), anche se leggermente al di sotto dei dati di letteratura riportati da Picone et al. (2018) e Andersen et al. (2001).

Rispetto ai dati di letteratura, tuttavia, i risultati di questo lavoro di tesi sono stati ottenuti con una diversa popolazione di *A. tonsa*, originaria del canale della Manica, mentre i dati di Picone et al. (2018) e Andersen et al. (2001) sono stati ottenuti con una coltura originaria dello Øresund (Danimarca), mantenuta nei laboratori del DTU di Lyngby dal 1981.

È quindi molto probabile vi siano differenze sensibili nelle tolleranze alla sostanza di riferimento legate alla variabilità genetica delle popolazioni.

La LDR nel controllo è risultata pari a 0.36 ± 0.04 , in accordo con il criterio di accettabilità (0.50 ± 0.20).

Anche qui è stato effettuato un singolo test di controllo con 3,5-DCP perché tutti i test sono stati condotti con una singola coltura.

Dati sperimentali su Imidacloprid e Methiocarb

I risultati ottenuti con i test di tossicità sono sintetizzati in Tabella 6 e riportati graficamente in Figura 3.

I valori trovati sono parametri di tossicità univocamente determinata dal contaminante in questione, e per questo motivo utilizzabili per la derivazione di PNEC e altri parametri che possono essere di utilità per i legislatori nella definizione di standard. Questo per le modalità con cui è condotto il test, ovvero con la sola presenza del contaminante come sostanza estranea e in condizioni controllate di temperatura, salinità e fotoperiodo.

Entrambi i contaminanti hanno dimostrato essere tossici nei confronti degli organismi indicatori. Tuttavia, a seconda del test utilizzato e dell'endpoint considerato, si sono ottenuti risultati diversi, che consentono di rilevare nel complesso la tossicità di queste due sostanze nei confronti degli indicatori.

Tabella 6. Riepilogo dei dati di tossicità ottenuti nel periodo sperimentale. IMI = Imidacloprid; MET = Methiocarb. I dati tra parentesi si riferiscono ai limiti fiduciali al 95% ottenuti con Trimmed Spearman-Kärber (test acuti con *M. insidiosum* e *A. tonsa*) e Log457 (LDR con *A. tonsa*).

	test	parametro	test eseguiti (n)	risultati
IMI	acuto con <i>M. insidiosum</i>	96-h LC ₅₀	3	LC ₅₀ > 5,000 µg L ⁻¹
	acuto con <i>A. tonsa</i>	24-h EC ₅₀	1	LC ₅₀ > 2,560 µg L ⁻¹
		48-h EC ₅₀	1	LC ₅₀ = 184 µg L ⁻¹ (166-203)
	LDR con <i>A. tonsa</i>	5-d EC ₅₀	1	EC ₅₀ = 7,9 µg L ⁻¹ (59-78)
MET	acuto con <i>M. insidiosum</i>	96-h LC ₅₀	3	LC ₅₀ = 68 µg L ⁻¹ (59-78)
				LC ₅₀ = 75 µg L ⁻¹ (65-87)
				LC ₅₀ = 52 µg L ⁻¹ (43-63)
	acuto con <i>A. tonsa</i>	24-h EC ₅₀	1	LC ₅₀ = 474 µg L ⁻¹ (419-537)
		48-h EC ₅₀	1	LC ₅₀ = 147 µg L ⁻¹ (125-173)
LDR <i>A. tonsa</i>	5-d EC ₅₀	3	n.c.	

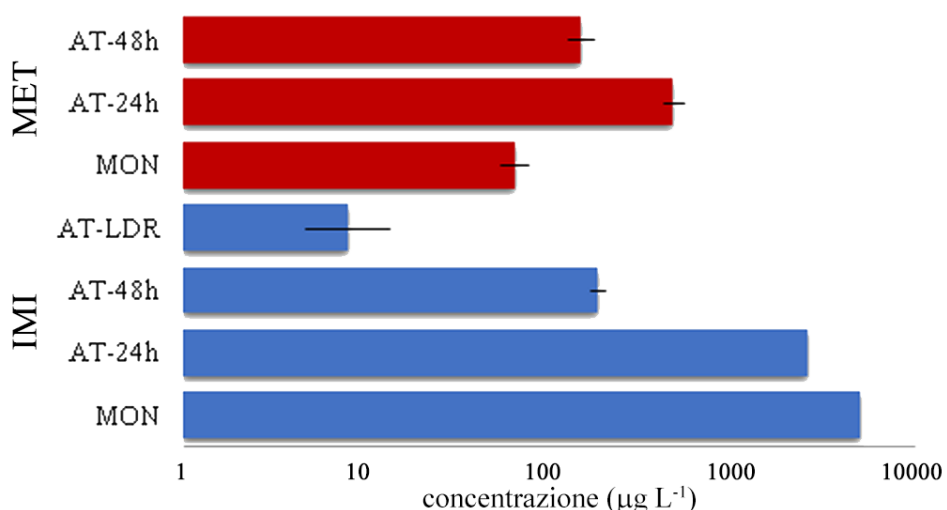


Figura 3. Grafico a barre relativo ai dati di tossicità ottenuti con *M. insidiosum* e *A. tonsa*. I risultati dei test con *M. insidiosum* sono riportati come media ± deviazione standard dei 3 test eseguiti, ovvero del test preliminare (range finding) e dei 2 test definitivi. Le concentrazioni sono riportate in scala logaritmica. IMI = Imidacloprid; MET = Methiocarb; MON = *M. insidiosum*; AT = *A. tonsa*.

Si può notare che l'Imidacloprid ha prodotto dati nettamente più elevati rispetto al Metiocarb nel test con *M. insidiosum* e nel test acuto a 24-h con *A. tonsa*, come viene evidenziato dal grafico, a rilevare effetti acuti nel breve termine più marcati di Methiocarb rispetto a Imidacloprid. Tuttavia, i due organismi rispondono in maniera abbastanza diversa ai due contaminanti, il che porta a supporre una diversa efficacia dei meccanismi di azione tossica nei due crostacei.

Questo può essere supposto per il fatto che i test vengono condotti in condizioni note e mantenute stabili (temperatura, illuminazione, salinità), in modo tale che gli unici effetti di mortalità possano essere ricondotti ai contaminanti immessi in soluzione.

Test acuto con *M. insidiosum*

Come abbiamo visto dai dati prodotti dai test condotti in questo lavoro di tesi, i contaminanti hanno evidenziato effetti acuti su *M. insidiosum* nei test a 96 ore a concentrazioni molto diverse.

Si può notare che il Methiocarb risulta più tossico nei confronti degli anfipodi rispetto all'Imidacloprid, avendo una LC₅₀ molto più bassa; significa che si ottiene il 50% di mortalità ad una concentrazione minore rispetto all'altro contaminante.

