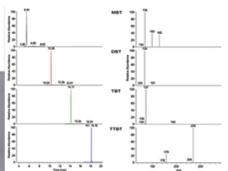




ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



I COMPOSTI
ORGANOSTANNICI
IN AMBIENTE MARINO
E LAGUNARE

RICERCA MARINA



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

I COMPOSTI ORGANOSTANNICI IN AMBIENTE MARINO E LAGUNARE

Informazioni legali

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

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 - 00144 Roma
www.isprambiente.gov.it

ISPRA, Quaderni - Ricerca Marina 8/2016

ISBN 978-88-448-0760-3

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

ISPRA

Grafica di copertina: Ufficio Grafica ISPRA

Foto di copertina: Randen Pederson, Federica Cacciatore, Camilla Antonini

Referenze fotografiche: Federica Cacciatore e Camilla Antonini (dove non specificato)

Coordinamento editoriale:

Daria Mazzella

ISPRA - Settore Editoria

[MARZO 2016]

Da citare come:

Berto D., Boscolo Brusà R. (A cura di), 2015. I Composti Organostannici in ambiente marino e lagunare. ISPRA, QUADERNI – Ricerca Marina n. 8/2016, Roma, pp 117.

Autori

Camilla ANTONINI

Daniela BERTO

Rossella BOSCOLO BRUSÀ

Federica CACCIATORE

Malgorzata FORMALEWICZ

Claudia GION

Seta NOVENTA

INDICE

PRESENTAZIONE	p. 6
1. Origine, distribuzione ed effetti dei composti organostannici	p. 8
1.1: Struttura e principali proprietà dei composti organostannici	p. 8
1.2: Origine e usi degli organostannici (OTC)	p. 10
1.3: Comportamento ambientale e distribuzione in ambiente marino e lagunare	p. 15
1.3.1: <i>Acqua</i>	<i>p. 16</i>
1.3.2: <i>Sedimento</i>	<i>p. 18</i>
1.3.3: <i>Biota</i>	<i>p. 19</i>
1.4: Effetti sugli organismi	p. 20
1.5: Esposizione ed effetti sulla salute umana	p. 25
2. Le norme e i limiti per gli organostannici	p. 29
2.1: Regolamentazione delle vernici antivegetative a base di TBT	p. 29
2.1.1: <i>Iniziative legislative delle singole Nazioni</i>	<i>p. 29</i>
2.1.2: <i>Iniziative legislative europee ed internazionali</i>	<i>p. 30</i>
2.2: TBT nella normativa ambientale	p. 31
2.2.1: <i>TBT e Direttiva Quadro sulle Acque (WFD)</i>	<i>p. 31</i>
2.2.2: <i>TBT nella Direttiva sulla Strategia Marina (MSFD): Descrittore 8</i>	<i>p. 32</i>
3. Campionamento e metodi di determinazione analitica	p. 34
3.1.1: <i>Acqua</i>	<i>p. 34</i>
3.1.2: <i>Sedimento</i>	<i>p. 34</i>
3.1.3: <i>Biota</i>	<i>p. 35</i>
3.2: Metodi analitici	p. 37
3.2.1: <i>Estrazione</i>	<i>p. 37</i>
3.2.2: <i>Derivatizzazione</i>	<i>p. 43</i>
3.2.3: <i>Purificazione</i>	<i>p. 44</i>
3.2.4: <i>Tecniche di determinazione strumentale</i>	<i>p. 45</i>
3.2.5: <i>Solid Phase Microextraction (SPME)</i>	<i>p. 56</i>
4. Metodi di valutazione degli effetti sui molluschi	p. 64
4.1: Bivalvi	p. 64
4.2: Gasteropodi	p. 66
4.2.1: <i>Nassaridi</i>	<i>p. 67</i>
4.2.2: <i>Muricidi</i>	<i>p. 68</i>
4.3: Bioaccumulo	p. 70

<i>4.2.2: Indici generali per la valutazione del bioaccumulo</i>	<i>p. 71</i>
4.4: Imposex	p. 76
BIBLIOGRAFIA	p. 90
RIFERIMENTI LEGISLATIVI	p.116
Scheda Tecnica 1 - Metodica utilizzata nei laboratori della STS ISPRA di Chioggia per la determinazione di composti organostannici in biota, sedimento e acque sia marine che lagunari.	p. 47
Scheda Tecnica 2 - Valutazione dell'imposex in gasteropodi cenogasteropodi	p. 78

Presentazione

di Anna Maria Cicero e Massimo Gabellini

Il presente Quaderno è stato redatto per raccogliere in modo unitario le informazioni di base, di natura tecnica, scientifica e normativa, relative ai composti organostannici (OTC). Il lavoro non si rivolge esclusivamente ad un pubblico specializzato e pertanto è stato redatto con un taglio divulgativo per facilitarne la comprensione, pur rimanendo fedele alla sua funzione di strumento di studio o analisi per lettori del settore scientifico e per il personale delle Pubbliche Amministrazioni o strutture private interessati alle problematiche di tale classe di inquinanti.

Questo volume è il frutto dell'attività decennale della Struttura Tecnico Scientifica ISPRA di Chioggia rivolta a tali composti, che ha visto nel corso degli anni una ricca raccolta bibliografica, la messa a punto di metodi analitici chimici, l'analisi di numerosi campioni lagunari e costieri di differenti matrici ambientali, la valutazione degli effetti negli organismi biologici, il contributo specialistico nell'implementazione della normativa nazionale e la predisposizione e attuazione di piani di monitoraggio ambientale.

Nel **Capitolo 1** viene trattata l'origine, la chimica, la distribuzione e gli effetti dei composti organostannici. Gli OTC sono un gruppo di composti organometallici caratterizzati da un atomo di stagno (Sn) legato covalentemente ad uno o più sostituenti organici. Essi costituiscono una classe eterogenea molto ampia di composti (più di 800 sostanze) che ha visto il culmine della loro produzione a scala industriale tra gli anni '50 e '90. I possibili impieghi di tali composti furono come biocidi nelle vernici antivegetative e stabilizzanti di materiali plastici. Gli OTC sono stati definiti come "i composti più tossici deliberatamente introdotti in ambiente marino" (Goldberg et al., 1978). La loro tossicità dipende dal numero di gruppi organici legati all'atomo di stagno. I composti trisostituiti (R_3SnX) rappresentano le forme più tossiche, con una tossicità che aumenta all'aumentare del numero di atomi di carbonio nella parte organica. I composti più tossici sono dunque il tributilstagno (TBT) e il trifenilstagno (TPhT) (Sousa et al., 2014).

A causa dell'estensivo uso degli OTC in numerose applicazioni, tali inquinanti sono stati ritrovati in tutti gli ecosistemi acquatici, anche se le concentrazioni più elevate sono proprie degli ambienti marino-costieri e lagunari. I composti organostannici sono sostanze estremamente tossiche per un ampio range di organismi, dai batteri ai mammiferi, inclusi gli esseri umani. Il primo caso conclamato dell'evidente tossicità del TBT fu registrato nella Baia di Arcachon, un'insenatura chiusa, situata nella costa Atlantica della Francia e caratterizzata dalla presenza di numerosi impianti di allevamento di ostriche della specie *Crassostrea gigas*. Più o meno nello stesso periodo, Blaber (1970) registrò l'anomala presenza del pene nelle femmine del gasteropode gonocorico *Nucella lapillus* presenti nella baia di Plymouth, situata nella costa sud-occidentale dell'Inghilterra. Tale condizione si presentava con maggiore gravità negli organismi raccolti all'interno dei porti e più lieve allontanandosi da essi. Questo fenomeno fu osservato in altri siti e in altre specie di gasteropodi a sessi separati. Per riferirsi a tale anomalia venne coniato il termine "imposex", ma ancora a quel tempo la causa del fenomeno rimaneva sconosciuta. Fu grazie ai lavori e studi effettuati sia in campo che in laboratorio da Smith (1981a,b,c,d) che venne finalmente trovata la causa relazionale tra TBT ed imposex, confermata poi da Bryan et al. (1987) sulla specie *N. lapillus*.

Nel **Capitolo 2** sono elencate e descritte le norme e i limiti per gli organostannici a livello nazionale, europeo e mondiale. Le prime iniziative volte a ridurre il rilascio massivo di TBT dai rivestimenti a protezione degli scafi delle imbarcazioni e a contrastare gli effetti tossici indotti sulle biocenosi marine furono prese dai singoli Stati in modo indipendente. La Francia fu la prima a limitare l'uso, la produzione e la vendita di vernici a base di TBT, in quanto il settore della molluschicoltura particolarmente sviluppato nella Regione Atlantica subì, tra il 1975 e il 1982, significative perdite economiche a causa delle malformazioni delle conchiglie delle ostriche indotte dal TBT. A seguire anche altri stati proibirono l'utilizzo delle vernici antivegetative. Nel 2001 l'IMO (International Maritime Organization) adottò la Convention on the Control of Harmful Anti-fouling System on Ships, nota come Convenzione AFS, che proibì sia nuove applicazioni di vernici antivegetative a base di TBT a partire dal 1 gennaio 2003, sia la presenza delle stesse sulla superficie degli scafi e delle strutture sommerse a partire dal 1 gennaio 2008. Tuttavia, nonostante la definitiva messa al bando del TBT come agente antivegetativo, rimane oggi l'esigenza di proseguire il monitoraggio dei livelli dei composti organostannici negli ambienti acquatici, data l'elevata persistenza e la loro biomagnificazione lungo la catena alimentare (EPA, 2002; Fortibuoni et al., 2013). Infatti, le concentrazioni attualmente rilevate nelle matrici marine costituiscono ancora una minaccia per la salute degli ecosistemi acquatici, in quanto superiori alla concentrazione minima capace di indurre effetti tossici.

In Unione Europea, il TBT è inserito tra gli inquinanti degli ambienti acquatici disciplinati dalla Direttiva Quadro 2000/60/CE (Water Framework Directive, WFD) ed è considerato una sostanza prioritaria, più precisamente del sottogruppo delle sostanze pericolose prioritarie, per le quali è posto come obiettivo la completa eliminazione di scarico, emissione e perdita. Inoltre il TBT è tra le sostanze inserite nella Direttiva sulla Strategia Marina (MSFD); in particolare è tra gli elementi che devono essere considerati per stabilire il raggiungimento del Descrittore 8.

Nel **Capitolo 3** sono riportati i dettagli relativi al campionamento, trattamento e conservazione dei campioni, e i metodi di analisi degli OTC in differenti matrici quali acqua, sedimento e biota. Viene riportata in modo dettagliato la metodica GC/MS utilizzata nei laboratori della STS ISPRA di Chioggia. Inoltre viene descritta la tecnica di microestrazione in fase solida (Solid Phase Microextraction, SPME) recentemente in uso presso i laboratori ISPRA di Chioggia, un'opzione alternativa per estrarre velocemente ed efficacemente riducendo notevolmente il consumo di reagenti.

Nel **Capitolo 4** sono affrontati i metodi di valutazione degli effetti degli OTC sui molluschi. Questi organismi sono comunemente usati nei programmi di monitoraggio ambientale, su scala mondiale, per misurare i livelli di inquinamento e gli effetti dei contaminanti sul biota, in quanto possiedono molte caratteristiche che li rendono idonei come bioindicatori. In particolare, gli effetti degli OTC sul sistema endocrino di molte specie di molluschi appartenenti alle classi Bivalvia e Gastropoda sono utilizzati per la valutazione della contaminazione ambientale da OTC. In tali organismi, essendo dei buoni bioaccumulatori, possono essere calcolati degli indici generali per la valutazione del bioaccumulo quali l'Indice Contaminante/Peso della Conchiglia e l'Indice di Condizione, oltre a biomarker generici quali il test della sopravvivenza in aria, il test di infossamento. Viene infine descritto l'imposex quale biomarker specifico per il TBT e i suoi composti.

1 ORIGINE, DISTRIBUZIONE ED EFFETTI DEI COMPOSTI ORGANOSTANNICI

1.1 Struttura e principali proprietà dei composti organostannici

I composti organostannici costituiscono un gruppo di composti organometallici caratterizzati da un atomo di stagno [Sn] legato covalentemente ad uno o più sostituenti organici. Chimicamente questi composti sono rappresentati dalle seguenti formule: $R_nSnX_{(n-1)}$, in cui R indica un gruppo alchilico o arilico e X una specie anionica (es. alogenuro, ossido, ossidrilico, acetato, ecc.) (Figura 1).



Figura 1. Formula generale e di struttura dei composti organostannici (tratto da Blunden e Evans, 1990). R: gruppo alchilico (es. metil-, butil-, cicloesil- o arilico (es. fenil-); X: gruppo anionico (es. cloruro, fluoruro, ossido, ossidrilico, acetato, carbonato, ecc.).

La prima sintesi di composti organostannici fu ad opera di Edward Frankland nel 1853, ma solo nel 1940, dopo l'individuazione di possibili impieghi commerciali come biocidi e stabilizzanti di materiali plastici, iniziò una vera e propria produzione su scala industriale, che culminò tra gli anni '50 e '90. Ciò fu dovuto soprattutto al massiccio utilizzo dei composti trisostituiti nelle vernici antivegetative (nello specifico tributilstagno, TBT) e nelle formulazioni di pesticidi (trifenilstagno, TPhT). In Figura 2 sono rappresentati i diversi meccanismi di alchilazione dello stagno, ancora utilizzati tutt'oggi nella sintesi industriale dei composti organostannici.

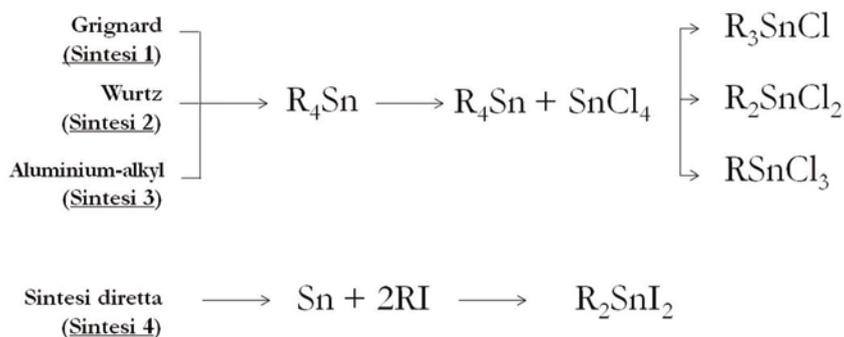


Figura 2. Reazioni di sintesi dei composti organostannici (modificato da Blunden e Evans, 1990). R: gruppo alchilico (es. metil-, butil-, cicloesil-).

I composti organostannici costituiscono una classe eterogenea molto ampia di composti (più di 800 sostanze) le cui proprietà chimico-fisiche, l'attività biologica e il comportamento in ambiente dipendono in larga misura dal grado di alchilazione/ arilazione e, secondariamente, dalla natura della specie anionica. In generale il legame Sn-C risulta stabile in ambiente acquoso, in presenza di ossigeno atmosferico e di calore [Zuckerman et al., 1978; Hoch, 2001], mentre le radiazioni (ultraviolette e raggi γ), come pure gli acidi forti e i composti elettrofili possono scinderlo rapidamente. Con l'allungarsi della catena alchilica e con l'aumentare del numero dei sostituenti organici, la solubilità in acqua diminuisce, mentre aumenta nei solventi organici poco polari e nei lipidi [Hoch, 2001 e autori citati]. La solubilità di questi composti, tuttavia, dipende anche dalle condizioni di pH, temperatura e forza ionica che caratterizzano la matrice circostante. Per esempio, la solubilità risulta minima a pH neutro, mentre incrementa con l'aumentare dell'acidità. Nella Tabella 1 sono riportate le principali caratteristiche chimico-fisiche di alcuni composti organostannici.

Tabella 1. Proprietà chimico-fisiche di alcuni composti organostannici (Gmelin, 1978; Bluden e Chapman, 1986). Abbreviazioni: nessuna informazione (ni), dati non disponibili (nd). [a]: solubilità in acqua di mare; [b]: solubilità in acqua distillata.

	Temperatura di fusione (°C)	Temperatura di ebollizione (°C)	Densità (g/cm³)	Solubilità (mg Sn/L)
Tetrabutilstagno	-97	145	1.06	ni
Tributilstagno cloruro	-16	172	1.21	30-70 ^a 5-17 ^b
Dibutilstagno cloruro	39-41	135	nd	4-50 ^a
Monobutilstagno cloruro	ni	93	1.69	ni
Trimetilstagno cloruro	37-39	154	nd	
Dimetilstagno cloruro	106-108	188-190	nd	
Monometilstagno cloruro	48-51	171	nd	2000 ^a

Parallelamente al crescente utilizzo dei composti organostannici in diversi settori produttivi, si registrò una progressiva contaminazione ambientale, in particolare degli ecosistemi acquatici, per diretto rilascio di tali composti (in particolare di TBT) dalle vernici antivegetative oppure per percolazione delle acque di scolo dei terreni agricoli.

I composti organostannici in ambiente si connotano per una certa stabilità, dovuta alla forza dei legami covalenti Sn-C. La degradazione si basa sulla rimozione progressiva dei gruppi alchilici legati all'atomo di stagno, secondo lo schema seguente:



La degradazione può avvenire attraverso processi abiotici e biotici.

I fattori abiotici più significativi sono l'irradiazione solare e gli agenti chimici (Gadd, 2000). Per quanto riguarda i fattori biotici, diversi studi sperimentali sembrano indicare che la degradazione da parte dei microrganismi rivesta un ruolo rilevante, in particolare da parte di batteri (Dubey e Roy, 2003), diverse specie di funghi (Bernat e Dlugonski, 2006) e microalghe (diatomee e flagellati; Lee et al., 1989).

La tossicità dei composti organostannici dipende dal numero di gruppi organici legati all'atomo di stagno. I composti trisostituiti (R_3SnX) rappresentano le forme più tossiche, con una tossicità che aumenta al crescere del numero di atomi di carbonio nella parte organica. I composti più tossici sono dunque il tributilstagno (TBT) e il trifenilstagno (TPHT) (Sousa et al., 2014). Il TBT, l'agente biocida delle vernici antivegetative, è stato definito da Goldberg (1986) come "probabilmente il composto chimico più tossico deliberatamente introdotto in acqua dalla società".

1.2 Origine e usi degli organostannici (OTC)

Le principali applicazioni degli OTC sono riportate nella Tabella 2.

I composti butilici mono- e di- sostituiti (MBT e DBT) furono principalmente utilizzati a partire dagli anni '40 come stabilizzanti del PVC per ridurre la degradazione del polimero causata da calore e luce (Blunden e Chapman, 1986; Lawson, 1986). Altre importanti applicazioni hanno riguardato il loro uso come catalizzatori (sintesi di schiume di poliuretano, sia rigide che flessibili), additivi nelle gomme al silicone, nei trattamenti di impermeabilizzazione della carta e dei tessuti, ed in alcuni farmaci veterinari, come gli antielmintici per il pollame (Hoch, 2001 e autori riportati).

I composti trisostituiti dello stagno, in particolare trifenilstagno e tricicloesilstagno, trovarono larga applicazione come agenti biocidi in agricoltura, grazie alla bassa fitotossicità e all'elevata capacità selettiva antiparassitaria (Hoch, 2001). La Tabella 3 ne riporta alcuni esempi, specificando il tipo di azione, le principali colture di destinazione e il nome commerciale.

Oltre a questi impieghi, a partire dagli anni '60 gli ossidi di tributilstagno e trifenilstagno furono introdotti nelle formulazioni di prodotti per la preservazione del legno, poi parzialmente sostituiti negli anni '80 da sostanze alternative meno nocive (Hoch, 2001 e autori citati). Tuttavia, come già accennato, il maggior utilizzo dei composti organostannici, a livello mondiale, è stato rappresentato dall'uso del TBT come agente biocida nelle vernici antivegetative. L'estrema varietà delle comunità degli organismi che danno luogo al *biofouling* (Box 1) determina l'esigenza di impiegare biocidi ad ampio spettro d'azione e di lunga durata, caratteristiche tipiche del TBT. In quegli anni, le vernici antivegetative a base di TBT (Box 2) soppiantarono, dunque, quelle tradizionali a base di rame e furono su grande scala applicate agli scafi di navi ed imbarcazioni, alle banchine, alle vasche di raffreddamento di impianti industriali e centrali elettriche e ad ogni altra struttura sommersa (es.: per la pesca e acquacoltura, cavi telefonici ed elettrici) (Hoch, 2001 e autori citati).

Riguardo ai composti tetrasostituiti (R_4SnX), essi hanno trovato invece un minore impiego industriale. Sono usati nella stabilizzazione a caldo di prodotti quali oli lubrificanti, polietilene e polipropilene (Bennett, 1983), anche se la loro maggiore applicazione è nella sintesi di altri composti organostannici (come da Figura 2).

Come precedentemente accennato, con la scoperta delle proprietà biocide, l'impiego dei composti organostannici aumentò vertiginosamente determinando una crescita esponenziale della produzione mondiale. È stato stimato che la produzione mondiale di composti organostannici raggiunse circa 40.000 tonnellate annue nel 1985, crescendo a 50.000 tonnellate annue nel 1996 (Antizar-Ladislao, 2008).

Tabella 2. Principali applicazioni degli OTC (da Bressa e Cima 1985).

Applicazione	Funzione	Principali composti usati
Stabilizzanti del PCV	Contrastano l'azione della luce e del calore	R_2SnX_2 R=metile, butile, ottile X= isoottiltioglicolato, malonato
Vulcanizzazione delle schiume poliuretaniche e dei siliconi RTV	Catalizzatori omogenei	R_2SnX_2 Dibutilstagno diacetato Dibutilstagno dilaurato
Esterificanti	Catalizzatori omogenei	Dibutilstagno diacetato Dibutilstagno ossido
Trattamento delle superfici dei vetri	Precursori del film di ossido di stagno IV	Dimetilstagno cloruro Butilstagno tricloruro Metilstagno tricloruro
In veterinaria	Antielmintici del pollame	Dibutilstagnolaurato
Preservanti del legno	Fungicidi	Bistributilstagno ossido Tributilstagno naftalato Tributilstagno fosfato
Pesticidi	Fungicidi, Insetticidi, Acaricidi, Antiparassitari	Trifenilstagno acetato Trifenilstagno idrossido Tricicloesilstagno ossido
Vernici antivegetative	Biocida	Trifenilstagnocloruro, fluoruro Bistributilstagno ossido Tributilstagnocloruro, fluoruro Tributilstagno acrilato
Protezione di materiali (pelle, carta, ecc.)	Fungicidi, alghicidi, battericidi	Tributilstagno benzoato
Trattamenti antitarmici e disinfezione dei tessuti	Insetticidi, antiparassitari, batteriostatici	Trifenil cloruro, Trifenil acetato, Tributil benzoato

Tabella 3. Utilizzo dei composti organostannici come pesticidi [da Bressa e Cima, 1985].

Composti	Attività	Tipi di colture cui sono comunemente destinati	Alcuni nomi commerciali
Acetato di trifenilstagno (TPhTAco)	Fungicida	Caffè, luppolo, patata	Bastan [®] , Brestan [®] , VP1940 [®] (Hoechst), Fentol [®] (Bayer), Chimate [®] (Chimac- Agriphar)
Ossido di trifenilstagno (TPhTO)	Fungicida Battericida	Patata	Brestan Flow [®] , Du- Ter [®] (Duphar), Duter [®] (Shell), Flo Tin [®] (Agtrol)
Trifenilstagno cloruro (TPhTCl)	Fungicida Molluschicida		Brestanol [®] (Hoechst), Aquatun [®] , Phenostat- C [®] (Nitto Kasei)
Acetato di tricicloesilstagno (TCyTAco) Tricyclohexylhyd- roxystannane – idrossido di tricicloesilstagno (TCyTOH) Composti di tricicloesilstagno (TCyTX)	Acaricida	Mela, pera	Plictran [®] , Plictran 25W [®]
Fenbutatin oxide (Bis[tris-(2- methyl-2- phenylpropyl)tin] oxide) – ossido di bis(tris-(2-metil- 2- fenilpropil)stagno (FBTO)	Acaricida	Pomodoro, zucca	Vendex [®] , Torque [®] , Torque-L [®] , Torque- Plus [®] , Osadan [®] , SD14114 [®]

Box 1 - Biofouling negli ambienti acquatici

Il *biofouling* è un fenomeno naturale che caratterizza tutti gli ambienti acquatici. Esso consiste nella colonizzazione permanente di superfici sommerse da parte di un complesso di organismi sessili. Il fenomeno coinvolge una varietà molto ampia di organismi incrostanti, anche dell'ordine di 2000 specie, tra cui batteri e vegetali, quali diatomee e alghe (Relini, 1977). Tali organismi sedentari attecchiscono ad un substrato in quanto necessitano di un supporto stabile per dar corso ad una parte o all'intero loro ciclo vitale. Le caratteristiche specifiche del fenomeno del *biofouling* (es.: intensità e distribuzione degli organismi) dipendono dalla natura del substrato, delle popolazioni locali, dal clima e dalla stagione. In condizioni particolarmente favorevoli, il fenomeno può raggiungere entità tali da far rilevare, per esempio su navi molto grandi come le petroliere, alcune centinaia di tonnellate di organismi incrostanti sviluppatasi in un periodo inferiore ad un anno (Evans e Hill, 1983).

Box 2 - Vernici antivegetative a base di TBT

Si distinguono diverse tipologie di vernici, diverse tra loro per la natura delle interazioni tra il principio attivo e la sostanza in cui esso è disperso (Hoch, 2001; Dafforn et al., 2011).

- Le vernici convenzionali a libera associazione si caratterizzano per la dispersione del biocida in una matrice di resina. Il biocida, in associazione libera, viene lisciviato dalla superficie del rivestimento in maniera non controllata (Figura A, Punto 1). Una volta lisciviato lo strato direttamente a contatto con l'acqua, il biocida presente negli strati sottostanti si diffonde attraverso microscopici pori generatisi nella matrice in seguito al processo di lisciviazione (Figura A, Punto 2). Tuttavia, il progressivo ispessimento dello strato di resina non più attivo finisce con l'impedire l'ulteriore dispersione del principio attivo dagli strati sottostanti. Per questo l'azione biocida di questa tipologia di vernici diventa inefficace in tempi brevi (circa 2 anni) (Figura A, Punto 3).

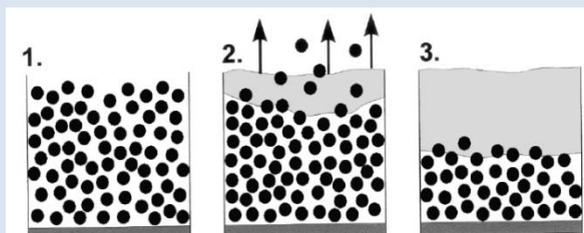


Figura A. Vernice antivegetativa in libera associazione: nel tempo le molecole del biocida vengono rimosse dall'acqua a contatto con la matrice della vernice (punto 1, punto 2, punto 3) [tratto da Hoch, 2001].

- Le vernici polimeriche contengono il biocida legato chimicamente ad un polimero a base di metacrilato. Questi prodotti sono denominati *self-polishing copolymer* (SPC). L'azione antivegetativa (Figura B) avviene grazie al rilascio controllato e uniforme del biocida eroso dalla superficie di contatto per idrolisi, processo che permette la rigenerazione continua dello strato superficiale per tutto il tempo di vita della vernice. Tali vernici sono particolarmente efficaci nel tempo (fino a 5-7 anni) in quanto consentono lo sfruttamento dell'intero lo strato applicato.