Questo ci porta a pensare che i due meccanismi di azione dei contaminanti analizzati abbiano efficacia diversa su *M. insidiosum*, determinando quindi una maggiore pericolosità a livello ambientale di Methiocarb rispetto a Imidacloprid, in relazione all'indicatore adottato.

Senza dubbio, il fatto che l'Imidacloprid abbia fornito un'EC₅₀ stimata superiore ai 5000 µg L⁻¹ (a cui è stata riscontrata una mortalità del 36% rispetto al controllo), ci fa pensare che questo contaminante non rappresenti attualmente un rischio per gli ambienti di transizione, in termini di tossicità acuta, dal momento che questa concentrazione è molto altra se confrontata con le concentrazioni ambientali. Tuttavia, vista la riconosciuta tossicità di questo pesticida è comunque conveniente monitorarlo, in quanto in un ambiente confinato e con scarso ricircolo come la laguna di Venezia l'incremento delle concentrazioni potrebbe avvenire in tempi rapidi e comportare delle criticità ambientali.

Il Methiocarb, invece, risulta essere di gran lunga più tossico nei confronti di questo anfipode, in quanto la sua EC₅₀ media risulta essere pari a 65±12 µg L⁻¹ (n = 3). Come si può notare dai dati sperimentali riportati in Tabella 6, i risultati ottenuti nei diversi test risultano essere molto vicini tra loro, con intervallo di confidenza ampiamente sovrapponibile, indice che gli stessi test sono replicabili e che il risultato ottenuto può essere ritenuto affidabile.

Per quanto riguarda il Methiocarb si è notato che la mortalità inizia ad essere rilevante a partire da 40 µg L⁻¹ in su, mentre al di sotto di tale concentrazione generalmente non si notano significative deviazioni dalle risposte ottenute nel controllo.

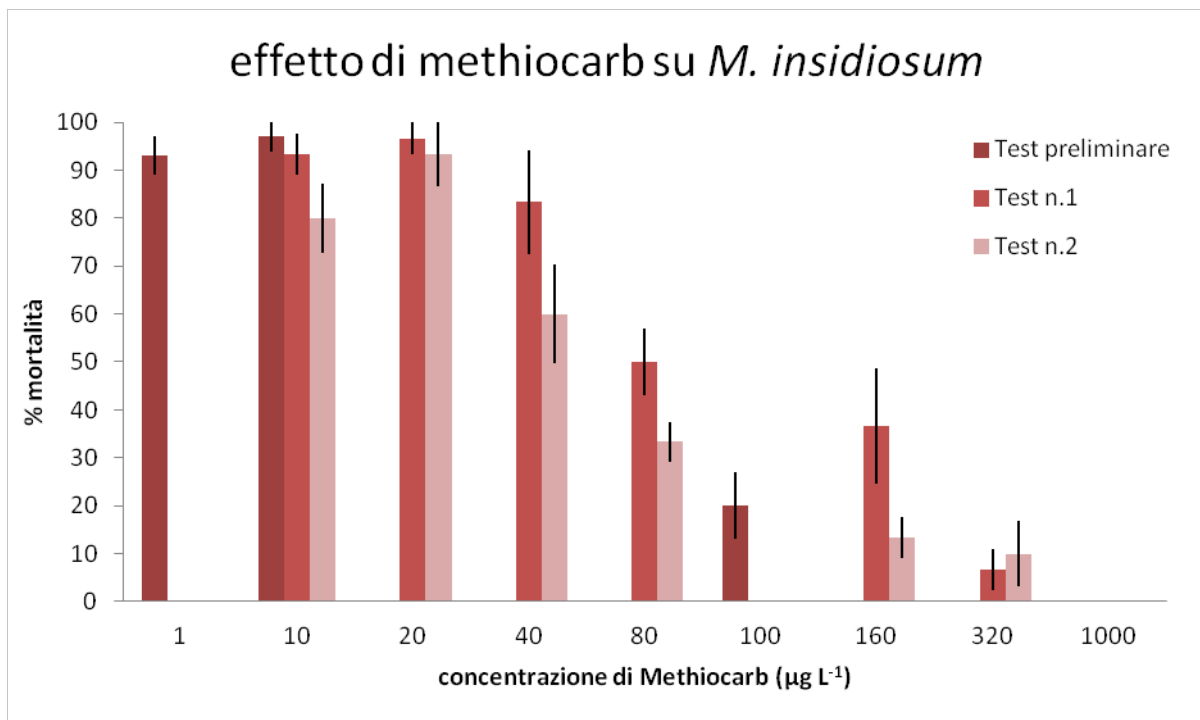


Figura 4. Effetto misurato nelle singole concentrazioni di Methiocarb nei confronti di *M. insidiosum*. Le barre di errore rappresentano l'errore standard.

Per indagare meglio il comportamento anomalo dell'Imidacloprid, si è provato ad ipotizzare che la soglia di tossicità risultasse così elevata per via di un possibile processo degradativo del contaminante in presenza di luce (Wamhoff and Schneider, 1999): per questo motivo si è provato a condurre un test in cui si confrontassero le risposte degli anfipodi *M. insidiosum* alla presenza del contaminante in presenza ed assenza di luce, provvedendo, nelle camere test in cui il test andava condotto al buio, ad avvolgere con della carta stagnola per schermarle dall'illuminazione.

Tuttavia, visto che il risultato non cambia tra le 2 condizioni sperimentali ($LC_{50} > 5000$ in entrambi i casi; effetto massimo registrato 47% e 53%, rispettivamente per test al buio e alla luce), abbiamo scartato che l'elevata "resistenza" all'Imidacloprid sia dovuta, appunto, alla degradazione del principio attivo in presenza di luce.

Test acuto con *A. tonsa*

Per quanto riguarda i test acuti con *A. tonsa*, l' EC_{50} dopo 24-h risulta superiore a $2560 \mu\text{g L}^{-1}$ per l'Imidacloprid, mentre dopo 48-h si attesta a $184 \mu\text{g L}^{-1}$, quindi inferiore rispetto a quella riscontrata con gli anfipodi, il che fa supporre che *A. tonsa* sia un indicatore più sensibile alla presenza di Imidacloprid in ambiente, anche nel breve periodo. Anche nel caso del Methiocarb c'è una differenza rilevante nell'effetto misurato dopo 24-h e 48-h (Tabella 6). tuttavia, rispetto all'Imidacloprid si nota che gli effetti sono molto maggiori dopo 24 ore (EC_{50} di $474 \mu\text{g L}^{-1}$ per

Methiocarb contro $EC_{50} > 2560 \mu\text{g L}^{-1}$ per Imidacloprid), mentre sostanzialmente le due sostanze si equivalgono come intensità della risposta dopo le 48-h (EC_{50} di $147 \mu\text{g L}^{-1}$ per Methiocarb contro $EC_{50} = 184 \mu\text{g L}^{-1}$ per Imidacloprid).

Test LDR con *A. tonsa*

Nel caso del test LDR con *A. tonsa*, si è ottenuto un' EC_{50} di $7,9 \mu\text{g L}^{-1}$, per cui, dal confronto con i dati ottenuti in precedenza, l'effetto sullo sviluppo larvale è senza dubbio l'endpoint più sensibile tra quelli saggiati. Questo risultato per certi versi era ipotizzabile fin dal principio del test, poiché per test sub-cronici focalizzati sullo sviluppo gli effetti solitamente si manifestano sempre a livelli di concentrazione al di sotto delle soglie di mortalità.

Inoltre, gli effetti di Imidacloprid si fanno già sentire a concentrazioni molto basse, infatti la concentrazione di non effetto (NOEC) è stata individuata a 10 ng L^{-1} , mentre la concentrazione di effetto più bassa è stata individuata a 100 ng L^{-1} . Questi sono dati significativi perché le indagini ambientali condotte in laguna (Progetto Venezia 2021) indicano che le massime concentrazioni finora rilevate di Imidacloprid approssimano i 10 ng L^{-1} .

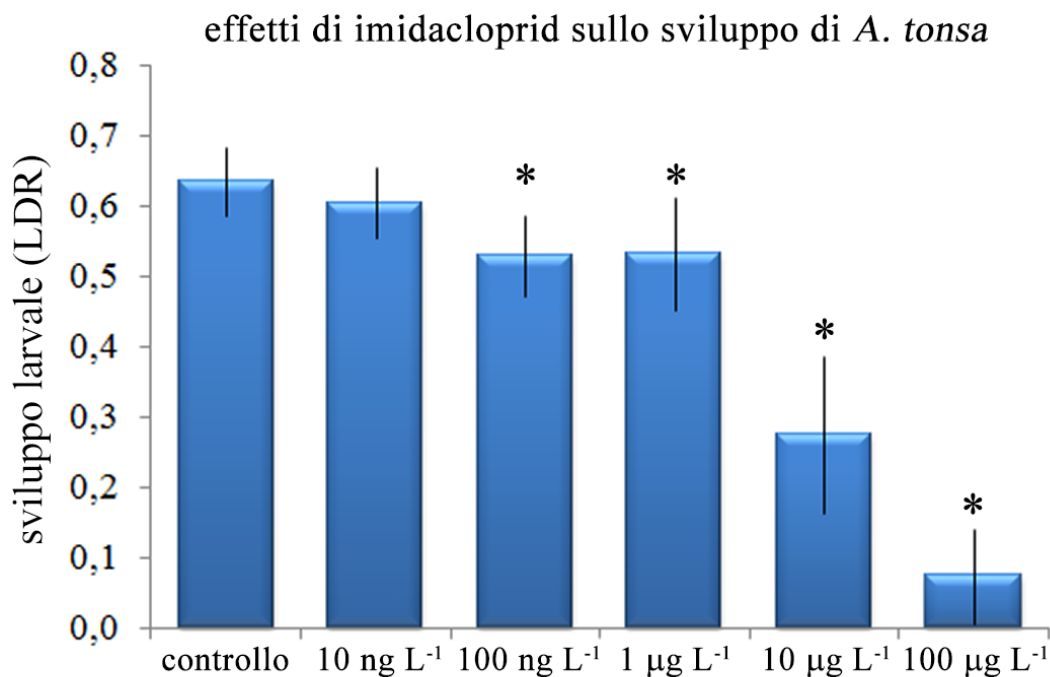


Figura 5. Inibizione dello sviluppo larvale di *A. tonsa* generato da imidacloprid. Le barre di errore indicano la deviazione standard; gli asterischi indicano le concentrazioni che presentano un LDR significativamente diverso dal controllo (ANOVA a una via e t-test di Dunnett, $\alpha = 0.05$)

Nei test condotti con Methiocarb, invece, sono sopraggiunte alcune difficoltà che non consentono di considerare i risultati accettabili e affidabili. In breve, in tutti i test condotti ($n = 3$), si sono osservate delle anomale stimolazioni dello sviluppo larvale nelle concentrazioni più elevate di

Methiocarb (10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) che portano ad ipotizzare la sovrapposizione di un effetto di "endocrine disruption" all'effetto inibente dell'acetilcolinesterasi, che rappresenta il meccanismo di effetto principale di Methiocarb. Tuttavia, essendo stati ottenuti in questi test degli sviluppi larvali nel controllo al di sotto del criterio di accettabilità (0.3), quindi non è possibile confermare l'esistenza di questo effetto stimolatorio. In ogni caso, oltre alla presenza di una risposta congrua nel controllo, per accertare l'endocrine disruption è necessario ricorrere a specifici test *in vitro* in grado di rilevare l'alterazione ormonale, endpoint non osservabile con test di tossicità *in vivo* (Wollenberger et al. 2005; Picone et al. 2018).

L'effetto di temperatura e illuminazione sulla "stimolazione" osservata è stato escluso ripetendo gli esperimenti in diverse condizioni operative. Infatti, dopo aver ipotizzato dipendesse dal fattore dell'illuminazione e della temperatura, e notando risultati ancora non stabili e ripetibili, si è provato a condurre il test in camera di incubazione, ovvero una camera dove la temperatura risulta ancora più controllata, così come l'illuminazione, rispetto alla camera climatica, che essendo comunque grande, risulta avere zone maggiormente illuminate rispetto ad altre per il posizionamento delle lampade UV, o può esserci la possibilità di una, seppur minima, differenziazione climatica per quanto riguarda la temperatura.

Confronto tra indicatori

Ovviamente in base ai dati ottenuti è stato possibile operare un confronto tra la tossicità di queste sostanze nei confronti degli indicatori scelti e una comparazione con i risultati presenti in letteratura per altre specie marine ed estuarine.

Non è detto, infatti, che un contaminante abbia lo stesso effetto su due tipologie diverse di organismi: può risultare più tossico o meno, in base alle caratteristiche genetiche delle specie ed al meccanismo d'azione, il quale può essere più efficace su determinate specie oppure su altre.

I risultati ottenuti con l'Imidacloprid per *M. insidiosum* appaiono più alti in questo lavoro rispetto a quanto riportato in letteratura su altri crostacei, dal momento che qui risulta una EC_{50} maggiore a 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$, mentre nei documenti di riferimento abbiamo una soglia intorno a 34,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ per il crostaceo *Mysidopsis bahia* in un test di mortalità a 96 ore (Pisa et al., 2015). Questa maggiore resistenza di *M. insidiosum* è dovuta probabilmente alla maggior resistenza spesso rilevata in organismi infaunali estuarini rispetto a organismi del suprabenthos.