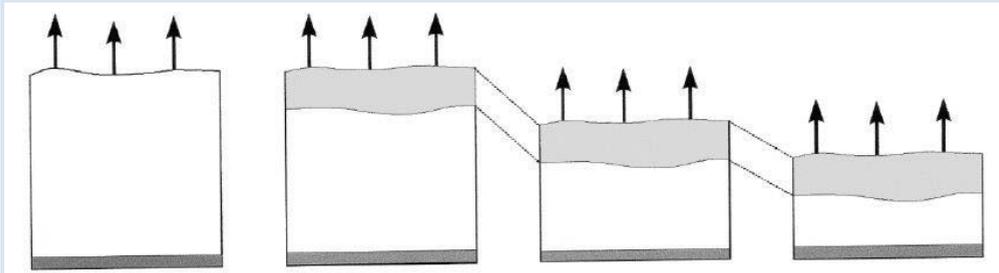


Figura B. Vernice antivegetativa copolimerica: il TBT viene rilasciato dalla vernice per reazione chimica con l'acqua mentre la matrice viene gradualmente erosa dallo scafo, permettendo la costante presenza di uno strato attivo (tratto da Hoch, 2001).

1.3 Comportamento ambientale e distribuzione in ambiente marino e lagunare

A causa dell'estensivo uso dei composti organostannici in numerose applicazioni, tali inquinanti sono stati ritrovati in tutti gli ecosistemi acquatici, anche se le concentrazioni più elevate sono proprie degli ambienti marino-costieri e lagunari (Uhler et al., 1993; Stewart e Thompson, 1994; Michel e Averty, 1999; Antizar-Ladislao, 2008; Meador, 2011; Yi et al., 2012).

Quantità non trascurabili sono state determinate anche in atmosfera (Sousa et al., 2014).

La Figura 3 riporta le maggiori fonti di immissione dei composti organostannici nell'ambiente marino e i loro principali meccanismi di distribuzione.

Le maggiori conoscenze riportate in letteratura sulla distribuzione dei composti organostannici in ambienti acquatici sono riferite al TBT e ai suoi prodotti di degradazione, mentre più scarse sono per TPhT e i suoi derivati (Yi et al., 2012 e autori citati). In generale si osserva che la distribuzione di TBT e TPhT negli ambienti marini e di transizione rispecchia, in termini di concentrazione, l'andamento acqua-sedimento-invertebrati-pesci. Per quanto riguarda il bioaccumulo dei composti organostannici in mammiferi e uccelli, il pattern di bioaccumulo non è sempre descritto in modo univoco (Hoch, 2001 e autori citati; Yi et al., 2012 e autori citati).

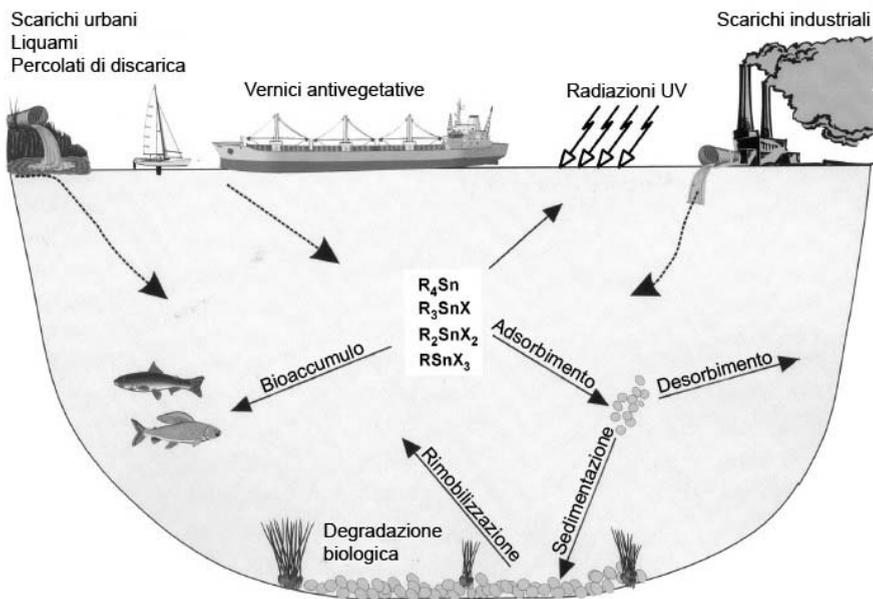


Figura 3. Fonti di immissione e meccanismi di distribuzione dei composti organostannici nell'ambiente marino (modificato da Hoch, 2001).

1.3.1 Acqua

La fonte principale di contaminazione da composti organostannici nelle acque marine e lagunari è stata storicamente rappresentata dal rilascio di TBT dalle vernici antivegetative impiegate sulle imbarcazioni o sulle strutture sommerse. Altre importanti fonti sono i percolati di lisciviazione di terreni agricoli e discariche, e gli scarichi industriali e civili (Figura 3) (Hoch, 2001).

Recenti studi concernenti i livelli di contaminazione marina da composti organostannici evidenziano che a tutt'oggi le concentrazioni maggiori sono generalmente presenti nelle zone ad alta densità di traffico marittimo, quali darsene, aree di rimessaggio e porti (Boscolo et al., 2004; Berto et al., 2007; Choi et al., 2010; Sousa et al., 2012). Nei decenni antecedenti all'entrata in vigore delle rigide restrizioni all'uso di prodotti antivegetativi contenenti composti organostannici, nelle aree più compromesse erano riportati livelli di concentrazione in acqua fino a 100-200 ng Sn/L, valori estremamente alti che si spiegano considerando il massiccio rilascio di TBT dalle vernici antivegetative a base polimerica [pari a 6 mg Sn/cm² al giorno per pitture appena applicate; tale valore tende poi a diminuire nel tempo] (Batley, 1996). Tuttavia, anche lontano da queste aree di maggiore impatto, le concentrazioni riportate dalla letteratura non erano trascurabili (Hoch, 2001 e autori citati), suggerendo l'azione di meccanismi di trasporto probabilmente favoriti dalla risospensione sedimentaria naturale ed antropica (causata da correnti, scambi di maree, pesca, dragaggi, ecc.) e dallo scarico delle acque di sentina delle navi (Ranke e Jastorff, 2000).

La speciazione dei composti organostannici nel comparto acquatico risulta strettamente legata alla variabilità delle condizioni chimico-fisiche della colonna d'acqua e alla loro

solubilità. In acque dolci i composti trisostituiti dello stagno sono presenti soprattutto sotto forma di idrossidi o in forma cationica, a seconda del valore di pH, mentre in acqua di mare (pH 8) si ritrovano prevalentemente sotto forma di idrossidi e carbonati (Hoch, 2001 e autori citati).

La componente organica può favorire la ripartizione dei composti organostannici nei diversi comparti dell'ecosistema acquatico, in particolare negli ambienti marino-costieri e lagunari dove è presente in elevata concentrazione. Questa tendenza si evidenzia maggiormente per il TBT e il TPhT, che hanno i valori di coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ($\log_{10} K_{ow}$) più alti (Tabella 4). La ripartizione di questi contaminanti tra la fase acquosa e particellata della colonna d'acqua, attraverso processi di adsorbimento e flocculazione, risulta essere un importante meccanismo ai fini della loro distribuzione nell'ecosistema marino. Sulla base di simulazioni in laboratorio del funzionamento degli ambienti estuarini, Randall e Weber (1986) riportano alti valori percentuali di sequestro/adsorbimento di TBT alla fase particellata (57-95%), suggerendo un'elevata biodisponibilità di tali contaminanti.

Tabella 4. Proprietà chimico-fisiche dei composti butilstannici e fenilstannici: peso molecolare (MW), coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ($\log_{10} K_{ow}$) e costante di dissociazione acida (pK_a) [dati tratti da Meador, 2011 modificato].

Composto	MW (g/mol)	$\log_{10} K_{ow}$	pK_a	Fattore di conversione da ng/Sn a ngOTC ⁺ /g	Fattore di conversione da ngOTC ⁺ /g a ng/Sn
Tributilstagno (TBT)	290	4,4	6,5	2,44	0,41
Dibutilstagno (DBT)	233	1,3	3,8	1,96	0,51
Monobutilstagno (MBT)	176	0,4	2,0	1,48	0,68
Trifenilstagno (TPhT)	350	3,6	5,2	2,95	0,34
Difenilstagno (DPhT)	273	1,9	2,7	2,30	0,43
Monofenilstagno (MPhT)	196	1,2	-	1,65	0,61

Parametri quali salinità, temperatura, pH, torbidità, irraggiamento solare (UV), concentrazione e composizione della materia organica (Skinner, 1964; Hoch 2001 e autori citati), giocano un ruolo fondamentale nella degradazione di questi contaminanti. Stewart e de Mora (1990) riportano valori di emivita del TBT nella colonna d'acqua di 5-8 giorni in estate in aree ad elevata torbidità e di 127 giorni in inverno e in acque limpide. A tal riguardo, nel valutare il ruolo del fotoperiodo d'irraggiamento solare e della batimetria, bisogna considerare che solo le radiazioni dello spettro comprese tra 300-350 nm possono causare fotolisi diretta del TBT e che la loro azione riguarda

principalmente gli strati superficiali della colonna d'acqua (Clark et al., 1988). Tuttavia, come riportato da molti autori, sembra che un ruolo importante nella degradazione di questi composti sia attribuibile anche ai processi biotici, in particolare all'attività microbica (Watanabe et al. 1992; 1995; Dowson et al., 1996; Dubey e Roy, 2003; Luan et al., 2006). Inoltre, nel comparto acquatico è stato osservato che i processi di metilazione operati da alcune specie batteriche del genere *Pseudomonas* danno origine a composti metilati dello stagno, altamente tossici per gli organismi acquatici (Jackson et al., 1982). La metilazione potrebbe tuttavia avere anche un'origine abiotica, come avviene nel caso del metilmercurio (Ebinghaus, 1991; Wilken, 1994).

1.3.2 Sedimento

I sedimenti sono noti agire come “serbatoi” dei composti organostannici negli ecosistemi acquatici, favorendo sia la persistenza di tali inquinanti nel tempo sia il loro continuo rilascio nella colonna d'acqua a seguito dell'azione di agenti naturali come correnti, maree, ecc., o antropici, quali dragaggi, attrezzi da pesca, ecc. (contaminazione secondaria). Come già evidenziato, i composti organostannici tendono ad accumularsi nel sedimento a causa dell'alta affinità per la frazione organica ed inorganica (Weidenhaupt et al., 1997; Hoch, 2001 e autori citati).

La valutazione dell'accumulo dei composti organostannici nel comparto sedimentario e il controllo della loro dispersione nell'ecosistema acquatico risulta una questione estremamente rilevante a livello ambientale.

Tabella 5. Valori di emivita del TBT nei sedimenti riportati in diversi studi.

Tempo di emivita del TBT	Riferimento bibliografico
162 giorni	Stang e Seligman (1986)
1,8-3,8 anni	de Mora e Pelletier (1997)
360-775 giorni (superficiali)	Dowson et al. (1996)
superiore a 5 anni	Sarrandin (1993)
superiore a 5 anni	Waldock et al. (1990)
decadi (più profondi anaerobici)	Dowson et al. (1996)
da pochi anni a qualche decade	Takahashi et al. (1999)

Il tempo di emivita dei composti organostannici nel sedimento varia a seconda della granulometria, dell'irraggiamento solare, della profondità, dello stato redox, dell'attività microbica e della quantità di materia organica presente (Seligman et al., 1986; 1988; Lee et al., 1989; Watanabe et al., 1995; Dubey e Roy, 2003; Bhosle et al., 2006). Anche

il rimescolamento del sedimento, per cause naturali o antropiche, gioca un ruolo attivo nel processo di degradazione attraverso la formazione di zone ossiche/anossiche che influiscono sull'innescare delle reazioni microbiche (Seligman et al., 1988; Lee et al., 1989; Hoch, 2001; Díez et al., 2002; Burton et al., 2005). Questo spiega perché vari autori riportano in letteratura tempi di emivita molto diversi tra loro (Tabella 5).

L'adsorbimento alla componente argillosa avviene mediante "scambio cationico" e risulta strettamente dipendente dalla disponibilità di potenziali siti leganti dell'argilla e dal pH: esso viene favorito da pH neutri, mentre valori di pH inferiori o superiori a 7 inducono un processo di desorbimento, con conseguente rilascio del contaminante nella matrice acquosa (Langston et al., 1987; Hoch, 2001; Hoch and Schwesig, 2004).

1.3.3 Biota

Gli organismi marini possono accumulare i composti organostannici direttamente dall'acqua, dal sedimento oppure attraverso la dieta. Sia i composti alchilstannici, con particolare riferimento ai butilstannici, che i fenilistannici sono stati studiati in organismi procarioti ed eucarioti (Evans, 1999; Lee et al., 2006; Yi et al., 2012 e autori citati; Sousa et al., 2013 e autori citati). L'accumulo dei composti organostannici può variare a seconda dei diversi phyla. Batteri, quali *Pseudomonas* sp., sono, ad esempio, in grado di accumulare quantità di TBT per più del 2% del proprio peso secco, grazie ad un semplice processo chimico-fisico di adsorbimento (Blair et al., 1982). Il bioassorbimento dei composti organostannici trisostituiti, nel caso dei cianobatteri *Synechocystis* PCC6803, *Plectonema boryanum* e della microalga *Chlorella emersonii*, aumenta in maniera direttamente proporzionale al peso molecolare del composto (trifenil>tributil>tripropil>trimetil>triethyl-stannici) (Gadd, 2000). Alcuni organismi sono in grado di trasformare TBT e TPhT nei loro composti di degradazione, come, ad esempio, l'alga *Ankistrodesmus falcatus*, capace in quattro settimane di trasformare il 50% del TBT in DBT (Maguire et al., 1984).

I molluschi presentano, invece, scarsa capacità di metabolizzare i contaminanti ambientali (Livingston, 1985), dovuta principalmente ai bassi livelli del sistema enzimatico citocromo P-450 [14-45 pmol/mg proteina] (Morcillo et al., 1997a). Per questo motivo concentrazioni più elevate di TBT e TPhT possono essere ritrovate in questi organismi, soprattutto negli organi bersaglio (branchie, ghiandola digestiva, ecc.), piuttosto che in pesci e crostacei, i quali possiedono maggiori capacità di degradazione metabolica, trasformando, ad esempio, il TBT nella sua forma idrossilata, poi in DBT ed infine in MBT (Suzuki et al., 1992; Fent, 1996; Alzieu, 2000; Tang et al., 2009).

Anche nei pesci l'accumulo risulta diversificato a seconda degli organi e tessuti, in particolare le maggiori concentrazioni vengono solitamente determinate nel fegato, rispetto alle branchie.

Un andamento simile si osserva anche nei mammiferi marini per i quali sono disponibili molti studi sull'accumulo degli organostannici. Nel fegato, organo deputato alla detossificazione, la forma predominante è il DBT, che si origina dalla prima fase di degradazione del TBT (Tanabe et al., 1998). Elevate concentrazioni sono state rilevate nei tessuti di varie specie di cetacei dell'oceano Pacifico, del Golfo del Bengala e delle acque antistanti al Giappone (Iwata et al., 1994; 1995; 1997) e lungo le coste italiane ed americane (Kannan et al., 1996), come pure in leoni marini del Giappone (Kim et al.,

1996) e nelle otarie della California (Kannan et al., 1998a). Nei mammiferi marini, che pur possiedono sistemi enzimatici efficienti per la detossificazione, l'accumulo di elevate quantità di contaminanti organici è favorito dalla presenza di un esteso pannicolo adiposo (*blubber*) che generalmente ha la funzione di isolante termico e di riserva energetica. Tuttavia è anche probabile che il pattern di distribuzione tra i tessuti e gli organi dei mammiferi sia dovuto alla maggiore affinità dei composti organostannici con i gruppi sulfidrilici, come il glutatione, e quindi dipendere più dal contenuto proteico che da quello lipidico (Iwata et al., 1997; Strand e Jacobsen, 2005; Hu et al., 2009). Anche le caratteristiche specie-specifiche possono influire sulla distribuzione dei composti organostannici e, di conseguenza, contribuire alle differenze tra specie diverse, ma appartenenti allo stesso livello trofico. Ad esempio, sono stati riscontrati livelli di composti butilstannici e fenilstannici inferiori in mammiferi marini con pelliccia rispetto agli altri, probabilmente perché l'affinità ai gruppi sulfidrilici fa sì che gli organostannici si leghino alle proteine dei peli, che a loro volta si possono perdere (Tanabe, 1999; Berge et al., 2004). Infine, anche il trasferimento madre figlio può influire sulle diverse concentrazioni inter- e intraspecifiche e può spiegare la differente distribuzione che si osserva tra i tessuti e gli organi degli organismi esposti. Questo fenomeno è stato riportato sia per i mammiferi marini che per alcune specie di pesci (Zhang et al., 2008; Hu et al., 2009).

Secondo alcuni autori anche gli uccelli sarebbero in possesso di sistemi di degradazione ed escrezione di TBT e TPhT, addirittura più efficienti rispetto ai mammiferi (Iwata et al., 1997; Strand e Jacobsen, 2005). Kannan et al. (1998b) riportano, dall'analisi di muscoli, fegato, reni e lipidi di uccelli marini, concentrazioni maggiori di DBT e MBT, cioè dei prodotti della detossificazione del TBT; in questo giocherebbe un ruolo importante la muda annuale tipica degli uccelli. Anche questi animali marini, occupando i più alti livelli della catena trofica, a volte presentano concentrazioni di organostannici più elevate rispetto ad organismi appartenenti a livelli trofici inferiori.

Nonostante le ampie conoscenze sui livelli di bioaccumulo dei composti organostannici nei vari taxa, sono, invece, ridotte e talvolta discordanti le informazioni sulla biomagnificazione (per la definizione si veda il paragrafo 5.3). Alcuni autori, infatti, hanno osservato assenza di biomagnificazione lungo la rete trofica (Lepper, 2002; Hu et al., 2006; Murai et al., 2008), mentre altri hanno evidenziato un processo di accumulo da un livello trofico al successivo (Iwata et al., 1994, 1995; Kannan e Falandysz, 1997; Kannan et al., 1997; Madhusree et al., 1997; Tanabe et al., 1998, Tanabe, 1999; Fortibuoni et al., 2013). Da una raccolta dati eseguita da Yi et al. (2012) è emerso, ad esempio, che le concentrazioni di TPhT determinate in uccelli e mammiferi in diverse zone dell'Europa occidentale e in Giappone presentavano concentrazioni inferiori rispetto a quelle determinate in pesci e invertebrati delle stesse aree. Nell'area dell'Alto Adriatico, invece, sono stati condotti studi sull'accumulo di TBT evidenziando fenomeni di biomagnificazione lungo la rete trofica (Fortibuoni et al., 2013).

1.4 Effetti sugli organismi

I composti organostannici sono sostanze estremamente tossiche per un ampio range di organismi, dai batteri ai mammiferi, inclusi gli esseri umani (Whalen et al., 1999; Alzieu, 2000a; Cruz et al., 2007, 2012).

Il primo caso conclamato dell'evidente tossicità del TBT fu registrato nella Baia di Arcachon, un'insenatura chiusa, situata nella costa Atlantica della Francia e caratterizzata dalla presenza di numerosi impianti di allevamento di ostriche della specie

Crassostrea gigas. Qui, negli anni '70 e primi anni '80, si verificò una grave diminuzione nella produzione di ostriche, causata da una calcificazione anomala delle conchiglie, che provocava problemi alla crescita dei molluschi (Alzieu, 2000a). L'origine delle malformazioni venne collegata alla presenza di imbarcazioni ormeggiate nelle numerose darsene della baia, da cui poteva essere rilasciato il TBT. Il tipo di anomalie che si verificarono nelle conchiglie delle ostriche consisteva nella formazione di concamerazioni (*chambering*), con all'interno un gel interlamellare. Questo fenomeno, detto *chambering*, veniva poi seguito da un ispessimento anomalo delle conchiglie che, nei casi più acuti, bloccava la crescita in senso longitudinale (accorciamento della cavità palleale), fino a dare origine a conchiglie di forma sferica (fenomeno detto *balling*). Le osservazioni iniziali di Alzieu et al. (1980) vennero confermate successivamente da Chagot et al. (1990), i quali dimostrarono che tali anomalie potevano essere state innescate dalla presenza di concentrazioni anche molto basse, pari a 2 ng TBT/L.

Più o meno nello stesso periodo, Blaber (1970) registrò l'anomala presenza del pene nelle femmine del gasteropode gonocorico *Nucella lapillus* provenienti dalla baia di Plymouth, situata nella costa sud-occidentale dell'Inghilterra. Tale condizione si presentava con maggiore gravità negli organismi raccolti all'interno dei porti e, in modo più lieve, allontanandosi da essi. Un anno dopo, negli Stati Uniti, Smith (1971) notò anch'egli la presenza di un pene e di un vaso deferente nelle femmine di *Nassarius obsoleta*, un altro gasteropode a sessi separati. Per riferirsi a tale anomalia, egli conìò il termine *imposex*, ma ancora a quel tempo la causa del fenomeno rimaneva sconosciuta. Fu grazie ai suoi lavori e studi effettuati sia in campo che in laboratorio (Smith, 1981a,b,c,d) che venne finalmente trovata la relazione causale tra TBT ed imposex, confermata poi da Bryan et al. (1987) nella specie *N. lapillus*.

Successivamente agli studi sul TBT vennero indagati i possibili effetti tossici del trifenilstagno. Nonostante il TPhT sia spesso presente in ambiente costiero con il TBT e mostri meccanismi di azione tossica simili, è solo a metà degli anni Novanta che Horiguchi et al. (1994, 1996) dimostrarono il possibile ruolo del TPhT nell'imposex. Tali studi, inizialmente effettuati sulla specie *Thai Clavigera*, vennero in seguito confermati prendendo in esame anche altre specie di gasteropodi (Solè et al., 1998; Shim et al., 2000; Santos et al., 2006).

Ad oggi, la virilizzazione delle femmine a causa dei composti organostannici è stata riconosciuta ed esaminata in più di 260 specie di gasteropodi (Titley-O'neal et al., 2011). In questi organismi si sono osservati tre tipi di mascolinizzazione chiamati, rispettivamente, imposex o pseuermafroditismo, intersex ed ovo-testis.

Secondo la definizione di Smith (1971), l'imposex è la sovrapposizione dei caratteri sessuali maschili che si verifica nelle femmine esposte a TBT: negli individui affetti dal fenomeno l'intero sistema genitale femminile si conserva, ma compaiono il vaso deferente, o il gonodotto maschile, ed il pene. L'intersex, invece, consiste nella trasformazione degli organi palleali femminili in strutture morfologiche riproduttive maschili: tale processo porta, negli stadi più avanzati, alla formazione di una spaccatura ventrale e di una vera e propria ghiandola della prostata, caratteristiche che determinano la sterilità dell'individuo (Mathiessen et al., 1999).

Infine, l'ovo-testis può manifestarsi come 1) sospensione dell'oogenesi, 2) comparsa della spermatogenesi e 3) formazione di strutture tubulari simili ai canali seminiferi. Questo fenomeno è stato osservato per la prima volta in individui di *N. lapillus* esposti per circa due anni a TBT, dalla schiusa fino alla maturità sessuale (Gibbs et al., 1988).

I molluschi, in particolare quelli appartenenti alle classi Bivalvia e Gastropoda, sono tra gli organismi più sensibili agli effetti tossici del TBT. Oltre ai suddetti fenomeni di mascolinizzazione nelle femmine di gasteropode ed all'assottigliamento delle conchiglie nelle ostriche, si riscontra una vasta gamma di effetti tossici descritti in letteratura, che vanno dai danni a carico del sistema riproduttivo, alle malformazioni a livello di sviluppo embrionale e larvale, alla riduzione della crescita, fino al declino o scomparsa di intere popolazioni di molluschi (Salazar e Salazar 1996; Alzieu, 2000; Morcillo e Porte, 2000; Solè, 2000). Alcuni di questi effetti possono verificarsi già a livelli di concentrazione in acqua dell'ordine dei ng TBT/L (Tabella 6).

Tabella 6. Relazione tra concentrazioni in acqua di TBT e risposte biologiche osservate nei molluschi in studi di laboratorio e di campo.

Concentrazione TBT	Risposta nei molluschi	Riferimento bibliografico
0.2 ng TBT/L	NOEL (no effect level) sulle modifiche morfologiche del tratto genitale delle femmine di <i>Nucella lapillus</i>	Gibbs e Bryan (1996)
2 ng TBT/L	Anomalie sulla calcificazione delle conchiglie di <i>Crassostrea gigas</i>	Alzieu (2000a)
20 ng TBT/L	NOEL (no effect level) sulla riproduzione di <i>Crassostrea gigas</i>	Alzieu (2000b)
50 ng TBT/L	Effeti cronici sulle larve di <i>Mytilus edulis</i>	Lapota et al. (1993)
0.73 µg TBT/L	Effeti cronici su <i>Crassostrea gigas</i>	Valkirs et al. (1991)
0.97 µg TBT/L	Effeti cronici su <i>Mercenaria mercenaria</i>	Valkirs et al. (1991)

Nonostante più di 40 anni di ricerca, la dimostrazione che il TBT agisca come interferente del sistema endocrino (*endocrine disruptor*) sia negli invertebrati che nei vertebrati, il meccanismo di induzione della virilizzazione delle femmine di gasteropode rimane ancora oggetto di dibattito nel mondo scientifico. Tra le varie ipotesi, le più accreditate sono: 1) il disturbo del fattore morfogenetico del pene (PMF), 2) l'inibizione dell'attività di aromatasi del citocromo P450, 3) l'inibizione dell'escrezione di testosterone, 4) la modulazione dei livelli di testosterone libero rispetto a quelli di testosterone legato agli acidi grassi e 5) l'inibizione dei recettori del retinoide X (RXR) (Tittley-O'Neal et al., 2011 e autori citati).

Una delle prime ipotesi sulle cause d'induzione dell'imposex, ovvero il disturbo del fattore morfogenetico del pene (PMF), è strettamente legata agli effetti neurotossici del TBT. In questo caso, studi *in vitro* dimostrano che il composto agisce a livello dei gangli cerebrali dei gasteropodi, attivandoli e promuovendo il rilascio di un neuropeptide (APGWamide) localizzato a livello del ganglio destro. L'APGWamide quindi controllerebbe lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari maschili nelle femmine (Féral e Le Gall, 1983).

Per quanto riguarda, invece, la più recente delle ipotesi di meccanismo di induzione dell'imposex, ovvero l'inibizione dei recettori del retinoide X (RXR) [Nishikawa et al., 2004, 2006; Horiguchi et al., 2007, 2010; Castro et al., 2007; Sternberg et al., 2010; Lima et al., 2011; Stange et al., 2012; Abidli et al., 2013], si è osservato che anche nei vertebrati, esseri umani compresi, il TBT agisce da agonista dei ligandi degli RXR (Grün et al., 2006). L'RXR è un fattore di trascrizione ligando-dipendente, il cui ligando nelle specie analizzate sembra essere l'acido 9-cis retinoico (ovvero un *peroxisome-proliferator activated receptor*, PPAR). Sia il TBT che il TPhT hanno elevata affinità (dell'ordine del nanomolare) con i ligandi degli RXR e sono tra i più potenti agonisti dei PPAR. I composti organostannici con pochi o brevi gruppi alchilici, come il trietilstagno (TET), si suppone non abbiano alta affinità, mentre i composti organostannici con gruppi alchili lunghi, come il trioctilstagno (TOT), a causa dell'ingombro sterico non possono legarsi agli RXR (Pagliarani et al., 2013 e autori citati). Nei gasteropodi, il legame inappropriato dell'RXR con il TBT potrebbe essere la causa dell'inizio della trascrizione dei geni coinvolti nella formazione dell'apparato riproduttivo maschile nelle femmine (Sternberg et al., 2008). Nei vertebrati, invece, il legame del TBT con gli RXR provocherebbe sia danni a livello del sistema endocrino, come negli invertebrati, che a livello di omeostasi dei grassi. È noto infatti che gli organostannici sono composti obesogeni che agiscono a livello del metabolismo dei lipidi e portano all'aumento del grasso corporeo. Questo aspetto, particolarmente studiato come patologia negli esseri umani, verrà approfondito nel paragrafo seguente (paragrafo 1.5).

Un altro dei meccanismi di induzione della mascolinizzazione dei gasteropodi, ovvero l'inibizione dell'attività di aromatasi, è stato invece osservato nei molluschi bivalvi: in questi organismi il TBT interviene a livello del metabolismo degli ormoni steroidei, inibendo l'enzima responsabile della conversione da ormoni maschili (testosterone) a quelli femminili (estrogeni) (Mathiessen e Gibbs, 1998; Morcillo e Porte, 2000). L'enzima coinvolto nella trasformazione è l'isoenzima citocromo P450, conosciuto anche come CYP1A (citocromo P450 aromatasi), presente sia negli invertebrati che nei vertebrati. Diversi studi documentano l'interazione del TBT con il sistema delle monoossigenasi (MFO), un complesso di enzimi che comprende diverse forme di citocromo P450, citocromo *b₅*, citocromo *c*, flavoproteine, ecc. Le MFO sono coinvolte sia nel metabolismo di composti endogeni, quali acidi grassi e ormoni, che in quello degli xenobiotici (idrocarburi policiclici aromatici, IPA; policlorobifenili, PCB; e composti simili). Di conseguenza qualsiasi reazione che coinvolga le MFO può avere sia conseguenze sulle capacità riproduttive degli animali, che su quelle legate alla trasformazione degli inquinanti (Solè et al., 2000). Il sistema delle MFO è presente in tutta la scala filogenetica, con livelli e attività maggiori nei gruppi sistematici più elevati rispetto a quelli inferiori (Livingston, 1991; Livingstone e Goldfarb, 1998). Gli invertebrati, soprattutto i molluschi, hanno MFO meno attive rispetto ai vertebrati (Lee, 1991).

In generale, va considerato che le diversità/similarità del tipo di effetto che si verifica nei vari taxa, a seguito dell'esposizione agli organostannici, possono dipendere dalla divergenza/similarità evolutiva di alcuni complessi del sistema endocrino stesso, presenti nei diversi gruppi sistematici (Oehlmann e Schulte-Oehlmann, 2003). Anche nei crostacei, ad esempio, oltre ad effetti sulla crescita e sulla muta, sono stati riportati effetti negativi a livello di sistema riproduttivo (Rodriguez et al., 2007), che nei copepodi si evidenzia a concentrazioni di TBT simili (10-100 ng TBT /L) a quelle che provocano effetti sui molluschi (Johansen e Mohlenberg, 1987).

In alcune specie di pesci, invece, l'esposizione a composti organostannici ha fatto osservare sia casi di potenziale induzione della virilizzazione delle femmine, come nella passera giapponese *Paralichthys olivaceus* (Shimasaki et al., 2003), sia casi di variazione del comportamento sessuale e del successo riproduttivo, come nel pesce del riso, o medaka (*Oryzias latipes*). In quest'ultima specie, infatti, sono state riportate riduzioni nella frequenza del numero degli incontri, dovuto alla soppressione nei maschi dei rituali di accoppiamento, con conseguente diminuzione delle emissioni dei gameti e dell'efficienza riproduttiva delle popolazioni esposte. Inoltre, sono stati osservati effetti negativi sulla capacità di schiusa delle uova e sulla capacità di nuoto nelle generazioni successive a quelle esposte a contaminazione da TBT (Nirmala et al., 1999; Nakayama et al., 2004). Nella stessa specie è stato dimostrato, inoltre, che anche il TPHT può influire sulla frequenza di deposizione e numero di uova prodotte dalle femmine (Zhang et al., 2008). Infine, un'altra manifestazione di *endocrine disruptor* è stata registrata nella stella marina *Leptasteria polaris*, nella quale si sono osservate, a seguito di esposizione a TBT, riduzioni significative nel diametro degli oociti previtellogeni e maturi (stadio finale), nonché un assottigliamento dell'epitelio gonadico in entrambi i sessi (Mercier et al., 1994).

Un ulteriore tipo di meccanismo d'azione del TBT consiste nell'inibizione della fosforilazione ossidativa, un processo biochimico del metabolismo cellulare per la produzione di ATP (adenosintrifosfato) da ADP (adenosindifosfato). Il TBT inibisce questa trasformazione causando delle malformazioni a livello delle membrane mitocondriali negli organismi esposti (Alzieu, 2000). Tale effetto, comune anche negli invertebrati, è stato messo in evidenza in alcuni studi sui pesci: ad esempio, in studi effettuati su due specie di teleostei di acqua dolce si è potuto osservare come l'inibizione della fosforilazione ossidativa del TBT possa causare la diminuzione della motilità degli spermatozoi, con conseguenze a livello di successo riproduttivo nelle popolazioni esposte a contaminazione ambientale (Rurangwa et al., 2002).

Sia negli invertebrati che nei vertebrati sono stati, inoltre, registrati effetti tossici a livello del sistema immunitario; in particolare nei pesci si sono manifestate alterazioni istologiche in presenza di concentrazioni di composti organostannici inferiori a $100 \mu\text{g/L}$ (Bushong et al., 1988). L'immunotossicità degli organostannici è principalmente coinvolta, a livello di meccanismo biologico, nell'alterazione dell'omeostasi del calcio (Chow et al., 1992). La depressione del sistema immunitario è, in particolare, uno degli effetti più importanti causati dal TBT su mammiferi e uccelli marini (Kannan et al., 1997); per questo effetto, nel caso degli esseri umani, la soglia di pericolosità per il TBT è stata stabilita nel 1997 dall'EPA pari a $0,25 \text{ ng/g peso corporeo/giorno}$. Anche per il DBT ci sono evidenze d'immunotossicità, addirittura di entità maggiore rispetto a quelle causate dal TBT (Ema et al., 1995; O'Halloran et al., 1998; Bouchard et al., 1999; de Santiago et al., 1999); tale aspetto dovrebbe essere considerato con particolare attenzione in quanto, conseguentemente ai processi metabolici di trasformazione particolarmente attivi nei vertebrati, il DBT si ritrova spesso nei tessuti a concentrazioni maggiori rispetto al TBT (Meador, 2011).

Sempre nei mammiferi e in alcune altre classi di vertebrati, sono stati descritti casi di neurotossicità causata dai composti organostannici. La neurotossicità è principalmente descritta per composti come il trietilstagno (TET) e il trimetilstagno (TMT), ma esistono poche evidenze riguardanti organismi acquatici (Meador, 2011).

I composti organostannici sono, infine, tossici anche per alcuni organismi fotosintetici. Il TBT è moderatamente idrofobico e viene adsorbito dalle superfici delle micro- e macroalghe, ma anche dalle fanerogame marine (Levine et al., 1990). Molte specie appartenenti al perifiton ed al fitoplancton hanno mostrato effetti avversi, in particolare sull'attività fotosintetica, anche a concentrazioni nell'ordine dei ng- μ gTBT/L (Beaumont e Newman, 1986; Molander et al., 1992; Petersen e Gustavson, 2000). Sargian et al. (2005) riportano, ad esempio, che comunità naturali di fitoplancton, esposte a concentrazioni pari a 120 ng TBT/L e irradiazioni UVB presentavano effetti negativi nelle loro funzioni biologiche, quali l'efficienza fotosintetica e la divisione cellulare, con conseguente decremento nel tasso di crescita e diminuzione delle dimensioni. Lo stesso fenomeno di inibizione della crescita, accompagnato alla diminuzione del contenuto di clorofilla, è stato verificato su alcune microalghe marine in cui si è evidenziato che l'interazione di TBT e TPhT con le membrane lipidiche può provocare l'inibizione della fotosintesi e della respirazione cellulare (Sidharthan et al., 2002).

Studi su *Zoostera marina* e *Thalassia testudinum* hanno dimostrato, invece, la capacità delle fanerogame marine di accumulare TBT dall'acqua, con fattore di concentrazione fino a 12.000 (Francois et al., 1989; Levine et al., 1990). L'accumulo attraverso le radici non è stato ancora approfondito, ma si suppone che abbia degli aspetti comuni con quelli legati all'assorbimento dei nutrienti e dei metalli pesanti che avviene attraverso questo apparato (Thursby e Harlin, 1984; Jensen et al., 2004). Nelle fanerogame marine il TBT viene convertito in MBT e con minor efficienza in DBT (Francois et al., 1989). Questo potrebbe rappresentare un potenziale mezzo di detossificazione delle aree costiere, se non fosse che il bioaccumulo di TBT nelle piante marine comporta effetti negativi a livello di *performance* di crescita delle stesse (Francois et al., 1989; Levine et al., 1990; Duarte, 2002). Come negli animali, il TBT, infatti, agisce come inibitore delle pompe ioniche e danneggia le membrane plasmatiche causando l'inibizione della fotofosforilazione nei cloroplasti (Fent, 1996). I processi enzimatici di detossificazione coinvolgono, inoltre, l'uso di ATP che di conseguenza si rende meno disponibile per la produzione cellulare (Torres et al., 2000). In *Ruppia maritima* si è osservato un tentativo di eliminazione del TBT da parte della pianta, definito "diluizione per crescita", che consiste nell'investire le risorse energetiche nell'aumento del numero di foglie, anziché accrescere quelle già esistenti. In questo modo, infatti, la pianta tenterebbe di eliminare le sostanze tossiche attraverso un più veloce ricambio fogliare (Jensen et al., 2004).

1.5 Esposizione ed effetti sulla salute umana

Per gli esseri umani le vie di esposizione ai composti organostannici sono molteplici: assunzione di cibo contaminato, contatto con prodotti di uso comune (ad es.: giocattoli, vestiti, articoli sanitari, carta da parati, tappeti e cuscini), presenza di inquinamento indoor; ecc. (Figura 4). Tra tutte, la principale via di esposizione è la dieta e, tra gli alimenti, i prodotti ittici, in particolare i molluschi, risultano quelli con i più alti livelli di concentrazione a cui l'uomo può essere esposto (Cardwell et al., 1999; Keithly et al., 1999; Ueno et al., 1999; Rantakokko et al., 2006; Guerin et al., 2007; Santos et al., 2009; Belfroid et al., 2000; Airaksinen et al., 2010; Choi et al., 2012). Oltre che nei prodotti ittici, gli organostannici possono essere presenti anche in altri alimenti, quali verdura, frutta, latte e carne (Qunfang et al. 2004; SCHER, 2006; Rantakokko et al., 2006). Livelli relativamente elevati possono essere assunti anche attraverso succhi di frutta [o verdura] e una vasta varietà di bevande alcoliche, tra cui birra, vino e distillati (Forsyth et al., 1992, 1994; Azenha e Vasconcelos, 2002; Liu e Jiang, 2002; Heroult et

al., 2008; Campillo et al., 2012). Persino l'acqua di rubinetto, se portata nelle case attraverso tubature in polivinilcloruro (PVC), può contribuire all'esposizione nell'uomo (Sadiki et al., 1996; Sadiki e Williams, 1999; Jones-Lepp et al., 2001; Fristachi et al., 2009; Adams et al., 2011; e altri). Infine, anche gli imballaggi di PVC e di silicone usati per gli alimenti possono contribuire a contaminare il cibo conservato o cucinato con questi materiali e andare quindi a costituire una delle possibili vie di esposizione ai composti organostannici (SCHER, 2006).

Nonostante l'evidenza di tutte queste potenziali vie di esposizione, le conoscenze relative alla contaminazione umana sono limitate e si riferiscono principalmente al consumo dei prodotti della pesca (Antizar-Ladislao, 2008). Ad esempio, in uno studio relativamente recente di Choi et al. (2012) è stata stimata per la popolazione Sud Coreana un'assunzione di composti butilistannici (TBT e DBT) pari a 17,2 ng BT/kg peso corporeo/giorno, a partire dalle concentrazioni determinate in 47 diverse specie di prodotti della pesca (intervallo di valori: da inferiori al limite di determinazione a 93,3 ng BT/g peso fresco) comunemente consumati in Sud Corea. Il 50% di tale assunzione era dovuto principalmente al pesce, seguito dai cefalopodi (26%), ma i valori riscontrati per tale popolazione erano pari al 5-8% rispetto alla dose giornaliera ammissibile (DGA), che risulta pari a 250 ng BT/kg peso corporeo/giorno, stabilita prima dall'Autorità Europea sulla Sicurezza Alimentare (EFSA, 2004) ed in seguito adottata dall'Organizzazione Mondiale di Sanità (OMS) (WHO-IPCS, 2007).

In uno studio su mitili (*Mytilus galloprovincialis*) provenienti da allevamenti e da popolazioni naturali della Laguna di Venezia e del Nord Adriatico (range dei valori: da 368 a 725 ng TBT+DBT/g peso secco), veniva invece affermato che, considerando una persona di peso medio pari a 75 kg, per non superare la DGA non dovevano essere assunti più di 90 g (peso fresco) al giorno di molluschi sgusciati provenienti dalla stazione più contaminata (Boscolo et al., 2004).

Dalla DGA, Belfroid et al. (2000) hanno stimato il livello residuo medio tollerabile (tolerable average residue level, TARL) calcolabile secondo la seguente formula:

$$TARL = \frac{DGA \times \text{peso medio di una persona}}{\text{consumo giornaliero medio di alimento}}$$

Il TARL permette quindi di stimare il rischio per la salute umana sulla base delle risultanze emerse da analisi di prodotti della pesca di largo consumo come i bivalvi o i pesci. Ad esempio, in uno studio effettuato su vongole (*Meretrix* spp.) raccolte in Vietnam si è visto che il valore di TARL risultante per la popolazione locale era nettamente superiore rispetto ai livelli di concentrazione riscontrati nei molluschi esaminati (Midorikawa et al., 2004). In generale, gli studi effettuati sul rischio per la salute umana dovuto al consumo di prodotti ittici hanno dimostrato che l'esposizione attraverso questo specifico tipo di alimento è limitata e contribuisce in piccola parte alla DGA (Rantakokko et al., 2006; Guérin et al., 2007; Santos et al., 2009; Choi et al., 2012; e altri). Ciò nonostante alcuni gruppi di popolazione, come gli assidui consumatori di bivalvi, sono tra le persone più a rischio, a causa delle elevate concentrazioni di composti organostannici che si possono riscontrare in queste specie (Boscolo et al., 2004; Santos et al., 2009).

Anche per quanto riguarda le vie di migrazione, accumulo e distribuzione delle diverse classi di composti organostannici nei diversi tessuti e organi umani, la conoscenza è relativamente incompleta, in quanto la maggior parte degli studi si limita all'analisi dei composti in una sola matrice alla volta (Graceli et al., 2013; Sousa et al., 2013). Kannan

e Falandysz (1997), per primi, effettuando uno studio su campioni di fegato di pesci, uccelli e mammiferi marini provenienti dalle coste Polacche del Mar Baltico, riportarono anche i livelli epatici dei composti butilstannici nell'uomo (range di valori pari a 2,4-11 ng TBT+DBT+MBT/g di peso umido). Nel lavoro di Sousa et al. (2013) viene, infine, riportata una raccolta di dati eseguita su altri tessuti e organi (sangue, capelli, urina, latte materno, stomaco, reni, cuore, ecc.) allo scopo di individuare la matrice realmente rappresentativa dell'entità della contaminazione sull'uomo, in quanto i composti organostannici possono sia essere accumulati nei lipidi, che legarsi alle proteine.

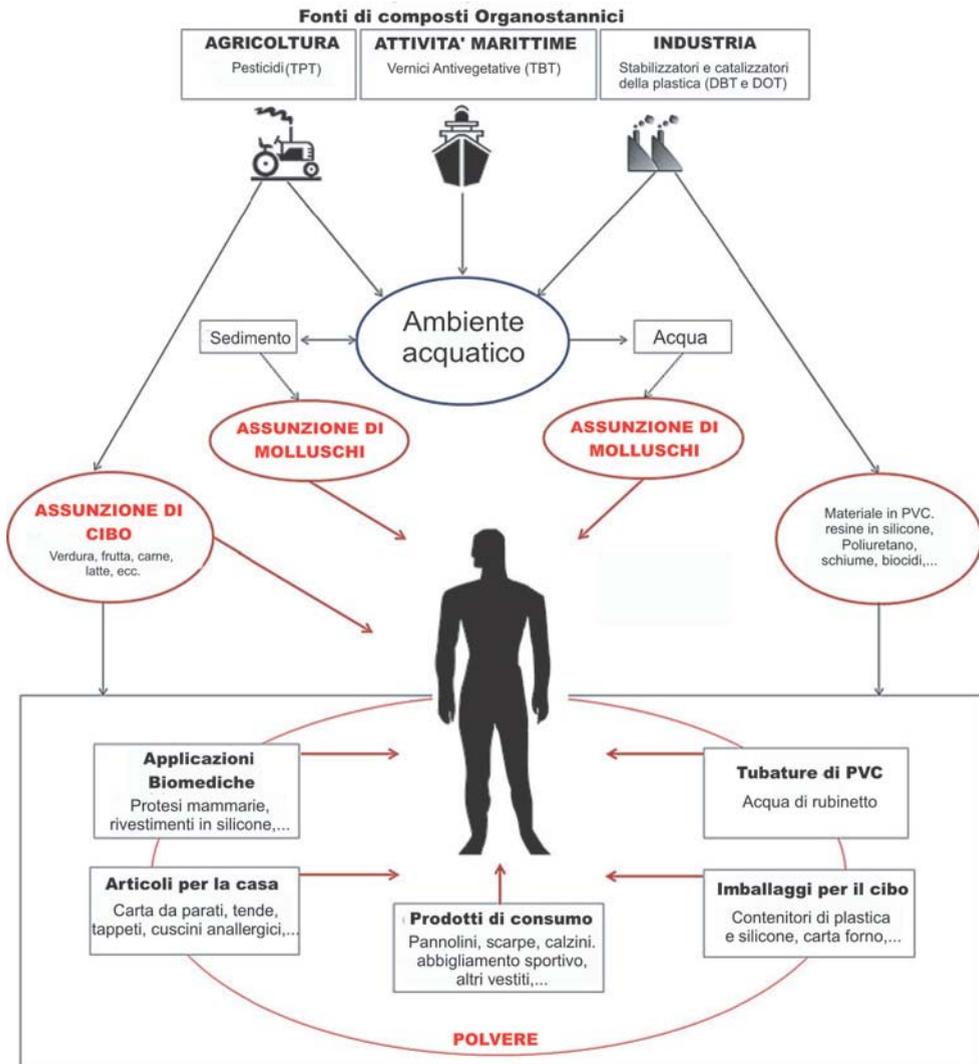


Figura 4. Rappresentazione schematica delle possibili vie di esposizione per l'uomo ai composti organostannici (tradotto da: Sousa et al., 2013).

Buona parte del mondo scientifico si è dedicata, invece, allo studio degli effetti dei composti organostannici sulla salute umana, principalmente basando le ricerche su esperimenti su animali, usati come organismi modello, da cui dedurre il rischio per la salute umana. La DGA, ad esempio, si basa sugli studi di immunotossicità del TBT effettuati su ratti adulti: dalle osservazioni sulla riduzione del peso del timo nei ratti esposti per via alimentare, sono infatti state calcolate le dosi giornaliere ammissibili per gli esseri umani (Penninks, 1993). Oltre alle disfunzioni a livello del sistema immunitario, altri autori si sono, ad esempio, dedicati alle risposte a livello del sistema endocrino, dimostrando che, anche nell'uomo, i composti organostannici possono agire come inibitori dell'aromatasi del citocromo P450, l'enzima responsabile della conversione degli androgeni in estrogeni (Graceli et al., 2013 e autori citati). I cambiamenti conformazionali dell'enzima, indotti da questi contaminanti ambientali, dipendono dalla concentrazione presente, ma anche dal numero di residui butilici del composto stesso. È stato provato, infatti, che il TBT è, tra i butilstannici testati, il più potente inibitore dell'attività di aromatasi, seguito dal DBT, ma con potenzialità inferiori, mentre per l'MBT non sono stati rilevati effetti simili sull'attività enzimatica (Heidrich et al., 2001). Anche il TPhT inibisce l'aromatasi degli esseri umani, mentre nei roditori influisce negativamente sullo sviluppo sessuale sia dei maschi che delle femmine (Omura et al., 2001; Ogata et al., 2001; Grote et al., 2004). Nei mammiferi, in generale, i composti organostannici sono uno dei maggiori fattori di rischio per le funzioni riproduttive in entrambi i sessi. Sebbene diversi studi abbiano documentato danni al sistema riproduttivo maschile, gli effetti avversi indotti nelle femmine sono particolarmente rilevanti, soprattutto durante la gravidanza. Il periodo più critico sembra essere la gestazione, durante la quale la placenta e gli altri tessuti fetali assorbono più facilmente i composti organostannici dalla circolazione materna e li accumulano inducendo effetti tossici, quali la diminuzione della crescita degli organi sessuali, lo sbilanciamento dei livelli ormonali nell'asse ipotalamo-pituitario-gonadico, l'alterazione nel ruolo degli enzimi sessuali e lo sviluppo anormale del feto (Graceli et al., 2013 e autori citati). Oltre ad essere interferenti endocrini, negli esseri umani i composti organostannici si comportano anche da obesogeni: essi infatti agiscono indirettamente sugli adipociti modificando il metabolismo basale, spostando il bilancio energetico a favore dell'accumulo di calorie e alterando il controllo ormonale dell'appetito e della sazietà (Hinadera e Shimura, 2005; Meador, 2007; Graceli et al., 2013). Il meccanismo di azione riguarda in questo caso l'attivazione degli RXR e PPAR (Grün e Blumberg, 2007), gli stessi recettori che potrebbero essere implicati nell'induzione dell'imposex nei gasteropodi (vedi paragrafo 1.4). Studi specifici sul TBT hanno evidenziato, in organismi modello (piccoli roditori, primati, ecc), come questo composto sia in grado di indurre l'apoptosi in diverse cellule, come quelle del timo (Raffray et al., 1993; Zucker et al., 1994; Sumpter, 1998), degli epatociti (Reader et al., 1999), dei neuroni (Thompson et al., 1996) e delle cellule del feocromocitoma (Funahashi et al., 1980; Aw et al., 1990; Viviani et al., 1995). Tale specificità è stata, inoltre, stimolo per la verifica delle proprietà farmacologiche del TBT, evidenziando, invece, che la presenza di questo composto a livelli non tossici per individui sani può addirittura aggravare alcuni tipi di malattia, come le disfunzioni del sistema nervoso autonomo (Mizunashi et al., 2000). In generale, i composti organostannici sono per la maggior parte neurotossici, un effetto descritto soprattutto nei piccoli mammiferi. Il trietilstagno (TET), ad esempio, ha un'alta affinità di legame con la mielina, mentre il trimetilstagno (TMT) provoca la morte cellulare del sistema limbico, della neocorteccia e dei neuroni sensoriali (Walsh e DeHaven, 1988). TET e TMT sono, infatti, potenti sostanze neurotossiche che provocano effetti negativi sul comportamento dei mammiferi e di altri vertebrati (Meador, 2011).

2 LE NORME E I LIMITI PER GLI ORGANOSTANNICI

2.1 Regolamentazione delle vernici antivegetative a base di TBT

2.1.1 Iniziative legislative delle singole Nazioni

Le prime iniziative volte a ridurre il rilascio massivo di TBT dai rivestimenti a protezione degli scafi delle imbarcazioni e a contrastare gli effetti tossici indotti sulle biocenosi marine furono prese dai singoli Stati in modo indipendente (Figura 5). La Francia fu la prima a limitare l'uso, la produzione e la vendita di vernici a base di TBT, in quanto il settore della molluschicoltura particolarmente sviluppato nella Regione Atlantica subì, tra il 1975 e il 1982, significative perdite economiche a causa delle malformazioni delle conchiglie delle ostriche indotte dal TBT (vedi paragrafo 2.4). Il 19 gennaio 1982 il Ministero dell'Ambiente Francese impose limitazioni all'applicazione di tali prodotti sulle imbarcazioni di lunghezza inferiore a 25 m. Tale divieto, inizialmente circoscritto alla sola costa atlantica e ai prodotti contenenti il biocida in concentrazioni superiori al 3%, fu esteso al resto del Paese pochi mesi dopo (14 settembre 1982).

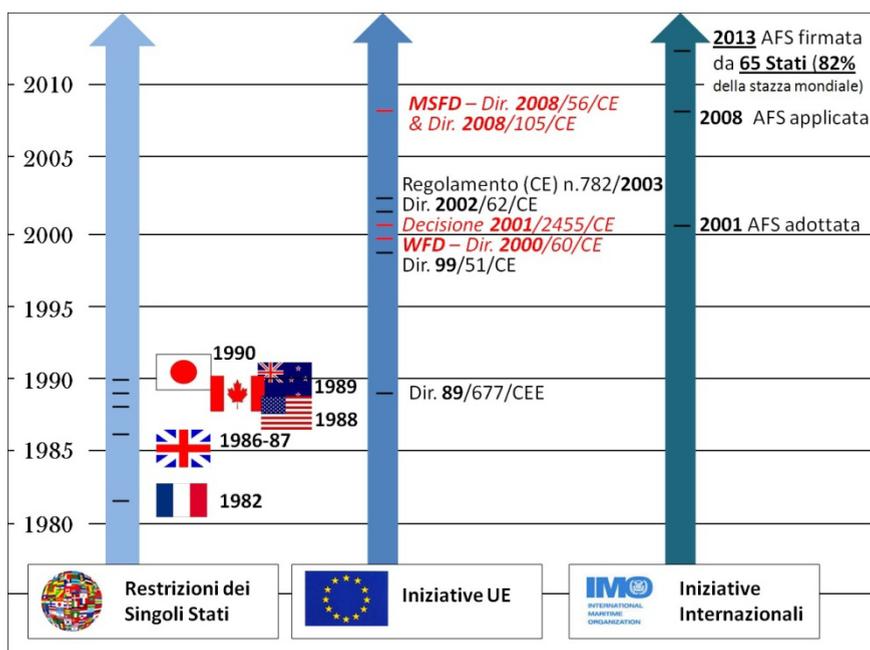


Figura 5. Cronologia delle principali iniziative normative adottate dai singoli Stati, dall'Unione Europea e dalla comunità internazionale (IMO, International Maritime Organization) dall'inizio degli anni Ottanta ad oggi. Abbreviazioni: AFS: *Convention on the Control of Harmful Anti-fouling System on Ships*; WFD: *Water Framework Directive, Direttiva Quadro sulle Acque*; MSFD: *Marine Strategy Framework Directive, Direttiva sulla Strategia Marina*.