Per quanto riguarda *A. tonsa*, i dati ottenuti fanno supporre che i copepodi siano un indicatore più sensibile alla presenza di Imidacloprid in ambiente, anche nel breve periodo.

Si possono confrontare i dati ottenuti per *A. tonsa* con quelli di altri organismi indicatori presenti in letteratura nei confronti delle stesse sostanze. Questo organismo risulta più sensibile rispetto a tutti gli altri indicatori, in particolare dell'altro organismo qui impiegato, ovvero *M. insidiosum*. Se si confronta con altri indicatori ancora, invece, il dato ottenuto con il test LDR su *A. tonsa* risulta tra i più bassi in assoluto, confrontabile solamente a quello riportato per *Callinectes sapidus* (Tabella 7). I risultati del test acuto, dopo 48-h di esposizione, sono invece in accordo con i dati relativi a *P. monodon*.

Per quanto riguarda l'Imidacloprid, in letteratura sono inoltre presenti dati riguardanti test con *Mysidopsis bahia* a 96 ore, con EC₅₀ di 34,1 µg L⁻¹, NOEC di 13,3 µg L⁻¹ (Pisa et al., 2015), con *Artemia* spp. a 48 ore, per cui viene riportata una LC₅₀ pari a 361000 µg L⁻¹ (Song et al., 1997), con *P. monodon* sempre a 48 ore, con una LC₅₀ pari a 175 µg L⁻¹ (Hook et al., 2018), e con *Callinectes sapidus*, in un test a 24 ore, riportando una LC₅₀ di 10 µg L⁻¹ con le megalopae (Osterberg et al., 2012).

Tabella 7. Dati di letteratura relativi alla tossicità di imidacloprid nei confronti di crostacei di ambiente marino ed estuarino.

Specie	Esposizione	Endpoint	Tossicità (µg L ⁻¹)	Riferimento
<i>Acartia tonsa</i>	120-h	sviluppo larvale	EC ₅₀ = 7,9	questo lavoro
			NOEC = 0,01	
	24-h	mortalità adulti	LC ₅₀ > 5.000	
48-h	LC ₅₀ = 184			
<i>Monocorophium insidiosum</i>	96-h	mortalità adulti	LC ₅₀ > 2.560	questo lavoro
<i>Mysidopsis bahia</i>	96-h	mortalità adulti	LC ₅₀ = 34,1	Pisa et al., 2015
<i>Artemia</i> spp.	48-h	mortalità adulti	LC ₅₀ = 361.000	Song et al., 1997
<i>Paeneus monodon</i>	48-h	mortalità adulti	LC ₅₀ = 175	Hook et al., 2018
<i>Callinectes sapidus</i>	24-h	mortalità larvale	LC ₅₀ = 10	Osterberg et al., 2012

Guardando ai dati di tossicità da letteratura e confrontandoli con quelli ottenuti da noi per *M. insidiosum*, i risultati del Methiocarb risultano essere quasi perfettamente coincidenti, essendo registrato un dato di LC₅₀ compreso tra 51 e 65 µg L⁻¹ per il crostaceo *Palaeomonetes pugio* in un test di mortalità a 96 ore (Brunson et al., 1985), quindi come quello condotto qui con *M. insidiosum*, in cui si ottengono LC₅₀ compresi nell'intervallo tra 52 e 75 µg L⁻¹ (Tabella 8). Possiamo affermare

inoltre che *A. tonsa*, in riferimento al methiocarb, sia meno sensibile al contaminante rispetto ad altri indicatori, poiché alcuni crostacei presentano LC₅₀ più basse, fino al caso estremo di *A. bahia* che ha una EC₅₀ di 3,32 µg L⁻¹ per il test cronico a 28 giorni, avente come endpoint la crescita (Tabella 8).

Tabella 8. Dati di letteratura relativi alla tossicità di methiocarb nei confronti di crostacei di ambiente marino ed estuarino.

Specie	Esposizione	Endpoint	Tossicità (µg L ⁻¹)	Riferimento
<i>M. insidiosum</i>	96-h	mortalità adulti	EC ₅₀ = 52 - 75	questo lavoro
<i>A. tonsa</i>	24-h	mortalità adulti	LC ₅₀ = 474	questo lavoro
	48-h		LC ₅₀ = 147	
<i>Amerycamysis bahia</i>	96-h	mortalità adulti	EC ₅₀ = 12,4	Wildlife International Inc. ¹
	28-d	crescita	EC ₅₀ = 3,32	
<i>Palaeomonetes pugio</i>	4-d	mortalità adulti	LC ₅₀ = 51 - 65	Brunson et al., 1985
<i>Penaeus duorarum</i>	48-h	mortalità adulti	LC ₅₀ = 32	EPA Research Labs ¹

¹Dati disponibili presso il database USEPA OPP Pesticide Ecotoxicity Database (<https://ecotox.ipmcenters.org/>)

Per quanto riguarda altri organismi marini, non appartenenti al subphylum dei crostacei, dati di tossicità sono disponibili per il Methiocarb per alcune specie di pesci e di molluschi, tra cui *Crassostrea virginica*, che in un test a 96-h in cui viene considerato come endpoint di riferimento la crescita della conchiglia, presenta un'EC₅₀ pari a 1000 µg L⁻¹. Per questo si può ipotizzare che *A. tonsa*, restituendo una concentrazione di effetto più bassa, risulti essere un organismo decisamente più sensibile rispetto ai molluschi, mentre gli anfipodi risultano decisamente più resistenti anche dei molluschi all'azione di questo carbammato (Tabella 9).

Per quanto riguarda i pesci, *Menidia menidia*, impiegata in un test a 96-h di mortalità, restituisce un valore di LC₅₀ compreso tra 51 e 57 µg L⁻¹ (Tabella 9), mentre *Cyprinodon variegatus* in un test della stessa durata, presenta una resistenza significativamente superiore (LC₅₀ = 3.010 µg L⁻¹). Queste differenze sottolineano come la risposta al Methiocarb sia molto eterogenea e specie-specifica, anche tra organismi appartenenti agli stessi gruppi sistematici. Rispetto alle 2 specie di pesci considerate, *M. insidiosum* si pone agli stessi livelli di *M. menidia*, almeno per quanto concerne i dati di tossicità acuta in nostro possesso. Al contrario, *A. tonsa* dal punto di vista della tossicità acuta risulta più resistente di *M. menidia* ma al contempo più sensibile di *C. variegatus*. La mancanza del dato cronico riguardo *A. tonsa* non consente di fare confronti sugli effetti a lungo termine.

Tabella 9. Dati di letteratura relativi alla tossicità di methiocarb nei confronti di molluschi e pesci marini.