Nel 1986 il Governo Inglese proibì l'uso di tali vernici sulle imbarcazioni di piccola dimensione e fissò la concentrazione-soglia in acqua a 20 ng TBT/L, valore ridotto a 2

ng TBT/L nel corso dell'anno successivo. Negli stessi anni provvedimenti simili, quali limitazioni all'applicazione delle vernici con TBT su scafi di piccola dimensione, regolamentazione del contenuto del biocida e del tasso di rilascio, furono messi in atto anche al di fuori dell'Europa, come negli Stati Uniti [US Antifouling Paint Control Act of 1988], in Canada [Canadian Pest Control Act, 1989], Australia (1989), Giappone (1990), Nuova Zelanda (1993) [Alzieu, 1998; Champ, 2000; Hoch, 2001].

2.1.2 Iniziative legislative europee ed internazionali

A livello Comunitario la prima azione compiuta per contrastare l'aggravarsi della contaminazione marina da TBT fu l'adozione della Direttiva 89/677/CEE, che modificò la normativa quadro che disciplinava l'utilizzo delle sostanze e dei preparati pericolosi (Direttiva 76/769/CEE). La Direttiva 89/677/CEE introdusse i composti organostannici nella lista delle sostanze pericolose soggette a restrizione [Allegato I] (Figura 6) ed unificò a livello europeo la disciplina sull'uso dei prodotti antivegetativi contenenti TBT, proibendone l'utilizzo sugli scafi di lunghezza inferiore a 25 m e sulle strutture sommerse adibite alla pesca e all'acquacoltura. Inoltre, la vendita fu riservata esclusivamente ad utilizzatori professionali. Successivamente, nel 1999, tale disciplina venne resa ulteriormente più restrittiva, mettendo al bando tutte le vernici antivegetative con TBT in libera associazione ed estendendo il divieto anche per le acque interne (Direttiva 1999/51/CE).

Il recepimento della normativa Europea da parte degli Stati Membri (in Italia con D.M. 29/07/1994 e D.M. 13/12/1999) fece significativamente ridurre, ma non arrestare, il rilascio di TBT negli ambienti acquatici durante gli anni '90. Infatti, in quegli anni, le vernici con un tasso di rilascio inferiore a $4 \mu\text{g TBT}/\text{cm}^2/\text{giorno}$ venivano regolarmente applicate agli scafi di grande dimensione [$>25\text{m}$].

Una volta accertata l'estrema tossicità del TBT sulle biocenosi marine, divenne chiara l'urgenza di adottare restrizioni a scala internazionale, essendo ormai considerate insufficienti alla risoluzione del problema le azioni individuali di ciascuno Stato.

Nel 2001 l'IMO (International Maritime Organization) adottò la *Convention on the Control of Harmful Anti-fouling System on Ships*, nota come Convenzione AFS, la quale proibì sia nuove applicazioni di vernici antivegetative a base di TBT a partire dal 1 gennaio 2003, sia la presenza delle stesse sulla superficie degli scafi e delle strutture sommerse a partire dal 1 gennaio 2008. Tali prescrizioni, rivolte alle imbarcazioni di qualsiasi dimensione battenti bandiera di uno Stato firmatario o operanti presso le sue acque territoriali, non entrarono immediatamente in vigore in quanto necessitavano della ratifica da parte di 25 Stati, la cui stazza complessiva coprisse almeno il 25% del tonnellaggio lordo mondiale.

Data l'assenza di efficacia immediata da parte della Convenzione AFS, la Comunità Europea rispose promulgando la Direttiva 2002/62/CE, la quale estese le prescrizioni all'uso di vernici a base di TBT a qualsiasi tipo d'imbarcazione, indipendentemente dalla lunghezza. L'anno seguente l'Unione Europea decise di affrontare in maniera definitiva il problema mettendo in atto un'azione "anticipatoria" della Convenzione AFS. Venne emanato il Regolamento (CE) No. 782/2003, con il quale s'impose l'immediato rispetto di prescrizioni del tutto simili a quelle adottate della Convenzione AFS a tutte le imbarcazioni battenti bandiera di uno Stato Membro e a qualsiasi imbarcazione entrante

nei porti UE o operante all'interno delle acque territoriali come pure sulle strutture *off-shore* comunitarie.



Figura 6. Cronologia delle principali iniziative legislative Europee per regolamentare l'uso dei prodotti antivegetativi contenenti composti organostannici.

Al di fuori dei confini europei, la definitiva messa al bando dei prodotti antivegetativi contenenti TBT venne raggiunta solo il 17 settembre 2008 quando la Convenzione AFS fu firmata da 25 Stati, rappresentanti il 38,1% della stazza mondiale. Negli anni a seguire il numero dei Paesi firmatari è progressivamente aumentato, fino all'attuale pressoché completo raggiungimento della messa al bando mondiale (69 Stati rappresentanti oltre l'80% del tonnellaggio mondiale¹).

2.2 TBT nella normativa ambientale

2.2.1 TBT e Direttiva Quadro sulle Acque (WFD)

A partire dalla fine degli anni '80 la progressiva adozione di restrizioni sempre più severe sull'uso di TBT nelle formulazioni delle vernici antivegetative portò al progressivo declino negli ambienti acquatici delle concentrazioni di TBT e prodotti di degradazione, DBT e MBT. Numerosi studi scientifici hanno infatti descritto la progressiva diminuzione dei livelli di TBT in tutti i comparti dell'ambiente marino, specialmente nella colonna d'acqua e

¹ <<http://www.imo.org/About/Conventions/StatusOfConventions/Pages/Default.aspx>>; aggiornato all'8 aprile 2015

nel biota (Evans et al., 1995, e riferimenti in esso riportati). Contemporaneamente su scala mondiale venne registrato il progressivo recupero delle condizioni ecologiche laddove, negli anni precedenti, erano state registrate le situazioni più critiche che avevano fatto scattare l'allerta sul "caso TBT". Più precisamente, venne osservato il recupero della produttività negli allevamenti di ostriche francesi ed inglesi, il ripristino delle popolazioni più sensibili di murici (*Nucella lapillus*) nelle aree da cui erano sparite, la diminuzione del grado di imposex nelle popolazioni naturali di gasteropodi, il recupero delle comunità macroinfaunali ed epifaunali nelle aree contaminate (Alzieu, 1998; Champ, 2000; Smith et al., 2008; Rees et al., 2011).

Tuttavia, nonostante la definitiva messa al bando del TBT come agente antivegetativo, rimane oggi l'esigenza di proseguire il monitoraggio dei livelli dei composti organostannici negli ambienti acquatici, data l'elevata persistenza e la loro biomagnificazione lungo la catena alimentare (EPA, 2002; Fortibuoni et al., 2013). Infatti, le concentrazioni attualmente rilevate nelle matrici marine costituiscono ancora una minaccia per la salute degli ecosistemi acquatici, in quanto superiori alla concentrazione minima capace di indurre i noti effetti tossici. In particolare, i sedimenti delle aree *hot-spot* (es. porti, darsene e aree ad elevata densità di traffico marittimo; Berto et al., 2007; Sousa et al., 2007), che nel periodo antecedente alla messa al bando accumularono elevate concentrazioni di TBT, fungono oggi da fonte di contaminazione secondaria per gli ambienti circostanti (Maggi et al., 2012).

In Unione Europea, il TBT è inserito tra gli inquinanti degli ambienti acquatici disciplinati dalla Direttiva Quadro 2000/60/CE (Water Framework Directive, WFD). Lo scopo di tale Direttiva è quello di raggiungere entro il 2015 il Buono Stato Ambientale attraverso il conseguimento degli obiettivi di qualità chimica ed ecologica. In accordo con quanto stabilito all'Art. 16, il Buono Stato Chimico viene raggiunto qualora le concentrazioni delle sostanze considerate prioritarie (in quanto comportano rischi significativi al/attraverso l'ambiente acquatico) non superino gli Standard di Qualità Ambientali stabiliti nell'Allegato IX. In tale contesto, il TBT è considerato una sostanza prioritaria, più precisamente del sottogruppo delle sostanze pericolose prioritarie, per le quali è posto come obiettivo la completa eliminazione di scarico, emissione e perdita. La lista completa delle sostanze prioritarie e pericolose prioritarie venne definita dalla Decisione n. 2455/2001/CE, mentre i relativi Standard di Qualità Ambientali, relativi alla matrice acqua, dalla Direttiva 2008/105/CE (oggi modificata dalla Direttiva 2013/39/CE). L'Allegato I fissa come Standard di Qualità Ambientale per il TBT la concentrazione media annua di 0,0002 µg TBT/L e la concentrazione massima ammissibile di 0,0015 µg TBT/L. Nonostante la Direttiva abbia scelto di riferirsi alle concentrazioni nella matrice acqua per definire il raggiungimento dell'obiettivo di qualità chimica del corpo idrico, agli Stati Membri viene data la possibilità di stabilire dei propri Standard di Qualità Ambientale per le matrici sedimento e biota, purché essi siano altrettanto restrittivi (Art. 16(7) WFD; Art. 3 Direttiva 2008/105/CE). In Italia, il Decreto Ministeriale 260/2010 definisce come standard di qualità nazionali per il TBT nei sedimenti degli ambienti marini e di transizione il valore soglia di 5 µg TBT/kg p.s..

2.2.2 TBT nella Direttiva sulla Strategia Marina (MSFD): Descrittore 8

Recentemente, a livello europeo, la protezione degli ecosistemi marini dagli effetti della contaminazione chimica è stata inclusa tra gli obiettivi della Direttiva quadro sulla Strategia Marina (Direttiva 2008/56/CE; Marine Strategy Framework Directive,

MSFD). La MSFD costituisce il quadro normativo di riferimento per le azioni volte all'utilizzo sostenibile del mare in Europa e alla conservazione degli ecosistemi marini. Essa pone come obiettivo il raggiungimento (o il mantenimento) del Buono Stato Ambientale (*Good Environmental Status*, GES) dei mari europei entro il 2020, attraverso l'applicazione di un approccio ecosistemico alla gestione delle attività umane, delle risorse marine e dei servizi. Con questa Direttiva, l'UE chiede a ciascuno Stato Membro di sviluppare concretamente una propria strategia marina finalizzata al raggiungimento del GES e di intraprendere un programma di azioni che tenga conto delle proprie specificità e del coordinamento con gli altri Stati conferenti alla stessa Regione/Sottoregione.

Al fine di assicurare coerenza e confrontabilità inter-/intra- Regione/Sottoregione, la Commissione Europea ha fornito un elenco di undici "Descrittori" sulla base dei quali deve avvenire la valutazione del raggiungimento del GES. Il tema della contaminazione viene specificatamente proposto dal Descrittore 8, il quale stabilisce che "la concentrazione degli inquinanti deve essere tale da non produrre effetti". Come per gli altri Descrittori, all'interno della Decisione n. 477/2010/UE il Descrittore 8 viene esplicitato in termini di "criteri" (caratteristiche tecniche) e "indicatori specifici", a cui riferirsi per la valutazione oggettiva ("misurazione") dell'efficacia della strategia adottata. Concretamente, gli Stati Membri devono documentare il progressivo avvicinamento alla condizione in cui il livello di contaminazione degli ambienti marini è tale da non impedire il raggiungimento del GES, facendo riferimento a:

Criterio 8.1) contaminati, devono essere presenti in concentrazioni compatibili con quanto stabilito dalla Direttiva 2000/60/CE (Indicatore 8.1.1);

Criterio 8.2) gli effetti tossici per i quali è stata accertata la relazione causa/effetto con un contaminante (Indicatore 8.2.1), e l'impatto fisico di eventi di contaminazione acuta sul biota (Indicatore 8.2.2).

La presenza del TBT negli ambienti marini, essendo disciplinata dalla WFD e dalle Direttive figlie, è tra gli elementi che devono essere considerati per stabilire il raggiungimento del Descrittore 8. In riferimento alla richiesta di monitorare gli effetti della contaminazione (indicatore 8.2.1), la determinazione dello sviluppo di imposex nelle popolazioni naturali di gasteropodi è considerato un possibile bioindicatore. Infatti, nonostante non si possa escludere una possibile influenza nell'induzione del fenomeno da parte di altri contaminanti capaci di alterare il regolare funzionamento del sistema endocrino (Maran et al., 2006), è stato ampiamente dimostrato che il TBT è primariamente responsabile dello sviluppo di tale deformazione. L'analisi dello sviluppo di imposex nei gasteropodi marini è già inclusa nelle strategie di monitoraggio di alcune Convenzioni Regionali. In particolare dal 2003 la stadiazione dell'imposex nei comuni gasteropodi (*Nucella*, *Littorina*, *Buccinum*, *Neptunea*) fa parte del programma CEMP (Co-ordinated Environmental Monitoring Programme) della Convenzione OSPAR (Convention for the Protection of the marine Environment of the North-East Atlantic). L'OSPAR ha infatti inserito l'imposex tra gli *Ecological Quality Element*e, in collaborazione con ICES, ha stabilito un proprio *Ecological Quality Objective* (EcoQO) come riferimento per stabilire il raggiungimento del livello desiderato di qualità marina (JAMP Guidelines for contaminant specific biological effects monitoring - OSPAR Agreement 2008-9; Provisional JAMP Assessment Criteria for TBT - Specific Biological Effects- Reference Number 2004-15). Anche nell'area del Mar Baltico (HELCOM - Helsinki Commission), durante l'expert workshop CORESET (CORESET HS 5/2013; <<http://meeting.helcom.fi/web/guest/home>>), è stata ribadita la rilevanza dell'imposex come indicatore di riferimento nell'ambito del Baltic Sea Action Plan.

3 CAMPIONAMENTO E METODI DI DETERMINAZIONE ANALITICA

3.1 Campionamento, trattamento e conservazione dei campioni

Il campionamento è la prima fase di ogni processo analitico, dalla quale dipende direttamente la qualità dei risultati ottenuti. Il campionamento rappresenta pertanto un punto estremamente complesso ed importante che potrebbe condizionare tutti i risultati delle operazioni successive incidendo, in particolare, sull'incertezza totale del risultato dell'analisi (APAT - IRSA/CNR, 2003). La predisposizione di un corretto piano di campionamento, che garantisca la rappresentatività del campione, è fondamentale per definire la corretta interpretazione e discussione del dato analitico ottenuto. Per tale motivo, è importante che il campionamento venga effettuato da personale qualificato ed opportunamente addestrato (Cicero e Di Girolamo, 2001).

3.1.1 *Acqua*

Il campionamento dell'acqua, alle diverse quote, viene effettuato mediante bottiglia Niskin dalla quale vanno prelevati i subcampioni per la determinazione dei composti organostannici. In bassi battenti d'acqua, tipici delle lagune, il campione prelevato può essere unico e rappresentativo dell'intera colonna d'acqua, oppure distinto in un campionamento superficiale (0,2-0,5 m dalla superficie) e uno profondo (0,2 m dal fondo). Durante il campionamento dell'acqua è importante fare attenzione a non contaminare il campione utilizzando opportune cautele. I campioni (≈ 1 L) vengono raccolti in recipienti di vetro ambrati, pretrattati con HNO_3 , risciacquati con acqua deionizzata, al fine di eliminare contaminazioni, e avvinati (almeno 2 volte) con l'acqua di campionamento. I campioni sono infine acidificati fino a $\text{pH}=2$ per favorire un'efficiente conservazione ed estrazione dei composti organostannici.

Se si vogliono valutare gli analiti presenti esclusivamente nella fase disciolta, il campione d'acqua deve essere preventivamente filtrato con filtri GF/F (pretrattati a 150°C per 1 notte). Diversamente, se si vuole analizzare il totale, non occorre effettuare alcuna filtrazione.

I campioni vengono conservati al buio a -20°C fino al momento dell'analisi, da effettuarsi nel più breve tempo possibile.

3.1.2 *Sedimento*

Il campionamento dei sedimenti superficiali o profondi viene effettuato con strumenti meccanici (benna, box corer, carotiere) scelti a seconda dello strato di indagine da campionare. I campioni per le analisi dei composti organostannici vengono raccolti in contenitori di polipropilene (PP), previa omogeneizzazione del sedimento, e conservati ad una temperatura di -20°C al buio fino al momento della preparativa analitica.

I campioni in laboratorio sono liofilizzati, setacciati a 2 mm, privati di possibili residui di materiale detritico di origine animale e vegetale, omogeneizzati mediante polverizzazione in mortaio o con mulino a coltelli e quindi conservati ad una temperatura di -20°C al buio fino al momento delle analisi.

3.1.3 Biota

Il campionamento del biota si effettua utilizzando i metodi più idonei per la cattura delle specie di interesse (per maggiori dettagli sulla scelta delle specie si veda il capitolo 5). I molluschi bivalvi più comunemente utilizzati nelle indagini di bioaccumulo sono *Mytilus galloprovincialis* e *Ruditapes* spp.. I mitili sono generalmente raccolti raschiando substrati duri (ad es.: pali, briccole, moli, piloni, corde sospese, ecc.), mentre le vongole mediante rastrello manuale (Figura 7) o mezzi meccanici. I molluschi gasteropodi possono essere catturati mediante nasse o trappole (Figura 8) contenenti le esche più opportune in funzione delle abitudini alimentari della specie scelta (ad es.: esche vive per i predatori, animali morti per i saprofiti), oppure pescati mediante rasche manuali o reti da posta. I pesci possono essere catturati mediante i normali mezzi da pesca meccanici (reti a strascico, reti volanti, ecc.), nasse o trappole, reti da posta, reti manuali (Figura 9), ecc.



Figura 7. Rastrello manuale per la raccolta delle vongole (Foto di Rossella Boscolo Brusà)

In base alla strategia di monitoraggio prescelta, gli organismi possono essere raccolti da popolazioni naturali (monitoraggio passivo), oppure prelevati da siti di riferimento e trapiantanti nei siti di monitoraggio (monitoraggio attivo).

Il numero di animali da campionare per ciascuna specie viene opportunamente scelto sia considerando l'aliquota necessaria alle analisi chimiche, sia in funzione delle valutazioni biologiche che si intendono approfondire (per maggiori dettagli su test e indici integrativi per la valutazione del bioaccumulo si veda il capitolo 5).



Figura 8. Esempi di tecniche di cattura per molluschi gasteropodi. A sinistra: trappola costruita da una bottiglia. In centro: trappola ad imbuto (Sigovini et al., 2006; foto CNR-ISMAR). A destra: nasse.



Figura 9. Esempio di rete manuale utilizzata per la cattura della fauna ittica.

Una volta raccolti, gli organismi vengono portati immediatamente in laboratorio, dove ciascun individuo viene misurato (con un calibro decimale al mm inferiore, o mediante ittiometro), privato della conchiglia o della lisca e dissezionato in base ai tessuti che si vogliono sottoporre alla determinazione analitica (ad es.: intero corpo molle per i molluschi bivalvi; *visceral coil* per i molluschi gasteropodi; muscolo e/o fegato per i pesci; ecc.).

Infine, i campioni vengono opportunamente congelati, liofilizzati, omogeneizzati e conservati ad una temperatura di -20 °C al buio fino al momento delle analisi.

3.2 Metodi analitici

La determinazione dei composti organostannici in matrici ambientali, quali acque marine e lagunari, sedimento e biota, richiede l'uso di tecniche analitiche sensibili e selettive, in grado di mantenere la speciazione delle diverse forme chimiche. Esistono in letteratura diversi metodi analitici per la determinazione dei composti butilici e fenilici dello stagno in matrici ambientali. Nella maggior parte dei casi l'analisi è basata sulla separazione cromatografica (liquida o gassosa), seguita da rilevamento mediante spettrometria di massa (MS), spettrometria ad assorbimento atomico (AAS), spettrometria ad emissione atomica (AES), fotometria di fiamma (FPD) o fotometria di fiamma pulsata (PFPD). Prima della determinazione strumentale, il campione viene sottoposto ad una serie di operazioni sequenziali, le più importanti delle quali sono l'estrazione (separazione dei composti dalla matrice mediante utilizzo di solventi), la derivatizzazione (per convertire gli analiti in forme più volatili, idonee all'analisi gas cromatografica) e la purificazione (eliminazione di sostanze interferenti, ad es.: lipidi e proteine presenti nelle matrici biologiche, acidi umici e fulvici nei sedimenti).

Nei paragrafi successivi (Paragrafi 4.2.1- 4.2.4) vengono descritte brevemente alcune metodiche di estrazione, derivatizzazione e purificazione riportate in letteratura. Nella Scheda Tecnica 1 si illustra la metodica applicata presso i laboratori della Struttura Tecnico Scientifica ISPRA di Chioggia per le matrici biota, sedimento e acque marine e lagunari.

Infine al paragrafo 4.2.5 viene descritta la tecnica di microestrazione in fase solida (*Solid Phase Microextraction*, SPME) applicata all'analisi dei composti organostannici.

3.2.1 Estrazione

Le metodiche di estrazione dei composti organostannici dalle matrici ambientali possono essere suddivise in relazione a diversi parametri, tra cui l'utilizzo di solventi a diversa polarità e di acidi forti. Nella Tabella 7 sono riassunte diverse tecniche estrattive riportate in letteratura per differenti matrici.

Per massimizzare la resa, l'estrazione viene spinta mediante processi fisici quali agitazione meccanica (Maguire, 1984), sonicazione (Jiang et al., 1991) e azione delle microonde (Liu et al., 2004; Guérin et al., 2007). Nel caso di estrazioni liquido/liquido in presenza di elevate concentrazioni di lipidi, diversi autori ricorrono all'aggiunta di sali (ad es.: cloruro di sodio) i quali, agendo come contro ioni, favoriscono la rottura delle emulsioni (Zhang et al., 1991; Harino et al., 1992; Chau et al., 1995; Abalos et al., 1997; Yang e Miyazaki, 2006).

Tabella 7. Diverse tecniche utilizzate per estrarre i composti organostannici da differenti matrici (Abalos et al., 1997 e autori citati).

Tecnica di estrazione	Solventi utilizzati	Analiti	Matrice
SOLVENTI APOLARI	benzene + tropolone	TBT, DBT, MBT, DBDMeT, TBMeT	sedimento
	esano	TBT	sedimento, biota (bivalvi)
	esano + tropolone	TBT, DBT	sedimento
	esano + tropolone	TBT, DBT, MBT, TeBT	biota (bivalvi)
	esano + acetone	TBT, TPhT, TCyT, FBTO	sedimento, suolo
	toluene + tropolone	TBT, DBT	sedimento
	toluene + tropolone	TBT, DBT, MBT	biota (bivalvi)
	diclorometano	TBT, DBT	sedimento
	diclorometano + tropolone	TBT, DBT, MBT	sedimento, biota (bivalvi, pesci)
SOLVENTI APOLARI CON ACIDO	esano + HCl	TBT, DBT	sedimento
	esano + HCl	TBT, DBT	biota (bivalvi)
	esano + HCl	TBT	sedimento, biota (bivalvi, pesci)
	esano + HCl	TeEtT, TePrT, TeBT	biota (mammiferi)
	esano + tropolone + HCl	TBT, DBT, MBT	sedimento
	esano + tropolone + HCl	TBT, DBT	sedimento
	esano + tropolone + HCl	TBT	biota (bivalvi)
	esano + tropolone + acetato di isobutile	TBT, DBT, MBT	sedimento
	esano + tropolone + acido acetico	TBT, DBT, MBT	sedimento
	esano + tropolone + acetato di etile + HCl	TBT, DBT, MBT	sedimento

Tecnica di estrazione	Solventi utilizzati	Analiti	Matrice
	esano-acetato di etile + HCl	TBT, DBT	biota (pesci)
	esano + acetato di isobutile	TBT, DBT, MBT	sedimento
	esano + acetato di isobutile	TBT, DBT	sedimento
	acetato di etile + HCl	TBT, DBT, MBT, TPhT, DPhT, MPhT	sedimento, biota (pesci)
	acetato di etile + HCl	TBT, TPhT, TMeT	biota (pesci)
	acetato di etile + HCl	DMeT, DEtT, DPrT, DBT, DOcT	biota (mammiferi)
	acetato di etile + HCl	TMeT, DMeT, MMeT	biota (pesci)
	acetato di isobutile + HCL	TBT, DBT	sedimento
	dietiletere + HCl	TBT, DBT, MBT, TPhT, DPhT	biota (bivalvi)
	dietiletere-esano + HCl	TBT, DBT	biota (pesci)
	dietiletere-esano + tropolone + HCl	TBT, DBT, MBT, TPhT, DPhT	biota (bivalvi)
	dietiletere + tropolone + HCl	TBT, DBT, MBT, TPhT, TCyHeT	sedimento
	dietiletere + tropolone + HCl	TBT, DBT, MBT, TPhT, DPhT, MPhT, TCyT, DCyT, FBTO	biota (bivalvi)
	dietiletere + tropolone + HCl	TBT, DBT, MBT, TPhT, DPhT, MPhT, TCyT	sedimento, fanghi di depurazione, biota (bivalvi, pesci)
	dietiletere + tropolone + HCl	TBT, DBT, TPhT	sedimento

Tecnica di estrazione	Solventi utilizzati	Analiti	Matrice
	diclorometano + HCl	TBT	sedimento, biota (bivalvi, pesci)
	diclorometano + HCl	TBT	biota (bivalvi)
	diclorometano + HCl	TBT, DBT	sedimento
	diclorometano + HCl	TBT, DBT	biota (bivalvi)
	diclorometano + HCl	TBT, DBT, MBT, DCyT	biota (bivalvi)
	diclorometano + tropolone + HCl	TBT, DBT, MBT	sedimento
	benzene + HCL	TBT, TeBT	sedimento, acque reflue, fanghi di depurazione, biota (bivalvi)
	benzene + tropolone + HCl	TBT, DBT, MBT, TPhT, DPhT, MPhT	sedimento, biota (bivalvi, mammiferi)
	benzene + tropolone + HCl	TBT, TPhT, TPrT, TEtT, TMeT	sedimento
	benzene + tropolone + HCl	TBT, DBT, MBT	biota (pesci)
	benzene + tropolone + HBr	TBT, DBT, MBT, TPhT, DPhT, MPhT	biota (bivalvi)
	toluene + tropolone + HCl	TBT, DBT, MBT	sedimento, fanghi di depurazione
	toluene + tropolone + HBr	TBT, DBT, MBT, TeBT	biota (bivalvi)
	toluene + acido acetico	TBT, DBT, MBT, TPhT, DPhT, TCyT, DCyT, TPeT, MOcT, DOcT	sedimento

Tecnica di estrazione	Solventi utilizzati	Analiti	Matrice
	pentano + HCl	TBT	biota (bivalvi)
	pentano + DDC + acido acetico glaciale	TBT, DBT, TMeT, DMeT	sedimento
	pentano + DDC + acido acetico glaciale	TBT, DBT	sedimento
	pentano + tropolone + HCl	TBT, DBT, MBT, DMeBT, MeDBT	sedimento, biota (pesci)
	pentano + tropolone + HBr	TBT, DBT, MBT, TPhT, DPhT, MPhT	sedimento
	dicloroetano + HCl	TBT, DBT, MBT	biota (bivalvi)
	cloroformio-acetato di etile + HCl	TEtT, DEtT, MEtT	biota (mammiferi)
SOLVENTI POLARI	1-butanolo	TBT	sedimento
	1-butanolo	TBT	sedimento
	CaCl ₂ - HCl	TBT, DBT, MBT, TMeT, DMeT, MMeT	sedimento
	metanolo	TBT, TPhT	sedimento
	metanolo + HCl	TBT, DBT	sedimento, biota (pesci)
	metanolo + HCl	TBT, DBT, MBT, TMeT, DMeT, MMeT	sedimento
	metanolo + HCl	TBT, DBT, MBT	sedimento
	metanolo + NaOH	TBT, DBT, MBT, TMeT, DMeT, MMeT	sedimento
	metanolo + NaOH	TBT, DBT	sedimento, biota (bivalvi)
	metanolo + tropolone	DBT, MBT	sedimento, biota (bivalvi)
	metanolo + tropolone	TBT, DBT, MBT, TPhT	biota (bivalvi)

Tecnica di estrazione	Solventi utilizzati	Analiti	Matrice
	metanolo + tropolone + HCl	TBT, DBT, MBT, TPhT, DPhT, MPhT	biota (bivalvi)
	metanolo + acido acetico	TBT, DBT, MBT, TPhT, DPhT, MPhT	sedimento
	metanolo-acetato di etile	TBT, TPhT	biota (pesci)
	acetone + HCl	TBT, DBT, MBT, TeBT	biota (pesci)
	acido acetico	TBT, DBT, MBT	sedimento, biota (bivalvi)
	acido acetico	TBT, DBT, MBT	sedimento
	acido acetico	TBT, DBT, MBT	sedimento
	HCl	TBT, DBT, MBT, TPhT, DPhT, MPhT	biota (bivalvi)
ESTRAZIONE CON FLUIDI SUPERCRITICI	CO ₂	TeEtT, EEtPeT, DMeDPeT, TeBT, TBPeT, MBTPeT	suolo
	CO ₂	TBT, DBT, MBT, TPhT, DPhT, MPhT	sedimento
	CO ₂ + DDC	TBT, DBT, MBT, DPhT, TEtT, TMeT, DMeT	suolo
	CO ₂ + metanolo	TBT, DBT, MBT	sedimento
	CO ₂ + metanolo	TBT, TPhT	biota (pesci)
	CO ₂ + metanolo-HCl	TBT	sedimento
IDROLISI BASICA ED ENZIMATICA	TMAH, benzene + tropolone	TMeT, DMeT, MMeT	biota (pesci)
	proteasi, esano + tropolone	TBT, DBT	biota (bivalvi, pesci)
	proteasi, esano + diclorometano	TMeT, DMeT	biota (bivalvi, pesci)
	proteasi, esano	TeMeT, TeEtT	biota (bivalvi, pesci)

Tecnica di estrazione	Solventi utilizzati	Analiti	Matrice
	KOH in etanolo + HCl	TBT, DBT, TPhT	biota (pesci)
	NaOH in Etanolo/acqua + HCl	TBT, DBT, MBT, TPhT, DPhT, MPhT	biota (bivalvi)
	TMAH, ESANO + tropolone	TBT, DBT, MBT	biota (bivalvi, pesci)

3.2.2 Derivatizzazione

Per consentire la separazione gas cromatografica, i composti organostannici vengono resi più volatili attraverso una reazione di derivatizzazione [Chau et al., 1997]. Questa fase è estremamente importante in quanto tali composti sono generalmente presenti nei campioni in forma di sali, quindi difficilmente determinabili poiché poco volatili.