Specie	Esposizione	Endpoint	Tossicità (µg L ⁻¹)	Riferimento
Molluschi				
<i>Crassostrea virginica</i>	96-h	Sviluppo	NOEC = 560	Brunson et al., 1985
			LOEC = 1.000	
			EC ₅₀ = 1.000	
Pesci				
<i>Menidia menidia</i>	96-h	mortalità adulti	LC ₅₀ = 53,5	EA Engineering ¹
			NOEC = 40	Brunson et al., 1985
			LOEC = 100	
			LC ₅₀ = 51 - 57	
<i>Cyprinodon variegatus</i>	96-h	mortalità adulti	LC ₅₀ = 3.010	Wildlife international Inc. ¹
	33-d	crescita	LOEC = 15	

¹Dati disponibili presso il database USEPA OPP Pesticide Ecotoxicity Database (<https://ecotox.ipmcenters.org/>)

Possibili effetti sulla rete trofica

Una delle principali domande che ci si pone nell'affrontare la problematica relativa alla presenza dei contaminanti negli ambienti acquatici costieri è relativa alle possibili ripercussioni che si possono avere nel breve e medio termine sulla rete trofica e quindi sull'ecosistema.

Nel caso di Methiocarb e Imidacloprid, i dati hanno chiaramente messo in evidenza come questi pesticidi siano in grado di impattare su sopravvivenza e sviluppo larvale di *A. tonsa* e *M. insidiosum*, quindi sono potenzialmente in grado di alterare la rete trofica sia bentonica, di cui gli anfipodi costituiscono un comparto importante, sia pelagica, in cui i copepodi rappresentano un fondamentale per il trasferimento di energia dai produttori primari ai livelli più alti della rete.

Sebbene il Methiocarb sia il prodotto che colpisce in maniera significativa entrambi gli indicatori, le concentrazioni a cui si manifestano gli effetti acuti sono decisamente superiori a quelle che sono attualmente le concentrazioni in ambiente lagunare (al massimo di qualche unità di ng L⁻¹). Discorso diverso vale per Imidacloprid. Se è vero che gli effetti acuti avvengono a concentrazioni decisamente superiori rispetto alle attuali concentrazioni ambientali (0 - 10 ng L⁻¹), il test LDR con *A. tonsa* ha evidenziato che gli effetti sullo sviluppo larvale dei copepodi si possono manifestare a concentrazioni di poco superiori ai valori ambientali attuali (NOEC = 10 ng L⁻¹, ma LOEC a 100 ng

L⁻¹). Questo pesticida rappresenta dunque un potenziale rischio nel medio termine che necessita di attento monitoraggio.

Conclusioni

Come si è visto, in questo lavoro si sono ottenuti dati di tossicità per due specie importanti nelle reti trofiche lagunari, per due contaminanti emergenti di primaria importanza e per cui sono scarse le informazioni su specie marine/estuarine.

Questi nuovi dati possono quindi essere estremamente utili per la derivazione di PNEC o altri valori soglia sito specifici, tenendo presente che dai valori ottenuti in questa sede di lavoro si deduce che attualmente effetti acuti dovuti a Imidacloprid e Methiocarb in ambiente lagunare sono attualmente improbabili, poiché le LC/EC₅₀ calcolate per entrambi gli indicatori risultano essere molto alte se confrontate con le prime concentrazioni ambientali rilevate sia in letteratura che nei primi dati del Progetto Venezia 2021.

Tuttavia, questa affermazione non comporta che non si debbano comunque monitorare e limitare l'utilizzo di queste sostanze, poiché non possono essere del tutto esclusi effetti sub-cronici sullo sviluppo larvale, che nel caso dell'Imidacloprid avvengono a concentrazioni che non sono poi così elevate rispetto a quelle ambientali rilevate.

Quanto emerge è quindi la necessità di investigare più approfonditamente gli effetti subletali a medio-lungo termine piuttosto che acquisire ulteriori dati di tossicità acuta su specie acquatiche, dal momento che non possiamo determinare con certezza che questi contaminanti comportino effetti di "endocrine disruption" senza ulteriori test di conferma.

Bibliografia

Andersen, H.R., Wolleberger L., Halling-Sørensen B., Kusk K.O., 2001 “Development of copepod nauplii to copepodites – A parameter for chronic toxicity including endocrine disruption.” *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2821-2829.

Andersen, 1994 “Statistical methods for evaluation of the toxicity of wastewaters.” MS thesis. Department of Mathematical modeling, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark.

ASTM. American Society for Testing and Materials, 2004 “Standard Guide for Conducting Renewal Microplate-Based Life-Cycle Toxicity Tests with a Marine Meiobenthic Copepod”. E2317-04.

Bat L., Raffaelli D., 1998 “Sediment toxicity testing: a bioassay approach using the amphipod *Corophium volutator* and the polychaete *Arenicola marina*” *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 226, 217-239.

Bat L., Raffaelli D., Marr I.L., 1998 “The accumulation of copper, zinc and cadmium by the amphipod *Corophium volutator* (Pallas).” *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 223, 167-184

Bettiol C., Collavini, F., Guerzoni S., Molinaroli E., Rossini P., Zaggia L., Zonta R., 2005, “Relative contribution of atmospheric and riverine inputs of metals, nutrients and POPs into the Lagoon of Venice”. *Hydrobiologia* 550, 151-165.

Bianchi F., Acri F., Bernardi Aubry F., Berton A., Boldrin A., Camatti E., Cassin D., Comaschi A. 2003, “Can plankton communities be considered as bio-indicators of water quality in the Lagoon of Venice?” *Marine Pollution Bulletin* 46(8): 964-71.

Bigongiari N., Braida T., Pasteris A., 2001 “Saggio biologico con l’anfipode *Corophium orientale*: metodiche ed esempi di applicazione ai sedimenti marini.” *Biologia Marina Mediterranea* 8(2): 60-71.

Breiholtz M., Bengtsson B.E., 2001, “Oestrogens have no hormonal effect on the development and reproduction of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*.” *Marine Pollution Bulletin* 42, 879–886. doi:10.1016/S0025-326X(01)00046-7.

Breiholtz M., Wollenberger L., 2003, “Effects of three PBDEs on development, reproduction and

population growth rate of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*". *Aquatic Toxicology* 64, 85-96.

Breitholtz M., Wollenberger L., Dinan L., 2003, "Effects of four synthetic musks on the life cycle of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*". *Aquatic Toxicology* 63: 103-118.

Brown R.J., Conradi M., Depledge M.H., 1999, "Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766)." *The Science of the Total Environment*. 233: 77-88.

Brunson, M.W., Wilson, E.A., Goodfellow, W.L., 1985, "Acute and chronic toxicity methiocarb to selected aquatic organisms." *Annu. Prog. Rep. - Louisiana Agric. Exp. Stn.*

Bryant V., McLusky D.S., Roddie K., Newberry D.M., 1984, "Effect of the temperature and salinity on the toxicity of chromium to three estuarine invertebrates (*Corophium volutator*, *Macoma baltica*, *Nereis diversicolor*)." *Marine Ecology Progress Series* 20: 137-149.

Bryant V., McLusky D.S., Campbell R., Newberry D.M., 1985a, "Effect of temperature and salinity on the toxicity of arsenic to three estuarine invertebrates (*Corophium volutator*, *Macoma baltica*, *Tubifex costatus*)." *Marine Ecology Progress Series* 24: 129-137

Bryant V., Newberry D.M., McLusky D.S., Campbell R., 1985b, "Effect of temperature and salinity on the toxicity of nickel and zinc to two estuarine invertebrates (*Corophium volutator*, *Macoma baltica*)." *Marine Ecology Progress Series* 24: 139-153

Bushong S.J., Hall L.W. Jr., Hall W.S., Johnson W.E., Herman R.L., 1988, "Acute toxicity of tributyltin to selected Chesapeake Bay fish and invertebrates". *Water Research* 22: 1027-1033.

Chen M., 1991, "Comparative study of the toxicity of γ -HCH to *Acartia tonsa*". *Oceanologia et Limnologia Sinica/Haiyang Yu Huzhao* 22: 215-220. English abstract

Camatti E., 2000, "*Acartia tonsa* Dana: una specie di ambienti ad elevata trofia, di recente introduzione nel plancton della Laguna di Venezia. Abbondanza e morfometria." *Informatore Botanico Italiano* 32, 41-46.

Ciarelli S., Vonck W.A.P.M.A., van Straalen N.M., 1997, "Reproducibility of spiked-sediment bioassays using the marine benthic amphipod *Corophium volutator*." *Marine Environmental Research* 43: 329-343.

- Cruz-Alcade A., Sans C., Esplugas S., 2017, "Exploring ozonation as treatment alternative for methiocarb and formed transformation products abatement". *Chemosphere* 186, 725-732.
- Erdem M., Meadows C.S., 1980, "The influence of mercury on the burrowing behavior of *Corophium volutator*." *Marine Biology* 56: 233-237
- Faraponova O., De Pascale D., Onorati F., Finora M.G., 2005, "*Tigriopus fulvus* (Copepoda, Harpacticoida) as a target species in biological assays." *Meiofauna Marina* 14: 91-95
- Forget-Leray J., Landriau I., Minier C. & Leboulenger F., 2005, "Impact of endocrine disruptors on survival, development and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe)". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 288-294.
- Geissen V., Mol H., Klumpp E., Umlauf G., Nadal M., van der Ploeg M., van de Zee S. E. A. T. M., Coen J. Ritsema, 2015, "Emerging pollutants in the environment: a challenge for water resources management". *International Soil and Water Conservation Research* 3(1), 57-65.
- Hook S.E., Doan H., Gonzago D., Musson D., Du J., Kookana R., Sellars M.J., Kumar A., 2018, "The impacts of modern-use pesticides on shrimp aquaculture: An assessment for north eastern Australia", *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148, 770-780
- Hutchinson T.H., Pounds N.A., Hampel M., Williams T.D., 1999a, "Life-cycle studies with marine copepods (*Tisbe battagliai*) exposed to 20-hydroxyecdysone and diethylstilbestrol." *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(12): 2914-2920.
- Hutchinson T.H., Pounds N.A., Hampel M., Williams T.D., 1999b, "Impact of natural and synthetic steroids on the survival, development and reproduction of marine copepods (*Tisbe battagliai*)." *The Science of the Total Environment*, 233: 167-179.
- Ingersoll C.G., 1995, "Sediment tests. In G.M. Rand (Editor): *Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environmental fate, and risk assessment.*" Second edition. Taylor & Francis, pp. 231-255.
- ISO (international standard Organization), 1999, "Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea)" ISO 14669:1999(E).
- ISO (international standard Organization), 2005, "Water quality – Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods. ISO 16712:2005(E).

Kusk K.O., Petersen S., 1997, "Acute and chronic toxicity of tributyltin and linear alkylbenzene sulfonate to the marine copepod *Acartia tonsa*". Environmental Toxicology and Chemistry 16: 1629-1633

Kusk K.O., Wollenberger, L., 2005, "OECD Draft Guidelines for testing chemicals – Proposal for a new guideline: Calanoid copepod development and reproduction test with *Acartia tonsa*." Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

Lussier S., Cardin J.A., 1985a, "Results of acute toxicity tests conducted with zinc at ERL, Narragansett." U.S. EPA, Narragansett, RI, 6pp.

Lussier S., Cardin J.A., 1985b, "Results of acute toxicity tests conducted with copper at ERL, Narragansett." U.S. EPA, Narragansett, RI, 6pp.

Marcial H.S., Hagiwara A., Snell T.W., 2003, "Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*." Environmental Toxicology and Chemistry, 22(12): 3025-3030.

Onorati F., Bigongiari N., Pellegrini D., Giuliani S., 1999, "The suitability of *Corophium orientale* (Crustacea, Amphipoda) in harbour sediment toxicity bioassessment." Aquatic Ecosystem Health and Management 2: 465-473.

Oosterberg J.S., Darnell K.M., Blickley T.M., Romano J.A., Rittschof D., 2012, "Acute toxicity and sub-lethal effects of common pesticides in post-larval and juvenile blue crabs, *Callinectes sapidus*", Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 424-425, 5-14.

Picone M., Bergamin M., Delaney E., Volpi Ghirardini A., 2018a, "Assessment of whole-sediment chronic toxicity using sub-lethal endpoints with *Monocorophium insidiosum*". Ecotoxicology 27(9), 1237-1248.

Picone M., Bergamin M., Delaney E., Volpi Ghirardini A., Kusk K.O., 2018b, "Testing lagoonal sediments with early life stages of the copepod *Acartia tonsa* (Dana): An approach to assess sediment toxicity in the Venice Lagoon". Ecotoxicology and Environmental Safety 147, 217-227.

Pisa L.W., Amaral-Rogers V., Belzunces L.P., Bonmatin J.M., Downs C.A., Goulson D., Kreuzweiser D.P., Krupke C., Liess M., McField M., Morrissey C.A., Noome D.A., Settele J., Simon-Delso N., Stark J.D., Van der Sluijs J.P., Van Dyck H., Wiemers M., 2015, "Effects of

neonicotinoids and Fipronil on non-target invertebrates". Environmental Science Pollution Research 22, 68-102.

Plesha D.P., Stein J.E., Schiewe M.H., McCaine B.B., Varanasi U., 1988, "Toxicity of marine sediments supplemented with mixtures of selected chlorinated and aromatic hydrocarbons to the infaunal amphipod *Rhepoxynius abronius*." Marine Environmental Research 25: 85-97.