Tabella 8. Elenco sintetico dei metodi di derivatizzazione dei composti organostannici riportati da Abalos et al. (1997) e autori citati.

	Alchilazione		Generazione degli idruri
Reagenti	Reagenti di Grignard (R-Mg-X, dove R è un gruppo alchilico e X è un alogeno)	Sodio tetraetilborato (NaBEt ₄)	Sodio tetraidroborato (NaBH ₄)
Reazione	Addizione di gruppi alchilici	Addizione di gruppi etilici	Formazione di idruri
Caratteristiche	<ul style="list-style-type: none"> - metodo più usato - ottimi recuperi - necessarie condizioni anidre e cambi di solventi - resa della reazione scarsamente influenzata dalla matrice 	<ul style="list-style-type: none"> - permette di effettuare la reazione in acqua - minimizza i tempi di analisi - recuperi inferiori rispetto al metodo Grignard nelle matrici complesse - effetto matrice ridotto rispetto al metodo di generazione degli idruri 	<ul style="list-style-type: none"> - bassa stabilità degli idruri - influenza dell'effetto matrice - scarsa ripetibilità

Le reazioni di derivatizzazione più utilizzate sono:

- l'alchilazione, mediante reazione con reattivi di Grignard (Morabito, 2001);
- l'etilazione con tetraetilborato di sodio (Liscio et al., 2009);
- la formazione di idruri mediante reazione con sodioboroidruro (Serra e Nogueira, 2005).

Per ciascuna di queste tipologie, in Tabella 8 sono elencati brevemente i reagenti impiegati, le reazioni coinvolte e le principali caratteristiche evidenziate in letteratura.

3.2.3 Purificazione

La purificazione è un processo analitico che permette l'eliminazione delle sostanze interferenti, co-estratte dalla matrice insieme agli analiti, e che possono determinare un effetto di "rumore" nella determinazione strumentale. Comunemente si effettua mediante una separazione solido/liquido, in cui la scelta del materiale adsorbente e del solvente di eluizione avviene sulla base delle caratteristiche delle matrici da analizzare (abiotiche e biotiche). In Tabella 9 si riportano alcuni esempi, tratti dalla bibliografia, di sostanze utilizzate come adsorbenti per le diverse matrici con riferimento ai composti organostannici.

Tabella 9. Principali agenti adsorbenti utilizzati per la purificazione delle diverse matrici e relativi riferimenti bibliografici

Agente adsorbente	Matrici	Riferimenti bibliografici
Gel di silice	sedimenti	Kuballa et al., 1995; Wong et al., 1994
	pesci	Sullivan et al., 1988; Wong et al., 1994;
	bivalvi	Wong et al., 1994; Quevauviller et al., 1995; Suzuki et al., 1994
Florisil	sedimenti	Harino et al 1992;
	pesci	Nagase et al., 1995
	bivalvi	Harino et al 1992; Gómez-Ariza et al., 1995; Caricchia et al., 1993
	mammiferi	Iwata et al., 1995
Florisil - silice	sedimenti	Becker-van Slooten e Tardellas, 1995
	bivalvi	Uhler et al., 1991, 1993; Becker-

Agente adsorbente	Matrici	Riferimenti bibliografici
		van Slooten e Tardellas, 1994
Florisil - allumina	bivalvi	Jiang et al., 1991
Allumina	sedimenti	Dirkx et al., 1994; Stüb et al., 1993; Ceulemans e Adams, 1995
	bivalvi	Stüb et al., 1994; Stüb et al., 1995
Allumina-silice	sedimenti	Wade et al., 1990; Page et al., 1996
	pesci	Krone et al., 1989
	bivalvi	Wade et al., 1988; Krone et al., 1989
Cartucce C18	sedimenti	Tong et al., 1996
	bivalvi	Tong et al., 1996; Pang et al., 1993; Hungerford et al., 1990
Cromatografia di permeazione su gel	pesci	Sasaki et al., 1988
Cartucce a scambio ionico	pesci	Okamoto, 1991

3.2.4 Tecniche di determinazione strumentale

Le tecniche cromatografiche (HPLC e GC) sono le più usate per l'analisi dei composti organostannici, in quanto, rispetto ad altre tecniche analitiche, presentano notevoli vantaggi in termini di elevata risoluzione dei diversi composti (derivati butilici, fenilici, cicloesilici, metilici, etilici, ottilici), ampia flessibilità (data la possibilità di accoppiamento con diversi rivelatori), brevi tempi di analisi (30-45 min.) e bassi limiti di rilevabilità. La cromatografia liquida, inoltre, presenta il vantaggio di evitare la derivatizzazione, rendendo più semplice e veloce l'intera procedura analitica (Liu et al., 1994, 2004; Lalère et al., 1995).

In Tabella 10 si riporta una sintesi delle tecniche strumentali maggiormente utilizzate con i relativi limiti di quantificazione.

Tabella 10. Strumenti analitici e rispettivi limiti di rilevabilità assoluti (pg) per i composti butilstannici (valori espressi come catione; valori marcati con [*] espressi come Sn) (da Abalos, 1997 e autori citati).

Strumenti Analitici	MBT	DBT	TBT
GFAAS			30000 *
ISMS/MS			5 *
GC-ECD	20-50	20-50	1-50
GC-QFAAS	400-1800	500-1400	700-1200
	25 *	25-35 *	25-34 *
GC-FPD a fiamma singola	7-1500	11-1500	10-1500
	3,7 *	3-30 *	3,4-100 *
GC-FPD a fiamma doppia	270	180	160
GC-FPD senza filtro	8	14	3
GC-FPD a luminescenza indotta sulla superficie di quarzo	0,8-3 *	0,7-3 *	0,8-3 *
GC-MIP-AES	5-10	5-10	5-10
	0,05-4 *	0,05-4 *	0,05-3 *
GC-ACP-AES			880 *
GC-MS		11	9
	0,8-2 *	1-3 *	0,5-1 *
HG-CT-QFAAS	500	1000	3500
	30-400 *	30-500 *	60-1000 *
LC-ICP-AES	7000 *	7000 *	7000 *
LC-ICP-MS			1,5-3,3
		20 *	40 *
LC-MS		1300	1700
LC-flame LEI			60 *
LC-fluorimetro		600	30000
			900 *
LC-GFAAS	500	1100	800

Scheda Tecnica 1 - *Metodica utilizzata nei laboratori della STS ISPRA di Chioggia per la determinazione di composti organostannici in biota, sedimento e acque sia marine che lagunari.*

La metodica utilizzata presso i laboratori ISPRA per la determinazione dei composti organostannici in matrici ambientali è basata sulle metodologie descritte da Binato et al. (1998) e Morabito et al. (1995; 2001). La procedura analitica si compone di una serie di fasi sequenziali quali estrazione, derivatizzazione e purificazione, seguite dalla determinazione analitica mediante analisi gascromatografica accoppiata ad un rivelatore a spettrometria di massa a trappola ionica usato in modalità tandem (GC-MS/MS).

Vetreteria ed accessori

Provette da centrifuga in polipropilene con tappo a vite (volume 50 ml)

Imbuti separatori da 1 L in vetro (per le analisi delle acque)

Imbuti di vetro (diametro 8 cm) per filtrazione su sodio solfato

Lana di vetro (decontaminata mediante ripetuti lavaggi con metanolo e diclorometano)

Provette da 35 ml in vetro

Provette da 35 ml in vetro con tappo a vite teflonato

Provette da 15 ml in vetro

Pipette Pasteur in vetro

Colonnine per purificazione SPE

Vials con tappo a vite (volume 2 ml) con setto perforabile in silicone/PTFE

Microsiringhe

Pipette automatiche a volume variabile

Apparecchiature

Stufa

Bilancia analitica

Bagno ad ultrasuoni

Centrifuga

Bagno riscaldante

Collegamento a gas azoto

Agitatore tipo Vortex

Gas cromatografo con rilevatore MS (spettrometro di massa), colonna capillare da 30 m di lunghezza, diametro interno 0,20 mm e spessore del film 0,25 μm (5% difenil, 95% dimetilpolisilossano)

Forno a muffola

Solventi e reattivi

Acqua ultrapura

N-esano – per analisi di residui pesticidi

Diclorometano – per analisi di residui pesticidi

Alcool metilico – per analisi di residui pesticidi

Acido cloridrico – reattivo puro per analisi

Tropolone (2-idrossi-2,4,6-cicloeptatrien-1-one) – per sintesi

Sodio solfato anidro – reattivo puro per analisi

Cloruro di sodio – reattivo puro per analisi

Metilmagnesio bromuro (3 M in dietil etere) / metilmagnesio cloruro (3 M in THF) – per sintesi

Gel di silice (60-200 μm) – attivato a 180°C per almeno 1 ora e deattivato con acqua al 10%

Florisil (60-100 mesh) – attivato a 150°C per almeno 48 ore

Standard dei composti organostannici (purezza superiore al 95 %)

Tributilstagno cloruro

Dibutilstagno cloruro

Monobutilstagno cloruro

Tetrabutylstagno

Le soluzioni standard utilizzate per la calibrazione sono ottenute derivatizzando opportune miscele di composti organostannici clorurati, ovvero eseguendo una metilazione con metilmagnesio bromuro o metilmagnesio cloruro.

La procedura analitica descritta è riassunta schematicamente nel diagramma di flusso riportato in Figura A.

La determinazione analitica viene effettuata mediante gascromatografo accoppiato ad uno spettrometro di massa (GC-MS/MS). Le condizioni strumentali sono riportate nella Tabella A.

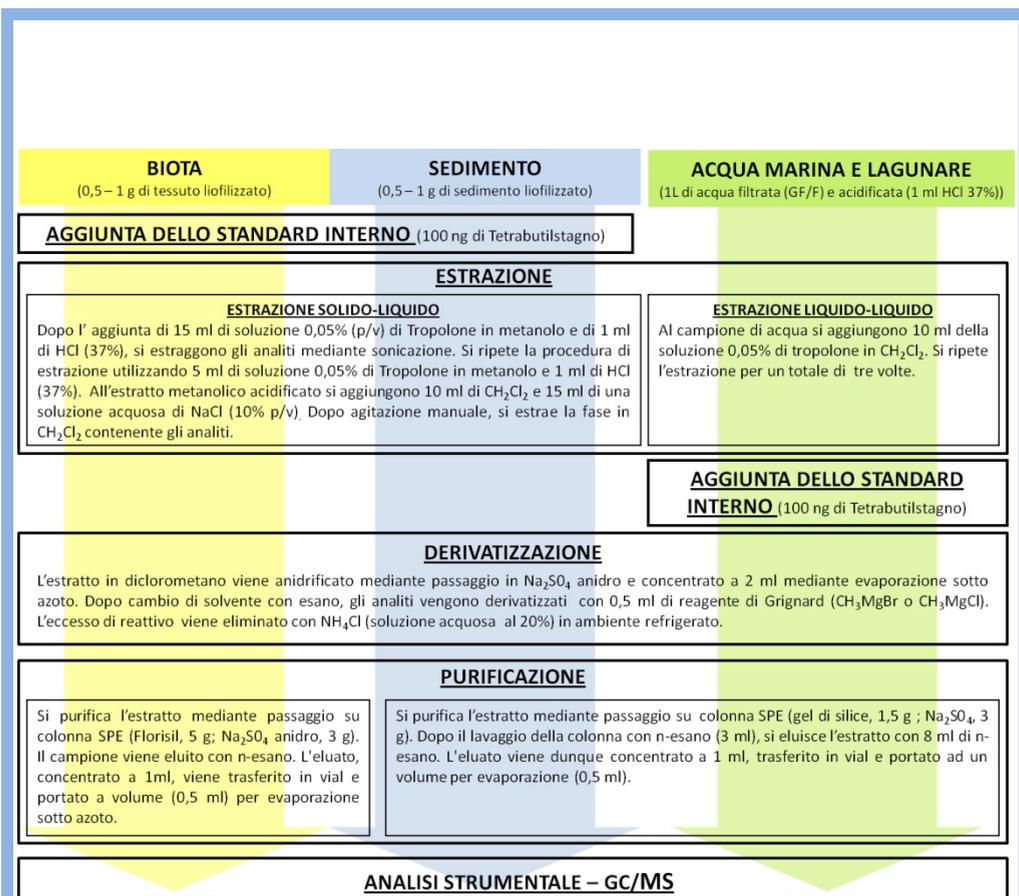


Figura A. Metodo ISPPRA per l'analisi dei composti organostannici in campioni ambientali (biota, sedimenti, acque marine e lagunari). Breve descrizione delle principali fasi analitiche.

I tempi di ritenzione gascromatografici e i dettagli relativi alla frammentazione sono stati riassunti in Tabella B.

In Figura B viene riportato il cromatogramma di ciascun analita con i relativi tempi di ritenzione e la frammentazione. L'identificazione dei composti avviene attraverso l'analisi dei pattern di frammentazione (spettri di massa MS/MS), caratteristici di ogni composto.

In Figura C si riportano le rette di calibrazione per TBT, DBT e MBT: in ascissa viene riportata la concentrazione delle soluzioni standard e in ordinata il rapporto tra l'area del picco del composto in analisi e l'area dello standard interno.

Tabella A. Condizioni strumentali per la determinazione dei composti butilstannici mediante gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa [GC-MS/MS].

Gascromatografo	Trace GC (Thermo Finnigan)
Colonna capillare	DB5-MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m film)
Gas di trasporto	Elio (flusso costante 1.5 ml/min)
Programma di temperatura del forno	50°C (2 min) - 9°C/min fino a 164 (5.20 min) - 50 °C/min fino a 300°C (9.50 min)
Iniettore	Splitless
Volume iniettato	1.5 μ l
Temperatura transfer line	240 °C
Rilevatore	spettrometro di massa a trappola ionica Polaris Q (Thermo Finnigan)
Ionizzazione primaria	Impatto elettronico (EI), 70 eV
Ionizzazione secondaria (MS/MS)	CID (Collision Induced Dissociation)

Tabella B. Tempi di ritenzione e parametri di acquisizione in MS/MS.

Composto	Tempo di ritenzione (min)	Energia di ionizzazione (eV)	Ione primario (m/z)	Ioni secondari (CID) (m/z)	Ione di quantificazione (m/z)
MBT	5,50	0,8	165	135, 150, 165	135
DBT	10,28	0,8	151	120, 135, 151	135
TBT	14,17	0,8	193	137, 193	137
TTBT	18,18	0,8	291	179, 235	179, 235

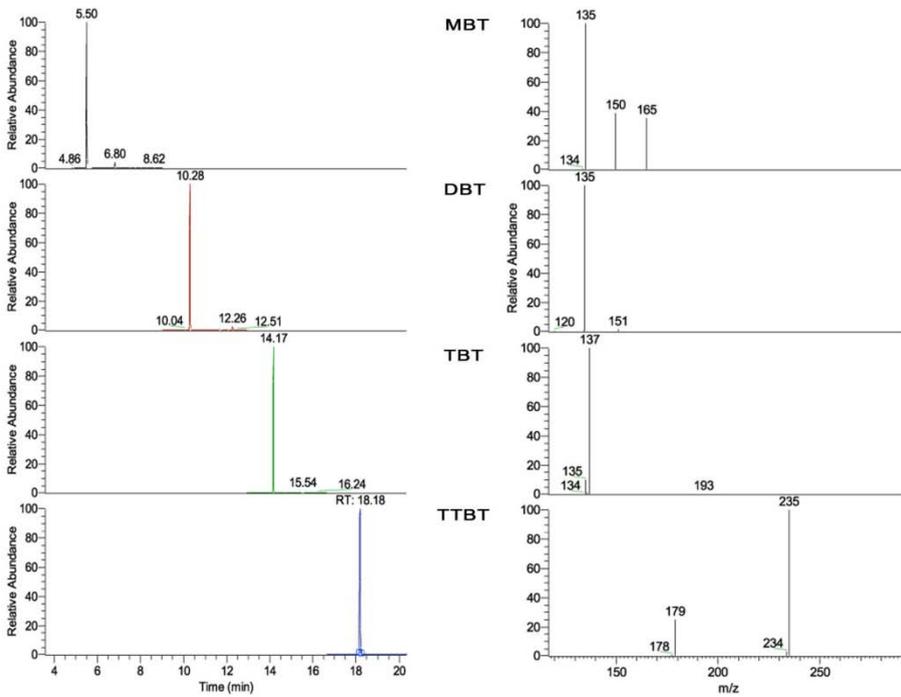


Figura B. Cromatogramma di ciascun analita con i relativi tempi di ritenzione e relativa frammentazione.

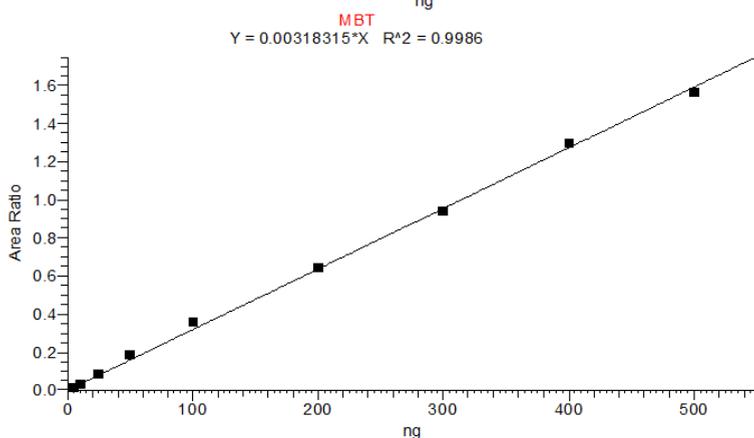
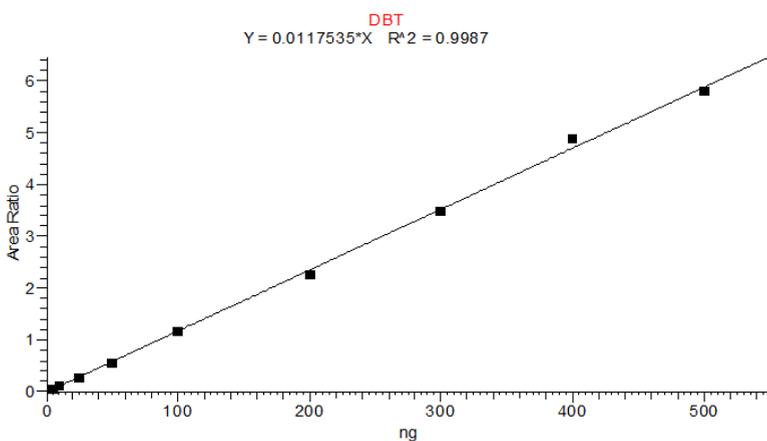
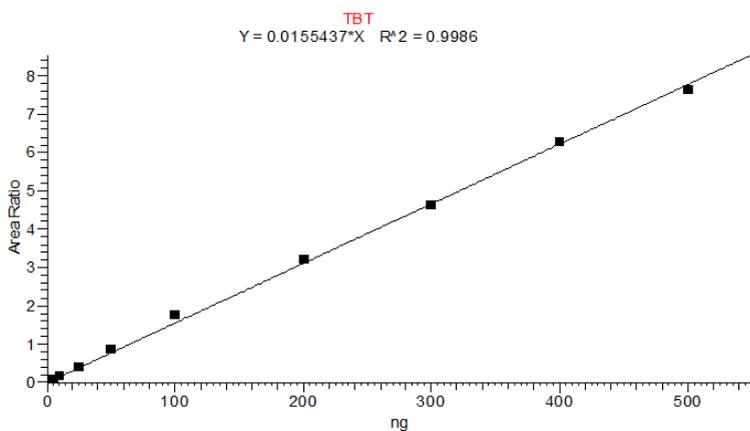


Figura C. Curve di calibrazione rispettivamente per TBT, DBT ed MBT.

Controlli di qualità

I limiti di quantificazione per gli analiti sono riportati in Tabella C. L'accuratezza della metodica è valutata mediante analisi ripetute di materiale certificato rispettivamente per il sedimento (CRM BCR 646 sedimento di acqua dolce e PACS-2 sedimento marino) ed il biota (ERM-CE 477: *Mytilus edulis*), mentre per l'acqua non vi sono al momento materiali certificati. Le percentuali di recupero rispetto ai valori certificati sono riportate rispettivamente nelle Tabelle D, E e F. L'accuratezza e la riproducibilità della metodica sono state, inoltre, ripetutamente testate attraverso la partecipazione al circuito di intercalibrazione internazionale QUASIMEME Laboratory Performance Studies.

Non esistono soluzioni certificate di acqua di mare contenenti i composti organostannici, perciò l'accuratezza del metodo per l'acqua è stata testata utilizzando campioni di acqua ultrapura, addizionati con concentrazioni note di TBT, DBT ed MBT i cui recuperi sono riportati in Tabella G.

Tabella C. Limiti di quantificazione (LdQ) nelle matrici acqua, sedimento e biota per ciascun analita.

Matrice	LdQ	TBT	DBT	MBT
Acqua	ng Sn/L	2	8	5
Sedimento	ng Sn/g s.s.	2	4	4
Biota	ng Sn/g s.s.	2	4	4

Tabella D. Analisi di materiale certificato di riferimento CRM BCR 646 (sedimento di acqua dolce; numero di repliche = 10).

CRM BCR 646	TBT	DBT	MBT
Valore certificato ng catione/g	480 ± 80	770 ± 90	610 ± 120
Valore misurato (media ± dev.std.)	509 ± 33	777 ± 55	557 ± 45
Recupero medio %	106 ± 7	101 ± 7	91 ± 7
CV %	6	7	8

Tabella E. Analisi di materiale certificato di riferimento PACS-2 (sedimento marino; numero di repliche = 10). Il valore di concentrazione di MBT, contrassegnato con *, non è certificato ma solo indicativo.

PACS-2	TBT	DBT	MBT
Valore certificato ng Sn/g	832 ± 95	1100 ± 135	700*
Valore misurato (media ± dev.std.)	866 ± 56	1052 ± 44	526 ± 41
Recupero medio %	104 ± 7	96 ± 4	75 ± 6
CV %	7	4	8

Tabella F. Analisi di materiale certificato di riferimento CRM 477 (*Mytilus edulis*; numero di repliche = 8).

CRM 477	TBT	DBT	MBT
Valore certificato ng catione/g	2200 ± 190	1540 ± 120	1500 ± 280
Valore misurato (media ± dev.std.)	2016 ± 256	1318 ± 92	1325 ± 55
Recupero medio %	92 ± 12	86 ± 6	88 ± 4
CV %	13	7	4

Tabella G. Analisi di campioni di acqua addizionati (200 ng di TBT-Cl, DBT-Cl₂ e MBT-Cl₃ in 1 L di acqua ultrapura; numero di repliche = 10).

Addizionati	TBT	DBT	MBT
ng catione/L	200	200	200
Valore misurato (media ± dev.std.)	238 ± 8	193 ± 12	235 ± 19
Recupero medio %	119 ± 4	97 ± 6	117 ± 10
CV %	3	6	8

Note e precauzioni

Durante le fasi di preparativa del campione va evitato l'uso di materiali plastici che possono rilasciare composti organostannici (es. PVC).

La vetreria deve essere decontaminata attraverso trattamento in muffola a 450 °C, previo accurato lavaggio e trattamento con solventi idonei.

Le soluzioni standard dei composti organostannici si degradano facilmente: è opportuno quindi prepararle sempre al momento dell'uso. Le soluzioni molto concentrate (es. 1000 ppm) possono essere conservate a +4 °C al buio, fino a 3 mesi, mentre, le soluzioni molto concentrate di composti butilstannici derivatizzati sono stabili per più di 3 mesi, se conservate al buio a -20°C.

La fase di concentrazione degli estratti deve essere controllata per evitare la perdita degli analiti; una buona tecnica consiste nell'evaporazione sotto flusso controllato di azoto; in ogni caso si deve evitare di portare a secco l'estratto.

È importante eseguire dei bianchi di procedura insieme ad ogni serie di campioni analizzati al fine di valutare la purezza dei reagenti impiegati. Si fa notare, in particolare, che i reattivi di Grignard disponibili in commercio presentano spesso una contaminazione non trascurabile da composti organostannici, quindi è altamente consigliato, controllare la purezza di ogni confezione di reagente prima dell'uso.

L'utilizzo di standard interni marcati, al posto o insieme al tetrabutilstagno, può essere utile al fine di migliorare le prestazioni analitiche del metodo.

3.2.5 Solid Phase Microextraction (SPME)

Come precedentemente illustrato, i metodi preferenzialmente utilizzati per l'analisi dei composti organostannici in matrici complesse sono basati sulla separazione gascromatografica, grazie all'elevata risoluzione e alla possibilità di accoppiamento con rilevatori sensibili e selettivi (si veda il paragrafo precedente). Tuttavia, a causa della bassa volatilità dei composti organostannici e della loro presenza a livello di tracce nelle matrici ambientali, tali metodi richiedono laboriose fasi per la preparazione del campione (ad es.: derivatizzazione, purificazione, preconcentrazione degli analiti), le quali rendono l'intera procedura dispendiosa in termini di tempo e di consumo di solventi.

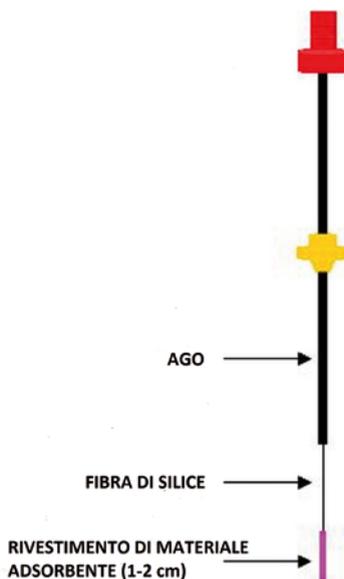


Figura 10. Fibra SPME (modificato da Risticvic et al., 2010)

Un'opzione alternativa per estrarre velocemente ed efficacemente i composti organostannici da matrici ambientali consiste nell'applicazione della tecnica di microestrazione in fase solida (*Solid Phase Microextraction*, SPME) (Arthur and Pawliszyn, 1990). La microestrazione in fase solida è una tecnica analitica introdotta agli inizi degli anni '90 che combina, in un'unica fase, l'estrazione, la purificazione e la concentrazione degli analiti, riducendo drasticamente l'utilizzo dei solventi e i tempi di analisi. Tale tecnica si basa sull'utilizzo di una fibra (Figura 10) costituita da un microstrato di un liquido (polimero) o di un solido (adsorbente), o da una combinazione di entrambi, avente caratteristiche di affinità con l'analita. In contatto con il campione (o con un suo estratto), per diretta immersione o nella fase vapore [modalità *head-space*], la fibra assorbe gli analiti sulla superficie e li rende immediatamente disponibili per l'analisi cromatografica mediante desorbimento nell'iniettore dello strumento (Figura 11).

La tecnica SPME è oggi ampiamente utilizzata in molti e diversi settori analitici, tra cui l'olfattometria, l'analisi di campioni alimentari e ambientali, applicazioni cliniche e forensi. Grazie alla possibilità di essere accoppiata a GC e LC, e alla disponibilità commerciale di

un'ampia gamma di fibre aventi diversa polarità, tale tecnica viene applicata all'analisi di composti chimicamente molto diversi (es.: per polarità e volatilità).

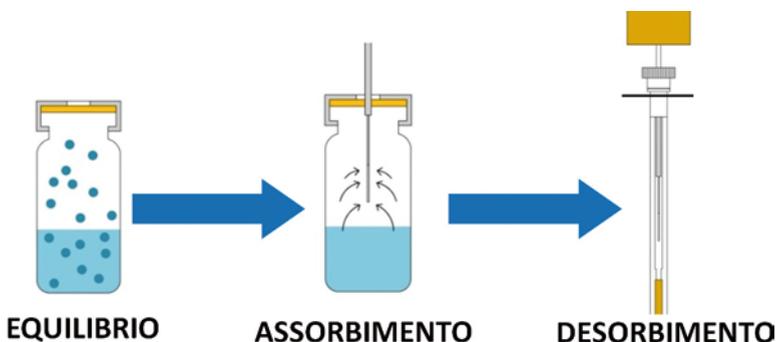


Figura 11. Estrazione SPME in modalità head-space. Fasi principali: nella fase di equilibrio gli analiti si distribuiscono tra la fase liquida e quella gassosa; nella successiva fase di assorbimento gli analiti vengono estratti mediante esposizione della fibra al campione; infine il desorbimento degli analiti dalla fibra avviene direttamente nell'iniettore del GC.

In campo ambientale l'SPME ha trovato ampia applicazione per l'analisi di pesticidi, PCB, PBB, diossine, IPA, idrocarburi, BTEX, fenoli, ritardanti di fiamma e composti organometallici [Lambropoulou et al., 2007, e autori citati]. Per quanto riguarda i composti organostannici, nella letteratura scientifica sono riportati numerosi metodi messi a punto per le principali matrici ambientali. La maggior parte di essi si concentra sulle matrici acqua, sedimento e, solo in misura minore, su biota, suolo, reflui e fanghi. Dalla Tabella 11 che riassume le principali caratteristiche di alcuni metodi pubblicati, si evidenzia come essi siano generalmente accomunati da 1) l'uso della fibra 100µm PDMS, 2) la derivatizzazione degli analiti mediante reazione di etilazione con sodio tetraetilborato (NaBEt₃; STEB), e 3) l'estrazione in fibra in modalità *head-space* (HS-SPME), e non per diretta immersione.

Tabella 11. Caratteristiche salienti dei principali metodi SPME, riportati in letteratura, per l'analisi dei composti organostannici in campioni ambientali. [*] concentrazioni espresse come catione. Abbreviazioni: Sodio teraetilborato (STEB, NaBEt₄); Tributilstagno marcato con deuterio (TBTd₂₇); Dibutilstagno marcato con deuterio (DBTd₁₈); Monobutilstagno marcato con deuterio (MBTd₉); Tripropilstagno (TPrT); Standard (Std).

Metodo	Matrice	Estrazione	Derivatizzazione	SPME						Quantifica			LOD			Rif. bibliografico
				Fibra	Agitazione	Equilibrio		Estrazione		Metodo	Std interno	Std recupero	TBT ng Sn/g	DBT ng Sn/g	MBT ng Sn/g	
						T (°C)	min	T (°C)	min							
HS-SPME-GC-MS	biota	25% KOH-MeOH - bagno ultrasuoni	STEB (2% p/v), tampone acetato 1,5 M, pH 5,3	DVB/CAR/PDMS 50/30 µm	meccanica (250 rpm)	40	15	40	20	Aggiunte Std	TPrT		9	8	6	Falomo, 2008
HS-SPME-GC-MIP/AED	biota	2 mol/L KOH-MeOH - bagno ultrasuoni	STEB (1% p/v), tampone acetato 2M, pH 4.8	PDMS 30 µm				30	18	Aggiunte Std	TPrT		0,19 (*)	0,15 (*)	0,06 (*)	Delgado et al., 2008
HS-SPME-GC-PFPD	biota	4 mol/L KOH-MeOH - bagno ultrasuoni	tampone acetato, pH 4,8	CAR-PDMS 75µM PDMS10 0 µm	meccanica (400 rpm)	T amb	10	T amb	30	Aggiunte Std	TPrT					Le Gac et al., 2003

Metodo	Matrice	Estrazione	Derivatizzazione	SPME						Quantifica			LOD			Rif. bibliografico
				Fibra	Agitazione	Equilibrio		Estrazione		Metodo	Std interno	Std recupero	TBT ng Sn/g	DBT ng Sn/g	MBT ng Sn/g	
						T (°C)	min	T (°C)	min							
SFE- (HS)SPME -GC-MS	biota	Supercritica 1 Fluid Extraction (SFE)	STEB (2% p/v), tampono acetato pH 3-6	PDMS/D VB 65 µm				ns							Liu et al., 2011	
HS-SPME- GC- MIP/AED	sedimen to	2 mol/L HCl - bagno ultrasuoni	STEB (1%), tampono acetato 2M, pH 4.8	PDMS 100 µm			30	18	Aggiunte Std	TPrT		0,07 (*)	0,09 (*)	0,12 (*)	Delgado et al., 2008	
HS-SPME- GC- MS/MS	sedimen to	HCl(6M): MeOH (1:1) - Bagno ultrasuoni	STEB (2%), tampono acetato pH 4,3	PDMS 100 µm	meccanica	40	10	40	30	Aggiunte Std		0,4 (*)	0,3 (*)	0,3 (*)	Carvalho et al., 2007	
DI-SPME- GC- MIP/AED	sedimen to	Digestione acida assistita da microonde	STEB (4%), tampono acetato pH 4-5	PDMS 100 µm			T amb	60			TPrT				Tutschku et al., 2002	

Metodo	Matrice	Estrazione	Derivatizzazione	SPME						Quantifica			LOD			Rif. bibliografico
				Fibra	Agitazione	Equilibrio		Estrazione		Metodo	Std interno	Std recupero	TBT ng Sn/g	DBT ng Sn/g	MBT ng Sn/g	
						T (°C)	min	T (°C)	min							
HS-SPME-GC-MS	sedimento	HCl(1,2M): MeOH (1:3) - Bagno ultrasuoni	STEB (1%), tampono acetato 0,2 M, pH 5,3	PDMS 100 µm	Sonicazione			25	10	Aggiunte Std			0,80 6	0,969	0,73	Cardellicchio et al., 2001
HS-SPME-GC-FID	sedimento	HCl(20%): MeOH (1:1) - Bagno ultrasuoni	STEB (2%), tampono acetato 1,5 M, pH 4,3	PDMS 100 µm	meccanica (1200 rpm)	40	2	40	15	Aggiunte Std						Arambarri et al., 2003
HS-SPME-GC-FID	sedimento	HCl(20%): MeOH (1:1) - Bagno ultrasuoni	STEB (2%), tampono acetato 1,5 M, pH 4,3	PDMS 100 µm	meccanica (1200 rpm)	40	2	40	15	Aggiunte Std						Millan and Pawliszyn, 2000
HS-SPME-(retention time)	sedimento	HAc+EtOH - Bagno	tampono acetato pH 5,3	PDMS 100 µm	meccanica (500 rpm)	80	1	80	30	Retta esterna in matrice	TBTd2 7 DBTd1	TBTd27 DBTd18 MBTd9	0,4 (*)	0,3 (*)	0,3 (*)	Devos et al., 2005

Metodo	Matrice	Estrazione	Derivatizzazione	SPME						Quantifica			LOD			Rif. bibliografico
				Fibra	Agitazione	Equilibrio		Estrazione		Metodo	Std interno	Std recupero	TBT ng Sn/g	DBT ng Sn/g	MBT ng Sn/g	
						T (°C)	min	T (°C)	min							
looked, RTL)-GC-MS		ultrasuoni									8 MBTd 9					
HS-SPME-GC-MS	acqua	-	STEB (2% p/v), tampono acetato pH 5	PDMS 100 µm	meccanica	45		45	30				0,5 (*)	0,4 (*)	0,6 (*)	Chou and Lee, 2005
HS-SPME-GC-MS/MS	acqua	-	STEB (2% p/v), tampono acetato pH 5,3	DVB/CA R/PDMS 50 µm/30vm	meccanica (250 rpm)	20	150	40	15	Retta esterna in matrice	non citato	non citato	9 (*)	33 (*)	4 (*)	Beceiro- Gonzalez et al., 2009
			STEB (2% p/v), tampono acetato 0,1 M, pH 4	PDMS 100 µm	meccanica (1200 rpm)			40	15				900	1200	1000	Millan and Pawliszyn, 2000

Per comprendere la relativa semplicità e velocità di esecuzione dell'SPME rispetto alle tecniche standard illustrate nei paragrafi precedenti, si descrive brevemente, a titolo di esempio, la metodologia d'analisi dei composti organostannici applicabile alle matrici solide (biota e sedimenti). Come evidenziato in Figura 12, l'intera procedura può essere suddivisa in quattro semplici fasi.

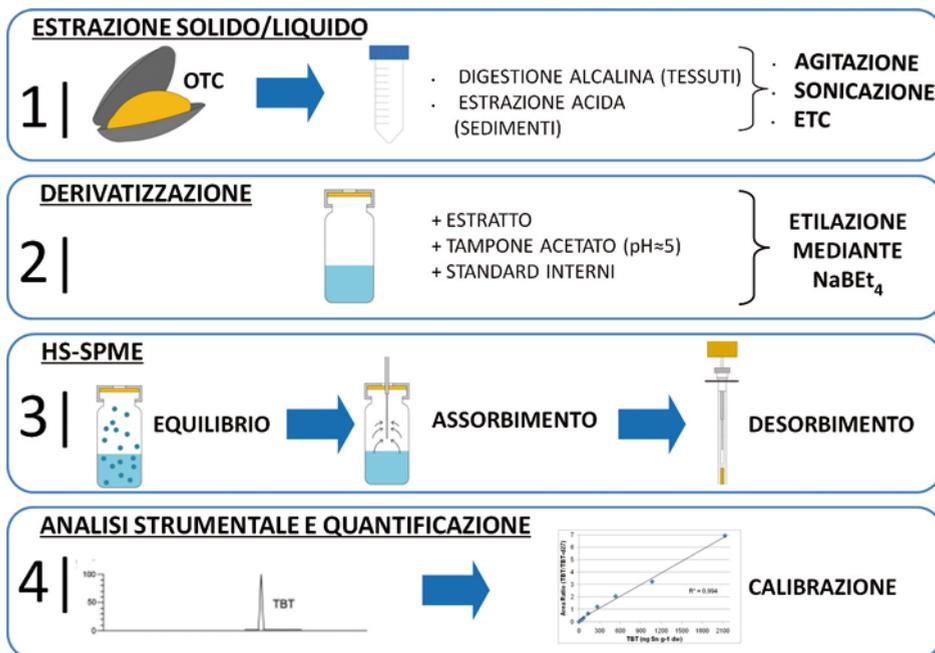


Figura 12. Fasi principali delle metodologie HS-SPME-GC-MS, riportate dalla letteratura, per l'analisi degli i composti organostannici (OTC) in sedimenti e biota.

Riassumendo in breve, prima dell'estrazione in fibra, gli analiti vengono comunemente estratti dalle matrici solide con una soluzione acida in metanolo (sedimenti) o per digestione basica in metanolo (biota), mediante l'ausilio di un bagno ultrasuoni (fase 1). A questa fase segue l'etilazione degli analiti mediante una soluzione acquosa di sodio tetraetilborato a pH~4-5 (fase 2). Tale reazione di derivatizzazione non richiede alcun preventivo cambio di solvente e viene condotta direttamente nel contenitore (vial) in cui si effettuerà la successiva estrazione in fibra degli analiti (SPME; fase 3), evitando dunque trasferimenti intermedi con conseguente perdita di campione possibile contaminazione. L'estrazione in fibra (fase 3) può essere condotta in maniera manuale, mediante un supporto per iniezioni manuali SPME, o in modo automatizzato con l'ausilio di uno specifico autocampionatore interfacciato al GC. Quest'ultima opzione massimizza la riproducibilità dell'operazione, controllando con precisione tutte le variabili che influenzano il processo (es. temperatura, agitazione, posizione della fibra nello spazio di testa, tempistiche, ecc.). L'estrazione in fibra dei composti organostannici in modalità *head-space* si compone di tre momenti: equilibrio, assorbimento e desorbimento degli analiti. Nella fase di equilibrio gli analiti si distribuiscono tra la fase liquida e quella gassosa in funzione della propria costante di ripartizione. L'equilibrio viene favorito dalla temperatura e dal rimescolamento del campione, che generalmente viene realizzato mediante agitatore magnetico, ultrasuoni o agitatore ellittico. Successivamente gli analiti

vengono estratti mediante esposizione della fibra al campione. L'efficacia di estrazione dipende da numerosi fattori, tra i quali l'affinità tra la fibra e l'analita (es.: composizione chimica e spessore della fibra, caratteristiche chimico-fisiche dell'analita), la natura della matrice (es.: influenza dei costituenti co-estratti, forza ionica, ecc.) e le variabili di estrazione (es.: temperatura, agitazione, tempistiche, rapporto tra il volume del campione e spazio di testa, ecc.). Nel caso dei composti organostannici, la temperatura di estrazione viene generalmente fissata intorno ai 45°C in quanto rappresenta un valore di compromesso per estrarre contemporaneamente TBT e MBT, caratterizzati da differenti costanti di distribuzione (alte temperature favoriscono l'estrazione del TBT, composto meno volatile, ma inducono il desorbimento dell'MBT dalla fibra). Temperature più alte vengono generalmente applicate nei metodi multi-specie, interessati alla co-estrazione dei composti fenilstannici insieme ai composti butilstannici (es. T=80°C; Devos et al., 2005). Il tempo di estrazione è generalmente superiore a 15-20 min.

L'ultima fase consiste nell'analisi strumentale e nella quantifica (fase 4). I metodi di quantifica più comunemente utilizzati nelle applicazioni a campioni complessi, come quelli ambientali, sono scelti tra quelli che considerano l'influenza della matrice nell'equilibrio a tre fasi (matrice liquida, fase vapore, fibra), ovvero i metodi delle aggiunte standard, della diluizione isotopica e della calibrazione esterna in matrice. Nonostante i primi due siano quelli più raccomandati, in quanto non risentono dell'influenza della matrice (la calibrazione è campione-specifica), essi risultano spesso poco utilizzati in routine dai laboratori di analisi. Infatti il metodo delle aggiunte standard è molto laborioso e richiede la creazione di una retta di calibrazione per ciascun campione, mentre il metodo della diluizione isotopica necessita della disponibilità di strumentazione capace di rilevare con la massima precisione i rapporti isotopici. La terza opzione, ovvero la calibrazione esterna in matrice, è capace di fornire risultati soddisfacenti in termini di accuratezza e precisione, qualora applicata in combinazione a idonei standard interni (es. standard marcati isotopicamente).

In Noventa et al. (2015) viene descritto nel dettaglio un metodo HS-SPME-GC-MS/MS per l'analisi dei composti organostannici in campioni di mitili.

4 METODI DI VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI SUI MOLLUSCHI

I molluschi sono comunemente usati nei programmi di monitoraggio ambientale, su scala mondiale, per misurare i livelli di inquinamento e gli effetti dei contaminanti sugli organismi. Possiedono molte caratteristiche che li rendono particolarmente idonei come organismi bioindicatori: sono ampiamente distribuiti, facilmente reperibili negli habitat da studiare, sopravvivono anche in presenza di concentrazioni relativamente alte di contaminanti e molto spesso hanno un'importanza economico-commerciale come risorsa alimentare (Bryan et al., 1985; Widdows e Donkin, 1989; Hopkin, 1993; Deplege e Hopkin, 1995).

Per quanto riguarda le valutazioni di contaminazione ambientale da composti organostannici, i loro effetti come interferenti del sistema endocrino (*endocrine disruptor*) sono particolarmente noti in due classi di molluschi: Bivalvia e Gastropoda (per maggiori dettagli vedasi il paragrafo 1.4).

Di seguito si riportano alcuni cenni sulla biologia e fisiologia dei molluschi bivalvi e gasteropodi più comunemente utilizzati negli studi di biomonitoraggio ambientale dei composti organostannici in ambienti marini e di transizione.

4.1 Bivalvi

Le caratteristiche che rendono i molluschi bivalvi particolarmente idonei come organismi bioindicatori in ambienti estuarini e marini sono molteplici. Essi infatti, sono ampiamente distribuiti, sedentari e tollerano un largo spettro di variazione di molti fattori abiotici. Molte specie di bivalvi tollerano livelli di concentrazione relativamente alti di contaminanti organici e metalli pesanti presenti in ambiente, che accumulano facilmente grazie al loro habitus di filtratori e alle loro ridotte capacità metaboliche. Inoltre, i molluschi bivalvi sono spesso specie di valore commerciale soggette a pesca ed allevamento (Bryan et al., 1985; Widdows e Donkin, 1989; Hopkin, 1993; Deplege e Hopkin, 1995).

Nei programmi di biomonitoraggio dell'area mediterranea i molluschi bivalvi più comunemente utilizzati per la valutazione della contaminazione ambientale da organostannici sono *Mytilus galloprovincialis* (es.: Binato et al., 1998; Hwang et al., 1999; Bortoli et al., 2003; Boscolo et al., 2004; Ruiz et al., 2005; Berto et al., 2006; Kim et al., 2008; ISPRA, 2009; Zanon et al., 2009; e altri) e *Ruditapes* (sinonimi: *Tapes*, *Veneropsis*) *philippinarum* (ad es.: Bressa et al., 1999; Bortoli et al., 2003; Cacciatore et al., 2006a; ISPRA, 2009; Zanon et al., 2009; e altri).

4.1.1.1 *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)



Figura 13. Esempi di *Mytilus galloprovincialis* (Foto di Edoardo Donaggio).

Mytilus galloprovincialis (Figura 13) è una specie endemica mediterranea diffusa lungo le coste italiane e presente in popolazioni molto numerose. Si trova fissata a rocce o substrati duri mediante il bisso, un insieme di filamenti di natura proteica, secreti dalla ghiandola bissogena del piede, che solidificano a contatto con l'acqua di mare. I mitili sono animali filtratori: filtrano circa 100 litri di acqua al giorno, incamerando così particelle organiche ed inorganiche, zoo- e fitoplancton, sabbia e fango. L'assunzione del cibo consiste nella raccolta, a livello branchiale, del materiale organico e nel suo trascinarsi in prossimità dei palpi labiali, i quali hanno la funzione di selezionare ulteriormente il materiale prima che questo venga ingerito attraverso la cavità orale.

I mitili sono specie adatte ad essere utilizzate come bioindicatori della qualità della colonna d'acqua e sono sufficientemente sensibili a bassi livelli di contaminazione, ma resistenti e tolleranti ad alti livelli per molti composti, tra cui gli organostannici. Permettono, quindi, delle valutazioni sul bioaccumulo, ma anche sugli effetti dell'inquinante sull'organismo. Sono presenti in popolazioni numerose, sia in ambiente costiero che lagunare, specialmente nei luoghi influenzati dalle attività antropiche come porti, moli e darsene in cui avviene il maggior rilascio di TBT. Oltre al monitoraggio delle popolazioni residenti, la specie è particolarmente idonea a metodologie di indagine che prevedono il trapianto di organismi da siti di riferimento ad altri siti da monitorare. Inoltre, è ben nota la biologia della specie e si possiedono riferimenti bibliografici adeguati.

4.1.1.2 *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850)



Figura 14. Esempio di *Ruditapes philippinarum* (Foto di Emanuele Ponis).

Le vongole filippine *Ruditapes philippinarum* (Figura 14) sono organismi sessili che vivono su fondali a livello intertidale e subtidale, parzialmente o totalmente infossati nel sedimento, fino a profondità di 8-10 cm. La specie tende a colonizzare i substrati più confacenti alle sue esigenze, disponendosi, in taluni casi, su più strati. Un substrato sabbioso-siltoso ne favorisce l'insediamento, ma anche altri tipi di sedimento possono venire colonizzati, purché siano mantenute le condizioni di ricambio idrico. Sono organismi filtratori e si nutrono di particelle sospese nell'acqua o risospese dal fondale; in particolare, *R. philippinarum* consuma, digerisce e assimila alghe verdi, cianobatteri, diatomee, batterioplancton e microzooplancton.

R. philippinarum, viene spesso utilizzata come bioindicatore del sedimento o degli strati inferiori della colonna d'acqua; questa specie, infatti, è considerata un buon accumulatore dei contaminanti ambientali, in grado di fornire allo stesso tempo risposte biologiche quantificabili, che rendono conto dei livelli di esposizione presenti in ambiente. È facilmente reperibile in tutte le stagioni e tollerante, ma non insensibile alle condizioni di stress ambientale. Altra caratteristica importante è la conoscenza approfondita della biologia della specie e la disponibilità di riferimenti bibliografici adeguati. Inoltre, *R. philippinarum* può essere utilizzata nelle metodologie di monitoraggio che prevedono il trapianto da un'area di riferimento ad altri siti da monitorare. Infine, le vongole *R. philippinarum* hanno un'importanza rilevante come specie commerciale.

4.2 Gasteropodi

I gasteropodi marini sono tra gli animali più sensibili alla contaminazione ambientale da composti organostannici. Sono più di 260 le specie, distribuite in 33 famiglie, in cui è stato verificato il fenomeno dell'imposex o pseudoermafroditismo, a scala mondiale. Tra queste, la famiglia con il maggior numero di specie è quella dei Muricidae (n=100), seguita da Buccinidae (n=33), Nassaridae (n= 20) e Conidae (n=16). I generi con casi più frequenti sono: *Thais* spp. (n=25), *Nassarius* spp.(n=13), *Conus* spp. (n=11) *Nucella* spp. (n = 8) (Tittley-O'Neal et al., 2011).

Per quanto riguarda l'area mediterranea, i programmi di biomonitoraggio della contaminazione da TBT in ambienti di transizione ed aree costiere sono stati condotti facendo riferimento all'utilizzo delle seguenti specie di gasteropodi cenogasteropodi gonocorici, quali *Nassarius* spp. (Stroben et al., 1992A; 1992B; Sousa et al., 2005; Pavoni et al., 2007; Cacciatore et al., 2016; e altri), *Hexaplex trunculus* (Axiak et al., 1995; 2000; Terlizzi et al., 1998; 1999; 2004; Pessoa et al., 2001; Pellizzato et al., 2004; Chiavarini et al., 2003; Prime et al., 2006; Garaventa et al., 2007; Cacciatore et al., 2015; e altri), e *Bolinus brandaris* (Solé et al., 1997, 1998; Ramòn e Amor, 2001; Abidli et al., 2012; e altri).

4.2.1 Nassaridi

4.2.1.1 *Nassarius nitidus* (Jeffreys, 1867)

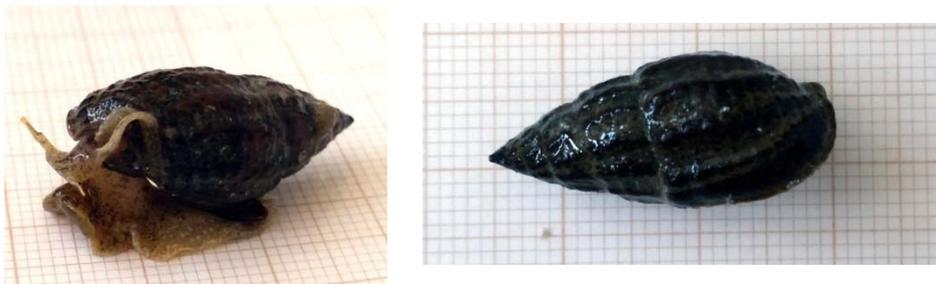


Figura 15. Esempari di *Nassarius nitidus*.

Nassarius nitidus (Jeffreys, 1867) (Figura 15) è una specie presente nel Mediterraneo orientale, molto comune nella fascia intertidale; particolarmente abbondante in aree a substrato molle, in quanto vive infossata. Essa si caratterizza per un'alta capacità di colonizzazione, grazie allo stadio larvale planctonico della durata di circa tre mesi. L'elevata tolleranza a variazioni di salinità giustifica la sua presenza anche negli ambienti di transizione, come le lagune. È una specie saprofaga che si nutre principalmente delle carogne di patelle e mitili. Nel Mediterraneo, *N. nitidus* inizia l'emissione dei gameti a metà inverno o primavera e termina in estate. Dopo la fecondazione si sviluppa una larva *veliger* pelagica che si lascia trasportare passivamente dalla corrente fino alla metamorfosi in individuo adulto.