Prato E., Biandolino F., Scardicchio C., 2006, "Test for acute toxicity of copper, cadmium, and mercury in five marine species". Turkish Journal of Zoology 30, 285-290.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2002, "Short-term methods for estimate the chronic toxicity of effluents and receiving water to marine and estuarine organisms". EPA 821/R-02/014.

Reichert W.L., Eberhart B.L., Varanasi U., 1985, "Exposure of two species of deposit-feeding amphipods to sediment-associated 3(H)benzo(A)pyrene: uptake, metabolism and covalent binding to tissue macromolecules." Aquatic toxicology 5: 245-253.

Song M.Y., Stark J.D., Brown J.J., 1997, "Comparative toxicity of four insecticides, including imidacloprid and tebufenozide, to four aquatic arthropods" Environmental Toxicology and Chemistry. 16, 2494-2500. Doi:10.1002/etc.5620161209

Sosnowski S.L., Gentile J.H., 1978, "Toxicological comparison of natural and cultured populations of *Acartia tonsa* to cadmium, copper and mercury." Journal of the Fisheries Research Board of Canada 35: 1366-1369

Sosnowski S.L., Germond D.J., Gentile J.H., 1979, "The effect of nutrition on the response of field populations of the calanoid copepod *Acartia tonsa* to copper." Water Research 13: 449-452.

Thompson C.Q. Jr., 1989, "Toxicity of the organophosphate insecticide Fenthion, alone and with thermal fog carriers to estuarine copepod and young fish." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 43: 789-796

U'Ren S.C., 1983, "Acute toxicity of Bis(Tributyltin)oxide to a copepod". Marine Pollution Bulletin 14: 303-306.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1992, "Chesapeake Bay Program. Development of a Chronic sediment toxicity test for marine benthic amphipods". December 1992. EPA 903/R-92/002.

USEPA, 2000 “Pesticide Ecotoxicity database. Environmental Fate and Effects Division”. USEPA, Washington D.C. <https://ecotox.ipmcenters.org/>

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2001, “Method for assessing the chronic toxicity of marine and estuarine sediment-associated contaminants with the amphipod *Leptocheirus plumulosus*”. EPA 600/R-01/020.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2002, “Short-term methods for estimate the chronic toxicity of effluents and receiving water to marine and estuarine organisms”. EPA 821/R-02/014.

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.

Warmhoff H., Schneider V., 1999, “Photodegradation of Imidacloprid”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (4), 1730-1734.

Wollenberger L., 2005, “Toxicity tests with crustaceans for detecting sublethal effects of potential endocrine disrupting chemicals” Ph.D thesis, Technical University of Denmark, Lyngby.

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

Wollenberger L., Dinan L., Breitholtz M., 2005, “Brominated flame retardants: activities in a crustacean development test and in an ecdysteroid screening assay”. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 400-407.

Wood T.J., Goulson D., 2017, “The environmental risks of neonicotinoids pesticides: a review of the evidence post 2013” *Environmental Science and Pollution Research* 24, 17285-17325 doi:10.1007/s11356-017-9240-x.

Appendice

Dati grezzi dei test su methiocarb con *M. insidiosum*

	Concentrazione	n. sopravvissuti						totale	% mortalità
		R1	R2	R3	R4	R5	R6		
test preliminare	1 $\mu\text{g L}^{-1}$	4	5	5	5	4	5	<u>28</u>	7%
	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	5	5	5	4	5	5	<u>29</u>	3%
	100 $\mu\text{g L}^{-1}$	1	2	0	0	2	1	<u>6</u>	80%
	1000 $\mu\text{g L}^{-1}$	0	0	0	0	0	0	<u>0</u>	100%
EC₅₀ = 52 $\mu\text{g L}^{-1}$ (43-63)								-	-

	Concentrazione	n. sopravvissuti						totale	% mortalità
		R1	R2	R3	R4	R5	R6		
test n. 1	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	5	5	4	5	4	5	<u>28</u>	7%
	20 $\mu\text{g L}^{-1}$	5	5	5	5	4	5	<u>29</u>	3%
	40 $\mu\text{g L}^{-1}$	5	5	5	3	5	2	<u>25</u>	17%
	80 $\mu\text{g L}^{-1}$	2	2	2	3	4	2	<u>15</u>	50%
	160 $\mu\text{g L}^{-1}$	2	4	3	0	1	1	<u>11</u>	63%
	320 $\mu\text{g L}^{-1}$	0	1	1	0	0	0	<u>2</u>	93%
EC₅₀ = 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ (65-87)								-	-

	Concentrazione	n. sopravvissuti						totale	% mortalità
		R1	R2	R3	R4	R5	R6		
test n. 2	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	3	5	4	3	4	5	<u>22</u>	27%
	20 $\mu\text{g L}^{-1}$	3	5	5	5	5	5	<u>28</u>	7%
	40 $\mu\text{g L}^{-1}$	4	1	4	3	2	4	<u>18</u>	40%
	80 $\mu\text{g L}^{-1}$	2	1	1	2	2	2	<u>10</u>	67%
	160 $\mu\text{g L}^{-1}$	1	0	1	1	1	0	<u>4</u>	87%
	320 $\mu\text{g L}^{-1}$	0	0	0	0	2	1	<u>3</u>	90%
EC₅₀ = 68 $\mu\text{g L}^{-1}$ (59-78)								-	-

Dati grezzi dei test su imidacloprid con *M. insidiosum*

	Concentrazione	n. sopravvissuti						% mortalità	
		R1	R2	R3	R4	R5	R6		totale
test preliminare	200 µg L ⁻¹	5	5	4	5	6	4	<u>29</u>	12%
	400 µg L ⁻¹	5	5	6	4	4	5	<u>29</u>	6%
	800 µg L ⁻¹	4	4	4	3	5	7	<u>27</u>	16%
	1600 µg L ⁻¹	4	6	4	4	5	5	<u>28</u>	13%
EC₅₀ > 1600 µg L⁻¹								-	

	Concentrazione	n. sopravvissuti						% mortalità	
		R1	R2	R3	R4	R5	R6		totale
test n. 1	156 µg L ⁻¹	2	5	4	5	5	1	<u>22</u>	27%
	312 µg L ⁻¹	4	3	4	4	4	5	<u>24</u>	20%
	625 µg L ⁻¹	5	4	5	7	4	5	<u>30</u>	9%
	1250 µg L ⁻¹	4	2	4	3	4	5	<u>22</u>	27%
	2500 µg L ⁻¹	1	5	4	2	4	3	<u>19</u>	37%
	5000 µg L ⁻¹	1	2	4	3	3	3	<u>16</u>	47%
EC₅₀ > 5000 µg L⁻¹									