L'analisi della presenza dell'imposex in questa specie viene effettuata facendo riferimento alla metodica riportata da Stroben et al. (1992). Il fenomeno è stato suddiviso in quattro fasi principali, due delle quali presenti in due varianti (stadio 1 a-b; stadio 3 a-b).

4.2.2 Muricidi

4.2.2.1 *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758)



Figura 16. Esemplici di *Hexaplex trunculus* (Foto a sx di Gianluca Franceschini).

Hexaplex trunculus (Linnaeus, 1758) (Figura 16) è un murice comune nei mari europei, diffuso sia nel Mediterraneo che lungo alcuni tratti della costa Atlantica (ad es. Portogallo). Si trova su fondali fino a 100 m di profondità, indistintamente dal tipo di substrato, anche se predilige ambienti a bassa energia, come baie, lagune o semplicemente superfici riparate tra i massi. Le abitudini alimentari di *H. trunculus* sono quelle tipiche di una specie opportunistica. Infatti anche se è principalmente una specie carnivora, si ritiene che integri la propria dieta con delle forme di cannibalismo e saprofagia.

Nel Mediterraneo il periodo riproduttivo si colloca nei mesi di maggio e giugno. La specie presenta sessi separati; la fecondazione è interna ed avviene per copulazione. Le uova, che vengono rilasciate all'interno di una capsula coriacea solitamente attaccata ad un substrato, si schiudono circa dopo 1 mese; alla schiusa esce una forma giovanile non planctonica.

È ampiamente dimostrato in letteratura scientifica che *H. trunculus* rappresenta un buon organismo sentinella per il biomonitoraggio del TBT in acque costiere e di transizione, essendo tra le specie più sensibili alla contaminazione da TBT. Gli stadi precoci di imposex si manifestano già in presenza di valori molto bassi di bioaccumulo (concentrazioni di TBT inferiori a 1 ng Sn/g di tessuto secco; Axiak et al., 1995). Lo sviluppo di imposex in *H. trunculus* e il suo possibile utilizzo come bioindicatore di contaminazione da TBT è stato studiato da Axiak et al. (1995) e Terlizzi et al. (1999). Il progressivo sviluppo degli organi sessuali maschili è stato descritto in 8 stadi; nell'ultima fase l'organismo è sterile, a causa della rottura della borsa copulatrice e della capsula ovigera.

4.2.2.2 *Bolinus brandaris* (Linnaeus, 1758)



Figura 17. Esemplici di *Bolinus brandaris*.

Il murice *Bolinus brandaris* (Figura 17) è una specie subtidale che vive in fondali sabbiosi e fangosi fino a 200m di profondità, e che si distribuisce in modo diverso in funzione del periodo riproduttivo. In fase di deposizione delle uova è più facile, infatti, trovare questi murici raggruppati tra loro, rispetto ad altre fasi del ciclo biologico della specie. Sono gonocorici con fecondazione interna e hanno un periodo di maturazione nei mesi di giugno-agosto. Le femmine depongono le uova in ooteche, che attaccano l'una all'altra formando grandi masse fissate a substrati solidi sul fondo del mare.

È una specie molto comune nel Mediterraneo, ma può essere trovata anche nell'Oceano Atlantico, dalle coste del Portogallo a quelle del Marocco. È un carnivoro e si nutre di bivalvi e altri gasteropodi. Questa specie è ben nota dal punto di vista commerciale fin dal tempo dei Fenici e degli antichi Romani, quando veniva utilizzata, insieme a *H. trunculus* e *Thais haemastoma* (L.) per produrre la porpora, un pigmento prezioso utilizzato per tingere tessuti. Oggi è particolarmente apprezzato per le sue carni e lungo le coste mediterranee della Spagna, in Portogallo, Francia, Italia e Turchia è oggetto di pesca artigianale specifica.

B. brandaris è stato studiato come specie sentinella per la valutazione della contaminazione da TBT da Solè et al. (1998). È stato più volte utilizzato per studi di campo da cui è stata dimostrata la sensibilità anche a bassi livelli di contaminazione, come nelle acque al largo delle coste del Mediterraneo (Ramòn e Amor, 2001; Chiavarini et al., 2003; Santos et al., 2005). Per classificare lo sviluppo di imposex viene utilizzato l'indice VDS introdotto da Gibbs et al. (1998) e modificato da Fioroni et al. (1991) per estendere la sua applicazione ad altre specie. È preferibile, per questa specie, non utilizzare indici legati alle dimensioni del pene, in quanto in *B. brandaris* la lunghezza del pene può variare ampiamente in funzione del ciclo riproduttivo (Ramòn e Amor, 2001).

4.3 Bioaccumulo

Il bioaccumulo è l'accumulo di un contaminante nei tessuti di un organismo acquatico il quale può avvenire attraverso varie vie come la respirazione, l'ingestione o il contatto dermico con acqua, sedimento o acqua interstiziale contaminata. Il processo di bioaccumulo di un contaminante nel biota è correlato al concetto di biodisponibilità, infatti ogni specie chimica per poter essere bioaccumulata deve essere innanzitutto biodisponibile. I fattori che influenzano la biodisponibilità e quindi il bioaccumulo sono molteplici e possono essere fisici, chimici e fisiologici dell'organismo stesso.

Il fattore di bioaccumulo (BAF) equivale al rapporto fra la concentrazione dell'inquinante nel biota (CB) e la concentrazione totale dell'inquinante in acqua (CWT) (USEPA 1995) o nel sedimento (CST) (Boese e Lee, 1992).

$$BAF = \frac{CB}{CWT} \text{ o } \frac{CB}{CST}$$

Il fenomeno del bioaccumulo può essere rappresentato come una combinazione della bioconcentrazione (assorbimento di composti xenobiotici attraverso le stesse superfici che consentono gli scambi di gas respiratori, ad es.: epiteli branchiali, pelle) e dell'assorbimento di composti xenobiotici attraverso gli alimenti.

La biomagnificazione è un caso speciale di bioaccumulo in cui fenomeni di arricchimento crescenti si realizzano passando da un livello più basso ad uno più alto della stessa catena trofica. Il fattore di biomagnificazione (BMF) è il rapporto fra le concentrazioni della sostanza tossica nell'organismo (CB) e quella nell'organismo alimento (CA):

$$BMF = \frac{CB}{CA}$$

La biomagnificazione avviene quando il rapporto fra la concentrazione della sostanza nei tessuti di un organismo e la concentrazione della stessa nel suo cibo è maggiore di uno ($CB/CA > 1$) (Reinfelder et al., 1998).

Il BAF è strettamente legato al coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ($\log_{10} K_{ow}$) dei contaminanti (Clark et al., 1990); le sostanze chimiche con valori di $\log_{10} K_{ow}$ bassi (4-5) si trovano in forma solubile in acqua; quelle caratterizzate da $\log_{10} K_{ow}=6$ sono in parte adsorbite e in parte disciolte; mentre quelle con $\log_{10} K_{ow}=8$ si trovano prevalentemente in forma adsorbita. Questo implica grosse variazioni sulla biodisponibilità che si ripercuote sul BAF. Solo composti con $\log_{10} K_{ow}>6.3$ (e $BCF > 114.000$) hanno invece propensione alla biomagnificazione (Leblanc, 1995).

Per quanto riguarda il bioaccumulo del TBT, la sua biodisponibilità nel sedimento dipende da numerosi parametri come, ad esempio, la speciazione chimica, il pH, e il contenuto organico (Maguire e Tkacz, 1985). La biomagnificazione del TBT nei sistemi acquatici è un tema ancora oggi dibattuto. Esistono infatti in letteratura sia studi che dimostrano la biomagnificazione lungo la catena trofica sia studi che sostengono l'assenza del fenomeno (Fortibuoni et al. 2013; Strand and Jacobsen, 2005; Murai et al., 2008; Hu et al., 2006; e riferimenti al paragrafo 2.3.3).

4.3.1 *Indici generali per la valutazione del bioaccumulo*

Generalmente negli studi di biomonitoraggio ambientale, la valutazione del bioaccumulo si realizza attraverso la determinazione chimica della concentrazione dei contaminanti nei tessuti degli organismi. Ad ogni modo la presenza di un contaminante e la sua concentrazione nei tessuti corporei può essere alterata da diversi fattori, primo fra tutti la variazione stagionale delle parti molli degli organismi, dovuta ai ritmi di crescita, al ciclo riproduttivo e alle fluttuazioni dei principali parametri ambientali (Beninger e Lucas, 1984; Marin et al., 2003). Esistono in letteratura diversi parametri, indici e indicatori che possono essere accompagnati alle analisi chimiche per meglio comprendere la valutazione del bioaccumulo. Per quanto riguarda i molluschi, allo scopo di proporre risultati non affetti dalle variazioni del corpo molle dovuti ai normali cambiamenti fisiologici dell'organismo, anche in risposta all'esposizione ai contaminanti stessi, Fisher nel 1983 propose, per la prima volta, un indice con cui normalizzare la concentrazione determinata nelle parti edule dei molluschi con il peso della conchiglia (PC), considerato un parametro più stabile e non soggetto alle fluttuazioni stagionali dei principali parametri ambientali. Inizialmente l'indice fu proposto per valutare il bioaccumulo dei metalli nei mitili, ma successivamente tale indice, chiamato **Shell-Weight Index** o **Indice Contaminante/PC**, è stato applicato in diverse specie di molluschi, sia per contaminanti inorganici (Fischer, 1983, 1984, 1988; Soto et al., 1997, 2000; Cravo e Bebianno, 2005) che organici (Boscolo et al., 2007, 2008; Cacciatore et al., 2006b) tra cui TBT e composti (Cacciatore et al., 2006a).

Strettamente legato all'Indice Contaminante/PC vi è l'**Indice di Condizione**, solitamente usato per valutare variazioni stagionali nello stato nutrizionale dei molluschi bivalvi in campioni provenienti da popolazioni naturali (Walne, 1970; Gabbot e Walker, 1971; Gee et al., 1977), di allevamento e di laboratorio (Bayne e Thompson, 1970; Gabbot e Stephenson, 1974), ma introdotto anche nei programmi di biomonitoraggio della contaminazione ambientale da composti inorganici e organici (Cacciatore et al., 2006b) tra cui gli organostannici (Boscolo et al., 2004, 2007, 2008; Cacciatore et al., 2006a).

Oltre agli indici per la valutazione del bioaccumulo, nei programmi di biomonitoraggio, vanno prese in considerazione anche le misure che evidenziano esposizione o effetto a uno o più contaminati, dette biomarker. Le variazioni biochimiche, fisiologiche o comportamentali vengono misurate nei tessuti, nei fluidi biologici, nell'intero organismo (individuo o popolazione) ed evidenziano gli effetti indotti dai contaminati, permettendo la valutazione delle risposte che un organismo, una popolazione o una comunità naturale può generare nei confronti di uno stress chimico ambientale (Depledge e Fossi, 1994). McCarthy e Shugart (1990) propongono una distinzione dei biomarker in generici e specifici. I biomarker generici sono le risposte dell'organismo associabili ad uno stato generale di stress, dovuto alla presenza del contaminante in ambiente e alle relative variazioni chimico-fisiche e fisiologiche. I biomarker specifici sono le risposte identificate a seguito di un legame specifico tra il contaminante e un sito d'azione. Ad esempio, Lam e Gray (2003) identificano quali biomarker specifici: recettori di membrana, acidi nucleici o specifiche regioni proteiche.

Di seguito vengono riportati alcuni dettagli riferiti ad alcuni biomarker generici, quali il **test della sopravvivenza in aria** e il **test di infossamento**, applicabili ai molluschi bivalvi, che grazie alla loro semplice attuazione possono essere condotti in laboratorio con un'attrezzatura base e possono essere accoppiati all'analisi dei composti organostannici

nella polpa dei molluschi per fini interpretativi dei risultati. Nel paragrafo successivo (5.2), verrà dato ampio spazio alla descrizione e utilizzo del **l'imposex** quale biomarker specifico per il TBT e i suoi composti.

4.3.1.1 *Indice Contaminante/PC*

La determinazione analitica dei contaminanti nei tessuti dei molluschi riflette la frazione biodisponibile dei contaminanti organici ed inorganici presenti in ambiente, ma nel valutare il bioaccumulo vanno presi in considerazione anche i fattori fisiologici e i cambiamenti patologici che si verificano negli organismi, sia in condizioni naturali che per effetto dei contaminanti stessi.

Diversi sono i fattori abiotici e biotici che agiscono sulla biodisponibilità ed accumulo dei contaminanti nei tessuti molli dei molluschi marini e di transizione. Tra i parametri abiotici i più importanti sono: salinità, temperatura, pH, posizione nella colonna d'acqua, profondità, microhabitat, interazione con altri contaminanti, ecc.. Tra i parametri biotici ci sono invece la taglia e/o peso corporeo, le differenze fenotipiche, il sesso, le condizioni fisiologiche e la fase del ciclo riproduttivo degli organismi. Tra questi fattori, quelli che maggiormente agiscono e influenzano l'accumulo dei contaminanti nei tessuti molli degli organismi sono soprattutto la taglia e il peso. Se ignorati, il confronto tra popolazioni di individui con taglie/pesi differenti può portare a risultati inaffidabili (Cravo e Bebianno, 2005).

Convenzionalmente il contenuto dei contaminanti nei tessuti è rapportato al peso delle parti molli (es.: ng/g di tessuto molle). Tuttavia è stato ampiamente dimostrato che le parti eduli dei molluschi sono sensibili ai cambiamenti spaziali e temporali, influenzando sul dato di concentrazione. Per questo motivo molti autori hanno scelto di normalizzare il contenuto di contaminante, determinato nel tessuto molle, sul peso della conchiglia, utilizzando il shell weight-index o INDICE Contaminante/PC (Fischer, 1983, 1984, 1988; Marigomez e Ireland, 1990; Soto et al., 1995, 1997a,b, 2000, Cravo e Bebianno, 2005; Boscolo et al., 2007; Cacciatore et al., 2006a,b, 2011). Il peso della conchiglia può essere, infatti, considerato una variabile indipendente dallo stato nutrizionale, dall'emissione dei gameti, dall'esposizione mareale ed è in grado di ridurre l'inter e intra-variabilità dei risultati di bioaccumulo (Cravo e Bebianno, 2005).

Le specie su cui è stato applicato l'indice Contaminante/PC sono: *Mytilus* spp. (Fisher, 1983, 1984; Soto et al., 1997; Regoli, 1997, Soto et al., 2000a), *Cardium edule*, *Mya arenaria* (Fischer, 1983), *Patella aspera* (Cravo e Bebianno, 2005), *Littorina littorea* (Marigomez e Ireland, 1990; Soto et al., 2000b) e *Ruditapes philippinarum* (Boscolo et al., 2007; Cacciatore et al., 2006b, 2011). In particolare su quest'ultima specie è stato applicato l'Indice BT/peso della conchiglia (BTs/shell-weight index, dove BT = TBT+DBT+MBT) per valutare il bioaccumulo dei composti butilstannici in vongole sottoposte ad esperimenti di trapianto (Cacciatore et al., 2006a).

A livello pratico, l'indice Contaminante/PC, consiste nel rapportare la concentrazione di ciascun contaminante con il peso della conchiglia attraverso la seguente formula:

$$\text{Indice Contaminante/PC} \left(\frac{xg}{g} \right) = \frac{\text{Cont} \left(\frac{xg}{g} \right) * PS(g)}{PC (g)}$$

Dove,

Cont è la concentrazione del contaminante espressa come concentrazione ($xg = \mu g, ng,$ ecc.) nel corpo molle (espresso in grammi, g), determinata come descritto al capitolo 0; *PS* è il peso secco delle carni (espresso in grammi, g); *PC* è il peso della conchiglia (espresso in grammi, g).

Operativamente per ogni campione vanno presi 30-40 esemplari, trasportati in laboratorio all'interno di un frigorifero portatile. Ciascuno degli organismi viene sezionato mediante un bisturi, separata la parte molle dalla conchiglia e misurati come segue:

- il valore di PC viene ricavato pesando le conchiglie dopo una permanenza in stufa a 104°C per 24 h;
- PS si misura dopo aver mantenuto le parti molli in stufa a 104°C per 48 h.

L'indice Contaminante/PC è particolarmente raccomandato in studi di biomonitoraggio di popolazioni residenti o che prevedono trapianti di organismi e confronti tra un sito di riferimento e altri, in quanto la normalizzazione sulla conchiglia permette il confronto sia tra popolazioni diverse, che tra organismi provenienti dalla stessa popolazione, ma sottoposti a condizioni ambientali differenti.

È sconsigliata, invece, l'applicazione dell'indice BTs/peso della conchiglia in studi di biomonitoraggio che prevedono l'utilizzo di ostriche come organismo bioaccumulatore, in quanto è stata dimostrata in *Crassostrea gigas* la diretta correlazione tra la presenza di composti organostannici e l'assottigliamento della conchiglia (Alzeiu et al., 1980).

4.3.1.2 *Indice di condizione*

Gli indici che derivano dalla relazione tra vari parametri corporei possono essere suddivisi, in base alla definizione di Lucas e Beninger (1985), in indici statici e indici dinamici. Nel primo caso, numeratore e denominatore sono rappresentati da singole misure di parametri biometrici che, determinati in un preciso momento, forniscono un'indicazione dello stato fisiologico degli organismi al momento del campionamento. Nel secondo caso, numeratore e denominatore derivano dalla differenza di due parametri, misurati in tempi diversi, fornendo così indicazioni sui cambiamenti fisiologici avvenuti in un dato intervallo di tempo. In molti casi gli indici di condizione sono basati sulle relazioni tra parametri gravimetrici e volumetrici come il peso umido e il peso secco delle carni, il peso della conchiglia, il volume totale, il volume della conchiglia o il volume delle carni (Phernambucq e Vroonland, 1983).

Generalmente i più usati sono: PS/PC (Walne, 1976; Mann e Glomb, 1978; Pazos et al. 1997; Boscolo et al., 2002, 2003), PS/VV (Hopkins, 1949; Baird, 1958; Bressan e Marin, 1985; Okumuş e Stirling, 1998), PSSC/VV (Phernambucq e Vroonland, 1983), PSSC/PC (Hrs-Brenko, 1967; Walne e Mann, 1975; Marin et al., 2003), PS/L, PSSC/L, PS/SAL, PSSC/SAL, PU/SAL, PU/PC, PS/L³, PSSC/L³ e PU/L³ (Valli et al., 1995) (dove: PS = peso secco delle carni; PC = peso della conchiglia; VV = volume valvare; PSSC = peso secco senza ceneri; L = lunghezza della conchiglia; SAL = spessore x altezza x lunghezza della conchiglia; PU = peso umido delle carni). Ogni indice esprime aspetti diversi della realtà biologica e la scelta di un indice può dipendere anche da ciò che si desidera studiare e dall'uso dell'indice stesso (Valli et al., 1995).

L'indice di condizione è utilizzabile a scopo commerciale per determinare il periodo in cui si può disporre di molluschi con quantità di polpa maggiore (Marin et al., 2003) o per valutare lo stato di salute generale dei bivalvi (Davenport e Chen, 1987; Crosby e Gale, 1990) anche in funzione dello stress causato dalla contaminazione da composti organostannici (Boscolo et al., 2004). Un incremento dell'indice di condizione riflette un aumento dei costituenti organici associato con la crescita e dipende dall'equilibrio tra disponibilità di cibo, tasso di alimentazione e tasso di catabolismo. Una riduzione dell'indice, invece, corrisponde a periodi di stress che coinvolgono l'utilizzo delle riserve, oppure corrispondono al periodo di emissione.

I cambiamenti stagionali negli indici di condizione derivano dalla complessa interazione di una varietà di fattori che comprendono la disponibilità di cibo, la temperatura e la salinità. La disponibilità di cibo, dopo il ciclo gametogenico, è comunque il fattore più importante (Hickman e Illingworth, 1980; Smaal e Van Stralen, 1990).

Le caratteristiche che un buon indice deve possedere sono una bassa variabilità all'interno del campione e un'elevata sensibilità, ossia deve essere in grado di esaltare le differenze tra diversi campioni mensili o tra campioni di differenti siti (Bodoy et al., 1986).

È stato dimostrato in alcuni lavori come l'indice di condizione sia negativamente correlato con l'aumentare nell'ambiente delle concentrazioni di alcuni contaminanti quali i metalli (Martin et al., 1984; Page et al., 1984) e gli idrocarburi policiclici aromatici (Granby e Spliid, 1995). Per quanto riguarda il TBT, Kure e Depledge (1994) riportano un significativo decremento lineare nell'indice di condizione in *Mya arenaria* nel tempo, a diverse concentrazioni comprese nel range 50-1000 ng/L.

Il vantaggio dell'applicazione dell'indice di condizione è la semplicità della sua misura e la richiesta di una strumentazione di laboratorio base. Gli svantaggi sono la bassa sensibilità e il relativo basso rapporto segnale-rumore. Inoltre cambiamenti nell'indice di condizione possono essere verosimilmente misurabili dopo lunghi periodi di esposizione (mesi - anni).

Operativamente per ogni campione vanno presi 30-40 esemplari, trasportati, all'interno di un frigorifero portatile in laboratorio, dove vengono misurate le seguenti variabili morfometriche: lunghezza (L), altezza (A), spessore della conchiglia (S). Con il termine lunghezza nella pratica della molluschicoltura si intende il diametro maggiore dell'animale, rappresentato nelle vongole dal diametro antero-posteriore della conchiglia, nei mitili dal diametro umbo-ventrale, lo spessore corrisponde in entrambi i casi alla distanza massima tra le due valve secondo il diametro latero-laterale, l'altezza è il terzo asse perpendicolare ai primi due. Le misure vanno eseguite con un calibro decimale al mm inferiore. Dal prodotto dei tre parametri L, A, S, si ricava il valore indicato come SAL.

Vengono eseguite le misure gravimetriche: peso umido totale dell'animale (PUtot), peso umido delle carni (PU), peso della conchiglia (PC), peso secco delle carni (PS) e peso delle ceneri. Il peso secco senza ceneri (PSSC) viene calcolato come differenza tra peso secco delle carni e le ceneri. Il valore di PC viene ricavato pesando le conchiglie dopo una permanenza in stufa a 104°C per 24 h, mentre quello di PS mantenendo le parti molli in stufa a 104°C per 48 h prima della pesata. Il peso delle ceneri viene determinato dopo aver lasciato le carni su cui era stato misurato il peso secco per 4 h in muffola a 450°C.

Ciascuna pesata va effettuata con una bilancia analitica con precisione 10⁵g in contenitori di stagnola preventivamente pretrattati in muffola per 4 h a 450°C e pesati.

Utilizzando le suddette variabili corporee vengono calcolati i seguenti indici di condizione: PS/PC, PSSC/PC, PU/PC, PS/SAL, PSSC/SAL, PU/SAL, PS/L, PSSC/L e PU/L.

I risultati vengono presentati come media \pm DS e confrontati utilizzando test statistici parametrici o non parametrici per valutare le differenze tra i campioni, sia considerando l'indice, che i singoli parametri che lo compongono.

4.3.1.3 Test della sopravvivenza in aria

I molluschi bivalvi sono normalmente sottoposti a periodi di ipossia o anossia in relazione al ciclo delle maree o come conseguenza di eventi di eutrofizzazione. La loro capacità di resistere per periodi più o meno lunghi a tali condizioni influisce sulla fitness della popolazione. La quantificazione del tempo di sopravvivenza in aria dei bivalvi ci consente di stimare in anticipo gli stress esogeni ed endogeni a cui gli animali sono soggetti. Il principale espediente fisiologico per aumentare la resistenza all'anossia è la riduzione del tasso metabolico con conseguente risparmio energetico (Storey e Storey, 1990).

Un'esposizione prolungata all'anossia porterà progressivamente ad uno stato anossico nei tessuti e i processi metabolici lasceranno la via aerobica per quella anaerobica (Eertman et al., 1993). In tal caso possiamo distinguere due percorsi metabolici alternativi per la produzione di energia: la classica via glicolitica e la via dell'aspartato-succinato. Quest'ultima aumenta la resa anaerobica di ATP aumentando di conseguenza il tempo di sopravvivenza in aria. Quando i bivalvi sono sottoposti a stress, meccanismi adattativi e/o sistemi di detossificazione portano ad un aumento della loro domanda di energia. Ad esempio, elevate temperature, che causano un aumento del tasso metabolico, influenzano negativamente la sopravvivenza in aria (Veldhuizen-Tsoerkan et al., 1991). Una riduzione della sopravvivenza in aria è stata osservata anche in bivalvi provenienti da ambienti ricchi di idrogeno solforato, indice di condizioni ambientali anossiche (Shumway et al., 1983; de Zwaan et al., 1991) e in condizioni di allevamento non idonee (Boscolo et al., 2003). Quindi l'influenza esercitata da molteplici fattori biotici e abiotici sul tempo di sopravvivenza in aria dei bivalvi rende tale parametro un sensibile strumento per la valutazione di condizioni di stress.

Vari autori considerano la riduzione del tempo di sopravvivenza in aria per i molluschi come un indice di stress generale dovuto all'inquinamento marino (Eertman et al., 1993; Viarengo et al., 1995) e altri utilizzano tale indice per valutare lo stato di salute dei molluschi in aree contaminate (Thomas et al., 1999; Caricato et al., 2010).

Dal punto di vista operativo, si prelevano 40 individui per ogni campionamento, subito dopo l'arrivo in laboratorio, gli individui vanno lavati accuratamente, asportando eventuali epibionti con l'ausilio di un bisturi, asciugati, posti in contenitori chiusi ermeticamente con valori di umidità a saturazione e mantenuti a temperatura costante ($18 \pm 0,5^\circ\text{C}$). A partire dal giorno successivo e con cadenza giornaliera vanno eliminati gli individui morti, registrandone il numero fino ad esaurimento del campione. Gli animali vengono considerati morti quando si presentano con le valve ben aperte e se, non si osserva alcuna risposta in seguito a stimolazione meccanica (ad es.: punzecchiando l'animale o cercando di chiudere le valve).

L'elaborazione dei dati ottenuti dal test di sopravvivenza prevede il processamento secondo l'analisi di Kaplan e Meier (1958) con la quale è possibile calcolare il valore di LT_{50} , ossia il numero di giorni in cui il 50% degli individui muore. I dati vengono rappresentati come curve cumulative di sopravvivenza. Il confronto tra le curve viene fatto attraverso il test F di Cox.

4.3.1.4 Test di infossamento

Le modifiche comportamentali sono uno degli indicatori più sensibili allo stress ambientale (Eisler, 1979; Olla et al., 1980) e possono interferire direttamente con la sopravvivenza. Quando un organismo viene a contatto con un contaminante avvia una serie di risposte comportamentali. Nei molluschi bivalvi, quali le vongole, il comportamento fossorio è un adattamento nei confronti della predazione. È stato dimostrato che tale comportamento può essere influenzato dalla qualità dei sedimenti e dalla presenza in questi di contaminanti (Pearson et al., 1981; Niper et al., 1998) riducendo il numero di individui che si infossano nei sedimenti o aumentando il tempo di infossamento (Bonnard et al., 2009).