	Concentrazione	n. sopravvissuti						% mortalità	
		R1	R2	R3	R4	R5	R6		totale
test n. 2	156 µg L ⁻¹	1	3	4	4	4	5	<u>21</u>	32%
	312 µg L ⁻¹	4	4	3	3	4	1	<u>19</u>	39%
	625 µg L ⁻¹	4	5	3	4	4	4	<u>24</u>	23%
	1250 µg L ⁻¹	2	3	4	3	2	1	<u>15</u>	50%
	2500 µg L ⁻¹	1	0	1	3	3	1	<u>9</u>	70%
	5000 µg L ⁻¹	3	2	3	3	0	3	<u>14</u>	53%
EC₅₀ > 5000 µg L⁻¹									

Dati grezzi dei test acuti a 24-h con *A. tonsa*

	methiocarb	TOTALE			M(%)
		n. vivi	n. totale	% sopravvivenza	
test a 24-h	Controllo	20	21	95	-
	Bianco procedurale	15	20	75	<u>21%</u>
	10 µg L ⁻¹	14	20	70	27%
	20 µg L ⁻¹	12	20	60	37%
	40 µg L ⁻¹	16	22	73	24%
	80 µg L ⁻¹	15	20	75	21%
	160 µg L ⁻¹	14	20	70	27%
	320 µg L ⁻¹	14	21	67	30%
	640 µg L ⁻¹	3	21	14	85%
	1280 µg L ⁻¹	1	20	5	95%
	24-h EC ₅₀ = 474 µg L ⁻¹ (419 - 537)				

	imidacloprid	TOTALE			M(%)
		n. vivi	n. totale	% sopravvivenza	
test a 24-h	Controllo	19	20	95	-
	40 µg L ⁻¹	19	25	76	20%
	80 µg L ⁻¹	13	22	59	38%
	160 µg L ⁻¹	17	28	61	36%
	320 µg L ⁻¹	13	27	48	49%
	640 µg L ⁻¹	14	23	61	36%
	1280 µg L ⁻¹	12	21	57	40%
	2560 µg L ⁻¹	14	28	50	47%
	24-h EC ₅₀ > 2560 µg L ⁻¹				

Dati grezzi dei test acuti a 48-h con *A. tonsa*

	methiocarb	TOTALE			M(%)
		n. vivi	n. totale	% sopravvivenza	
test a 48-h	Controllo	18	20	90	-
	Bianco procedurale	13	20	65	28%
	5 µg L ⁻¹	8	10	80	11%
	10 µg L ⁻¹	6	10	60	33%
	20 µg L ⁻¹	7	11	64	29%
	40 µg L ⁻¹	6	10	60	33%
	80 µg L ⁻¹	12	20	60	33%
	160 µg L ⁻¹	7	21	33	63%
	48-h EC₅₀ = 147 µg L⁻¹ (125 - 173)				

	imidacloprid	TOTALE			M(%)
		n. vivi	n. totale	% sopravvivenza	
test a 48-h	Controllo	18	20	90	-
	40 µg L ⁻¹	7	14	50	44%
	80 µg L ⁻¹	6	10	60	33%
	160 µg L ⁻¹	6	11	55	39%
	320 µg L ⁻¹	1	27	4	96%
	640 µg L ⁻¹	1	23	4	95%
	1280 µg L ⁻¹	0	21	0	100%
	2560 µg L ⁻¹	0	28	0	100%
	48-h EC₅₀ = 184 µg L⁻¹ (166 - 203)				

Dati grezzi del test LDR con *A. tonsa*

	replica	early-file stages recuperati			LDR
		uova	naupli	copepoditi	
Controllo	R1	7	15	26	0,634
	R2	6	19	41	0,683
	R3	5	18	34	0,654
	R4	4	11	17	0,607
	R5	8	26	35	0,574
	R6	7	24	38	0,613
	R7	4	23	34	0,596
	R8	3	12	32	0,727
	R9	5	17	29	0,630
	R10	7	15	36	0,706
	R11	5	24	40	0,625
	R12	8	17	23	0,575
10 ng L ⁻¹	R1	5	19	23	0,548
	R2	10	20	38	0,655
	R3	2	23	32	0,582
	R4	5	15	30	0,667
	R5	-	-	-	-
	R6	9	32	40	0,556
100 ng L ⁻¹	R1	6	32	27	0,458
	R2	13	24	29	0,547
	R3	9	28	32	0,533
	R4	7	20	33	0,623
	R5	7	23	22	0,489
	R6	4	18	20	0,526
1.000 ng L ⁻¹	R1	4	27	30	0,526
	R2	6	23	20	0,465
	R3	4	22	37	0,627
	R4	-	-	-	-
	R5	4	12	18	0,600
	R6	3	26	21	0,447
10.000 ng L ⁻¹	R1	14	32	16	0,333
	R2	5	45	8	0,151
	R3	3	29	21	0,420
	R4	3	38	17	0,309
	R5	4	32	14	0,304
	R6	11	46	7	0,132
100.000 ng L ⁻¹	R1	9	53	6	0,102
	R2	11	35	8	0,186
	R3	4	59	5	0,078
	R4	8	61	1	0,016
	R5	7	43	0	0,000
	R6	6	43	3	0,065

Analisi della varianza condotta sui dati del test LDR con *A. tonsa*

Test di omogeneità delle varianze					
		Statistica di Levene	gl1	gl2	Sign.
LDR	Basato sulla media	1,972	5	35	,107
	Basato sulla mediana	,979	5	35	,444
	Basato sulla mediana e con il grado di libertà adattato	,979	5	17,879	,457
	Basato sulla media ritagliata	1,973	5	35	,107

ANOVA					
LDR					
	Somma dei quadrati	gl	Media quadratica	F	Sign.
Tra gruppi	1,646	5	,329	69,733	,000
Entro i gruppi	,165	35	,005		
Totale	1,811	40			

Confronti multipli						
Variabile dipendente: LDR						
T di Dunnett (bilaterale) ^a						
(I) Trattamento	(J) Trattamento	Differenza della media (I-J)	Errore std.	Sign.	Intervallo di confidenza 95%	
					Limite inferiore	Limite superiore
10,00	,00	-,03013	,03435	,883	-,1221	,0619
100,00	,00	-,10611*	,03435	,018	-,1981	-,0141
1000,00	,00	-,10236*	,03657	,037	-,2003	-,0044
10000,00	,00	-,36047*	,03435	,000	-,4525	-,2685
100000,00	,00	-,56090*	,03435	,000	-,6529	-,4689

*. La differenza della media è significativa al livello 0.05.

a. I test t di Dunnett trattano un gruppo come un controllo e lo confrontano tutti gli altri gruppi.