Dal punto di vista operativo i protocolli sono stati descritti da Bonnard et al. (2009) e Buffet et al. (2011) e riportano che dopo aver acclimatato le vongole in laboratorio, 20 individui vengono posti in contenitori di plastica da 5 L, riempiti con il sedimento da testare (spessore 3 cm) e con 2 L d'acqua di mare. Quindi si osservano gli individui che si infossano in determinati intervalli di tempo: nella prima ora ogni 5 minuti, nella seconda ora ogni 10 minuti, nella terza e quarta ora ogni 20 minuti e infine una volta all'ora fino alla sesta o settima ora del test.

Per l'analisi statistica, seguendo Buffet et al. (2011), le curve di infossamento vengono trasformate su scala logaritmica per ottenere un modello di regressione lineare che meglio si adatta ai dati. Tali curve vengono confrontate usando l'analisi della covarianza (ANCOVA). I risultati vengono presentati come $media \pm DS$. Le differenze significative vengono valutate applicando o l'analisi della varianza (ANOVA) o il test non parametrico U di Mann-Whitney.

4.4 Imposex

Un'utile risposta biologica per valutare l'inquinamento da composti organostannici è rappresentata dal fenomeno dell'imposex: uno pseudoermafroditismo, scoperto per la prima volta da Blaber (1970) e coniato con il termine imposex da Smith (1971), che consiste nella sovrapposizione di caratteri sessuali maschili, solitamente un pene e uno spermidotto o vaso deferente, nelle femmine di molte specie di molluschi gasteropodi gonocorici.

È una sindrome irreversibile, la cui insorgenza nelle femmine è dose-dipendente (Bryan et al., 1986) ed è stato ampiamente impiegato come bioindicatore specifico della contaminazione da TBT negli ambienti acquatici, in alternativa o in supporto alle analisi chimiche (es.: Sousa et al., 2007; Rato et al., 2009; Couceiro et al., 2009; Barroso et al., 2011; e altri). Tale biomarker si presenta di facile esecuzione, poco oneroso dal punto di vista economico ed è stato spesso introdotto all'interno dei programmi internazionali di biomonitoraggio di ambienti costieri e di transizione, tra i quali il programma internazionale di monitoraggio della Commissione OSPAR (Joint Assessment and Monitoring Program of the Oslo and Paris Commission, JAMP OSPAR).

Sebbene evidenze da esperimenti di laboratorio e da indagini epidemiologiche abbiano suggerito la possibile influenza anche di altri composti *endocrine disruptors* nello sviluppo del fenomeno (Oehlmann et al., 2000; Tilmann et al., 2001; Shulte-Oehlmann et al., 2000; Maran et al., 2006), per numerose specie sentinella è stato provato che alcuni indici di imposex sono ben correlati ai livelli di contaminazione da TBT e altamente sensibili.

Tra gli indici e parametri frequentemente utilizzati per descrivere l'estensione del fenomeno dell'imposex a livello di popolazione, ovvero come stima dell'impatto ecologico causato dall'inquinamento da TBT, vi sono:

- VDSI (*Vas Deferent Sequence Index*): livello medio di imposex sviluppato in una popolazione;
- RPLI (*Relative Penis Length Index*): rapporto percentuale tra la lunghezza media del pene femminile su quella maschile;
- RPSI (*Relative Penis Size Index*): rapporto percentuale tra la "dimensione" media del pene femminile su quella maschile (stimata come il cubo della lunghezza del pene);
- M:F (*sex ratio*): rapporto del numero di maschi rispetto al numero di femmine;
- %I (percentuale di incidenza dell'imposex): percentuale di femmine affette da imposex;
- %S (percentuale di sterilità): percentuale di femmine sterili.

Oltre agli studi di biomonitoraggio per la valutazione dello stato ambientale, negli ultimi anni, con la messa al bando del TBT, hanno preso il via approfondimenti legati al recupero delle popolazioni di gasteropodi affette da inquinamento da composti organostannici. In tali studi vengono prevalentemente seguite tre diverse linee che prevedono la verifica dei seguenti parametri:

- diminuzione della gravità del livello di imposex;
- aumento della capacità di riproduzione per le popolazioni in cui la sterilizzazione dovuta all'imposex ha causato una riduzione della fecondità;
- ricolonizzazione di aree in cui si era verificata la scomparsa di individui.

I primi due parametri vengono valutati tramite gli indici di imposex sopraelencati, mentre la ricolonizzazione delle popolazioni di gasteropodi viene stimata attraverso studi di popolazione e taglia verificando la presenza di stadi giovanili e/o femmine nelle aree in cui precedentemente erano scomparsi o si presentavano in numero molto basso. Nella Scheda Tecnica 2 si riportano esempi pratici di applicazione e calcolo degli indici per la valutazione dell'imposex.

Scheda Tecnica 2 - Valutazione dell'imposex in gasteropodi cenogasteropodi

Principio del metodo

Il metodo descritto prevede la valutazione del grado di imposex nelle femmine di gasteropodi cenogasteropodi. La maggior parte dei gasteropodi cenogasteropodi sono gonocorici, ovvero a sessi separati, e hanno un apparato riproduttivo costituito da una gonade impari che comunica con la cavità del mantello per mezzo del dotto genitale. Quest'ultimo è costituito da tre porzioni che prendono il nome di dotto palleale distale, dotto renale mediano e gonodotto prossimale. Il dotto palleale è la regione interessata dal fenomeno dell'imposex, nel maschio è specializzato in una ghiandola prostatica, un vaso deferente e un organo copulatore situato anteriormente in prossimità del tentacolo cefalico destro. Nella femmina il dotto palleale è invece specializzato in una borsa copulatrice e nel così detto ricettacolo seminale.

Di seguito vengono descritte le fasi previste per la valutazione del grado di imposex distinte in: procedura di campionamento e conservazione, procedura di laboratorio, calcolo degli indici per la valutazione dell'imposex.

Procedura di campionamento e conservazione

Il prelievo di gasteropodi cenogasteropodi in ambiente marino o lagunare può essere effettuato tramite metodi di cattura a mano o per mezzi meccanici (reti, trappole, nasse, ecc). Il metodo utilizzato per la maggiore prevede l'utilizzo di trappole artigianali poste sul fondo, all'interno delle quali viene inserita un'esca di richiamo, quindi recuperate dopo un tempo variabile tra 1-6 ore, in relazione alla densità di gasteropodi stimata. Operativamente per ogni campione vanno presi 30-40 esemplari, il numero minimo non dovrebbe comunque essere mai sotto i 30 esemplari.

I campioni prelevati devono essere conservati refrigerati ad una temperatura tra 0-4°C sino all'arrivo in laboratorio dove sono stabulati per 24 h in acqua di mare artificiale, o acqua prelevata nel sito di raccolta opportunamente filtrata, e ossigenati tramite aeratori da acquario. Successivamente i campioni vengono processati immediatamente o conservati a -20°C fino al momento dell'analisi biologica. Una volta ultimata l'analisi biologica, gli organismi sono infine conservati (previa rimozione dell'opercolo) a -20°C e possono essere utilizzati per le analisi chimiche (vedi capitolo 0).

Procedura di laboratorio

Per ogni singolo individuo si determinano le seguenti misure biometriche: lunghezza, larghezza, altezza della conchiglia, ampiezza dell'apertura. In

Figura A e B sono riportati alcuni esempi delle principali biometrie che possono essere utilizzate in relazione alla specie oggetto di studio.

Gli organismi sono poi privati della conchiglia preferibilmente mediante morse manuali (Figura C) che consentono di minimizzare al massimo lo stress meccanico ai tessuti che può alterare le successive valutazioni.

Successivamente si taglia il mantello dell'organismo in modo da esporre l'ovidotto palleale. In questa fase si determina, inoltre, il sesso degli organismi tramite microscopio binoculare ottico. In Figura D è riportato lo schema generale della morfologia delle strutture riproduttive che si osservano rispettivamente nei maschi e nelle femmine di gasteropodi cenogasteropodi una volta tagliato il mantello ed esposto l'ovidotto palleale. In Figura E è riportato un esempio di organismi della specie *Hexaplex trunculus* rispettivamente: maschio (a), femmina (b), femmina che presenta imposex (c).

In seguito si procede con le misurazioni dei parametri (VDS, misura del pene, ecc.) per il calcolo degli indici per la valutazione dell'imposex (VDSI, RPLI, RPSI, M:F, %I, %S) descritti di seguito in dettaglio.

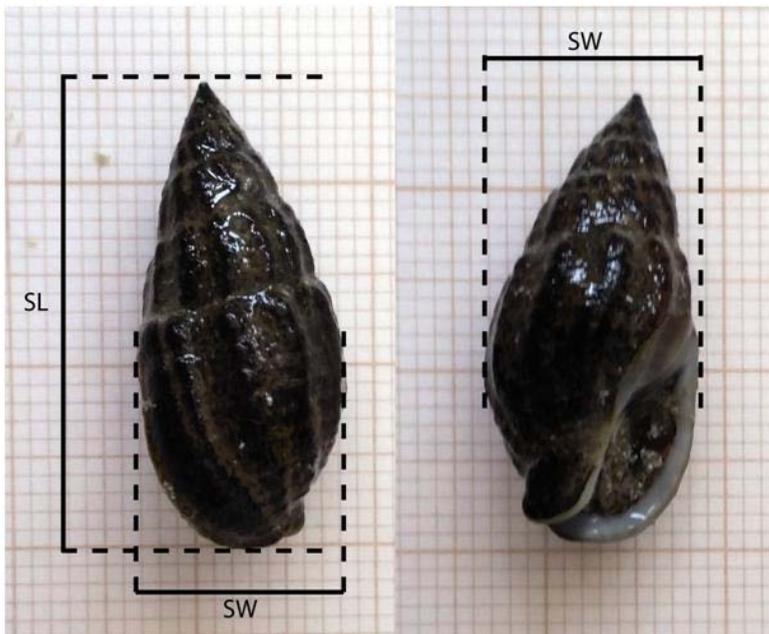


Figura A. Misure biometriche per la specie *Nassarius nitidus*: larghezza della conchiglia [SW], altezza della conchiglia [SL], misura della larghezza minima della conchiglia [ortogonale alla misura della conchiglia SW].



Figura B. Misure biometriche per la specie *Bolinus brandaris*: larghezza della conchiglia [SW], altezza della conchiglia [SL], altezza della conchiglia senza il sifone [SLWS], ampiezza dell'apertura [A] (tratto da: Martin et al., 1995).

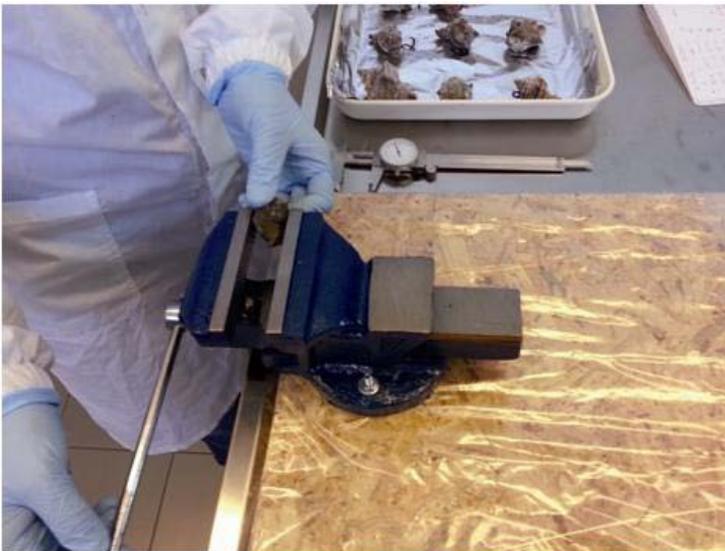


Figura C. Morsa manuale utilizzabile per rompere la conchiglia minimizzando al massimo lo stress meccanico ai tessuti che può alterare le valutazioni sugli organismi.



Figura D. Schema della morfologia delle strutture riproduttive di maschio (♂) e femmina (♀ (senza imposex) con esposto l'ovidotto paleale [Gibbs e Bryan, 1996, modificato].

a)



b)



c)



Figura E. Hexaplex trunculus - maschio [a], femmina normale [b] e femmina imposex - stadio 4 [c].
 Abbreviazioni: a: ano; g: gonade; p: pene; v: vagina; vd: vaso deferente

Calcolo e valutazione degli indici applicati all'imposex

VDSI (*Vas Deferent Sequence Index*)

L'indice VDSI è calcolato come la media dei valori di VDS valutati in tutte le femmine del campione secondo la seguente formula matematica:

$$VDSI = \frac{\Sigma \text{ valore di VDS}}{n^{\circ} \text{ femmine}}$$

Il VDS (*Vas Deferens Sequence*) può essere genericamente descritto da un modello composto da 4-6 livelli: durante i primi stadi si assiste alla formazione del vaso deferente e di un piccolo pene; gli stadi intermedi sono caratterizzati dall'aumento delle dimensioni delle strutture riproduttive maschili; negli ultimi stadi si assiste alla malformazione degli organi riproduttivi femminili, talvolta fino a raggiungere la sterilità (es.: ostruzione dell'ovidotto palleale, rottura della borsa copulatrice, rottura della ghiandola della capsula).

Per determinare il valore di VDS, si applica la scala di seguito descritta e che fa riferimento allo schema generale di sviluppo dell'imposex nei Cenogasetropodi riportato in Figura F (Stroben et al., 1992, modificato).

Stadio 0 del *Vas Deferens Sequence* (VDS 0): assenza delle caratteristiche maschili, non è presente né il pene, né il vaso deferente;

Stadio 1a del *Vas Deferens Sequence* (VDS 1a): pene di ridotte dimensioni, assenza del dotto del pene e del vaso deferente, dietro al tentacolo cefalico destro;

Stadio 1b del *Vas Deferens Sequence* (VDS 1b): assenza del pene, presenza di un vaso deferente corto e distale, dietro al tentacolo cefalico destro;

Stadio 1c del *Vas Deferens Sequence* (VDS 1c): assenza del pene, presenza di un vaso deferente corto e distale in prossimità dell'apertura vaginale;

Stadio 2a del *Vas Deferens Sequence* (VDS 2a): pene di ridotte dimensioni, presenza di un dotto del pene interrotto o chiuso, dietro al tentacolo cefalico destro;

Stadio 2b del *Vas Deferens Sequence* (VDS 2b): assenza del pene, presenza di un vaso deferente corto dietro al tentacolo cefalico destro e una parte distinta del vaso deferente in prossimità dell'apertura vaginale;

Stadio 2c del *Vas Deferens Sequence* (VDS 2c): pene di ridotte dimensioni, presenza di un vaso deferente corto e distale in prossimità dell'apertura vaginale;

Stadio 3a del *Vas Deferens Sequence* (VDS 3a): presenza del pene, di un dotto del pene e di vaso deferente incompleto che prosegue verso l'apertura della vagina;

Stadio 3b del *Vas Deferens Sequence* (VDS 3b): assenza del pene, vaso deferente che dal tentacolo cefalico destro prosegue sul fondo della cavità del mantello sino alla vagina;

Stadio 3c del *Vas Deferens Sequence* (VDS 3c): presenza del pene, di un dotto del pene e di vaso deferente corto e distale in prossimità dell'apertura vaginale;

Stadio 4 del *Vas Deferens Sequence* (VDS 4): presenza del pene, dotto del pene e vaso deferente che arriva in prossimità della vagina;

Stadio 4+ del *Vas Deferens Sequence* (VDS 4+): presenza del pene, dotto del pene e vaso deferente che passa l'apertura della vagina ed entra nel canale ventrale della ghiandola della capsula;

Stadio 5a del *Vas Deferens Sequence* (VDS 5): analogo a quanto descritto per lo stadio 4+ con formazione della ghiandola prostatica nella regione della ghiandola della capsula. Cambiamento del sesso;

Stadio 5b del *Vas Deferens Sequence* (VDS 5): analogo a quanto descritto per lo stadio 4+ con occlusione della vagina. Cambiamento del sesso;

Stadio 5c del *Vas Deferens Sequence* (VDS 5): analogo a quanto descritto per lo stadio 4+ con rottura della borsa copulatrice e della ghiandola della capsula. Cambiamento del sesso;

Stadio 6a del *Vas Deferens Sequence* (VDS 6): analogo a quanto descritto per lo stadio 5a con l'accumulo di una massa di capsule ovigere abortite;

Stadio 6b del *Vas Deferens Sequence* (VDS 6): analogo a quanto descritto per lo stadio 5b con l'accumulo di una massa di capsule ovigere abortite.

Esistono ulteriori scale specifiche di classificazione dell'imposex per i gasteropodi che rappresentano un'evoluzione a quella generale proposta da Stroben et al. (1992). Un esempio è quella proposta dallo stesso autore (Stroben et al., 1992) per la specie *Nassarius reticulatus* e che contempla solo alcuni degli stadi del VDS. Il dettaglio di tale scala è riportata in Figura G.

Un ulteriore esempio è la scala di Terlizzi et al. (1999) riportata in Figura H che può essere utilizzata per la classificazione di *Hexaplex trunculus*. Tale classificazione, di seguito descritta, è molto simile alla precedente, ma presenta alcune differenze soprattutto negli stadi di imposex più elevati:

Stadio 0 del *Vas Deferens Sequence* (VDS 0): assenza di caratteristiche maschili nelle femmine;

Stadio 1 del *Vas Deferens Sequence* (VDS 1): pene di ridotte dimensioni, assenza del dotto del pene, dietro al tentacolo cefalico destro;

Stadio 2 del *Vas Deferens Sequence* (VDS 2): pene di ridotte dimensioni, presenza di un dotto del pene interrotto o chiuso, dietro al tentacolo cefalico destro;

Stadio 3 del *Vas Deferens Sequence* (VDS 3): presenza del pene, di un dotto del pene e di vaso deferente incompleto che prosegue verso l'apertura della vagina;

Stadio 4 del *Vas Deferens Sequence* (VDS 4): presenza del pene, dotto del pene e vaso deferente che arriva in prossimità della vagina;

Stadio 4+ del *Vas Deferens Sequence* (VDS 4.3): presenza del pene, dotto del pene e vaso deferente che passa appena l'apertura della vagina;

Stadio 4+ del *Vas Deferens Sequence* (VDS 4.7): presenza del pene, dotto del pene e vaso deferente che passa l'apertura della vagina e entra nel canale ventrale della ghiandola della capsula;

Stadio 5 del *Vas Deferens Sequence* (VDS 5): la vagina è assente; generalmente la ghiandola della capsula è spaccata ventralmente per due terzi della sua lunghezza con il lume rivoltato verso la cavità del mantello. Il rilascio delle uova sembra essere impedito, in quanto spesso si possono ritrovare capsule abortive (Terlizzi et al., 1999).

Per quanto riguarda la valutazione dei risultati, una volta calcolato l'indice va considerato che:

Valori di VDSI < 4 indicano che la maggior parte delle femmine del campione mantiene inalterata la capacità di riprodursi, in quanto la vagina non è ostruita e permette la copula e il rilascio delle capsule ovigere.

Valori di VDSI ≥ 4 indicano che la popolazione è costituita da femmine prevalentemente sterili. In questo caso il vaso deferente occlude la vagina: le capsule ovigere continuano comunque ad essere prodotte nonostante l'occlusione della vagina, ma non potendo essere emesse all'esterno formano una massa di capsule abortite che si accumulano nella ghiandola della capsula. In alcuni casi queste masse si accrescono al punto che lacerano le pareti dell'ovidotto, causando la morte della femmina. In questi casi è visibile la massa estrusa fusa alla conchiglia.

Il VDSI è considerato uno degli indici più affidabili e informativi nella valutazione dell'imposex. Rispetto agli indici che nel loro calcolo considerano la lunghezza del pene delle femmine (ad es. RPLI, RPSI, ecc.) l'indice VDSI ha i seguenti vantaggi:

Il VDSI permette di comparare risposte derivanti da specie diverse, sottoposte allo stesso tipo di contaminazione verificando il grado di sensibilità specifico (Stroben et al., 1996; Titley-O'Neal et al., 2011).

Il VDSI non è soggetto o influenzato dalle fluttuazioni stagionali che si verificano nelle popolazioni delle specie campionate (Oehlmann et al., 1996; Stroben et al., 1996; Titley-O'Neal et al., 2011).

Il VDSI è inoltre considerato un indice con significato ecologico dimostrabile in quanto permette una stima della capacità riproduttiva della popolazione campionata (Gibbs et al., 1987; Stroben et al., 1996; Titley-O'Neal et al., 2011).

Rispetto ad altri indici comunemente utilizzati il VDSI presenta la maggior correlazione con i livelli di TBT determinati negli organismi (Stroben et al., 1996, Titley-O'Neal et al., 2011).

RPLI (Relative Penis Length Index) e RPSI (Relative Penis Size Index)

Nello studio di una popolazione colpita da imposex ci sono più strumenti per valutare il grado di insorgenza del fenomeno, tra cui la percentuale delle femmine che presentano il pene. Tuttavia va detto che oltre un certo grado di contaminazione tutte le femmine esibiscono almeno i primi stadi di imposex e dunque questo indice perde significato. Gli indici RPLI e RPSI sono utilizzati nella valutazione del grado di imposex di una popolazione dando una misura quantitativa della dimensione media del pene delle femmine rispetto a quella dei maschi.

La lunghezza del pene dei maschi e delle femmine che presentano un grado di imposex è solitamente misurata tramite carta millimetrata, calibro o analisi di immagine.

L'RPLI è un indice basato sul rapporto percentuale tra lunghezza media del pene delle femmine (PL media delle femmine) e dei maschi (PL media dei maschi). Di seguito si riporta la relativa formula matematica:

$$RPLI = \frac{(PL \text{ media delle femmine})}{(PL \text{ media dei maschi})} \times 100$$

L'RPSI invece è espresso come il rapporto tra il cubo della lunghezza media del pene delle femmine e il cubo della lunghezza media del pene dei maschi, moltiplicato per 100. L'utilizzo del cubo della lunghezza permette di basarsi su un dato di semplice misurazione, quale la lunghezza, e di ottenere però un risultato che stima la massa del pene (Gibbs et al., 1987).

$$RPSI = \frac{(PL \text{ media delle femmine})^3}{(PL \text{ media dei maschi})^3} \times 100$$

L'RPSI, pur essendo uno strumento molto utile perché dà una stima dello sviluppo del pene nelle femmine, non dà indicazioni sulla sterilità. Per questo motivo dunque viene spesso usata l'associazione dei due indici RPSI e VDSI, in quanto quest'ultimo è molto utile per valutare la capacità

riproduttiva della popolazione (Gibbs e Bryan, 1996), come precedentemente illustrato.

M:F (sex ratio)

Il rapporto M:F è calcolato secondo la formula:

$$M:F = \frac{(\text{numero maschi})}{(\text{numero femmine})}$$

Il rapporto M:F può dare alcune indicazioni sul grado di imposex di una popolazione: in condizioni indisturbate infatti tale rapporto dovrebbe attestarsi su valori prossimi a 1. Valori di M:F > 1 indicano che la popolazione di gasteropodi è costituita prevalentemente da maschi, mentre valori di M:F < 1 indicano una popolazione dominata da femmine. Tale rapporto può essere utile per segnalare siti potenzialmente contaminati, ma anche dare indicazione del recupero di popolazioni (es.: precedentemente caratterizzate dalla presenza di imposex nella popolazione) con il ristabilirsi del rapporto 1:1.

%I (percentuale di femmine affette da imposex) e %S (percentuale di sterilità)

Le %I e %S sono due parametri utilizzati di frequente per descrivere l'estensione del fenomeno di imposex a livello di popolazione e dunque come stima dell'impatto ecologico causato dall'inquinamento da TBT.

Di seguito vengono riportate le formule matematiche per il calcolo del %I e %S:

$$\%I = \frac{(\text{numero femmine imposex})}{(\text{numero totale femmine})} \times 100$$

$$\%S = \frac{(\text{numero femmine imposex} \geq 4 \text{ VDSI})}{(\text{numero totale femmine})} \times 100$$

In passato, date le elevate concentrazioni ambientali di composti organostannici e quindi la presenza diffusa di imposex, la %I non era molto utilizzata in quanto comunemente i valori si attestavano al 100% nella quasi totalità dei campioni, non discriminando in nessun modo il grado di imposex del campione indagato. Secondo alcuni autori tuttavia, nell'ultimo decennio nel quale si è osservata una diminuzione dei livelli ambientali di TBT, questo parametro è tornato ad essere uno strumento utile nello studio dell'imposex (Couceiro et al., 2009; Cassander et al., 2011). La %S è invece un indice, introdotto da Gibbs et al. (1987), che valuta la porzione di femmine sterili in una popolazione e viene spesso associato all'indice VDSI, precedentemente descritto.

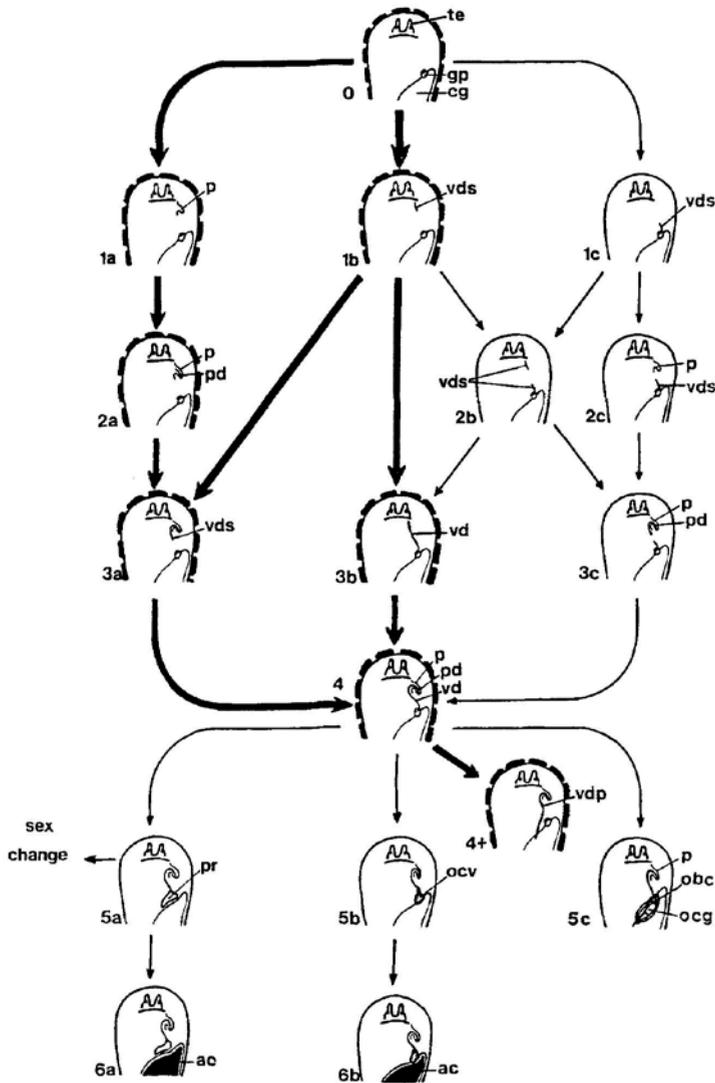


Figura F. Schema generale di sviluppo del grado di imposex nei Cenogasteropodi (Stroben et al., 1992). Abbreviazioni: ac: massa di capsule abortive; cg: ghiandola della capsula; gp: papilla genitale; obc: apertura della borsa copulatrice; ocv: occlusione della vulva; p: pene; pd: dotto del pene; pr: prostata; te: tentacolo, vas: passaggio del vaso deferente nella ghiandola della capsula, vds: vaso deferente.

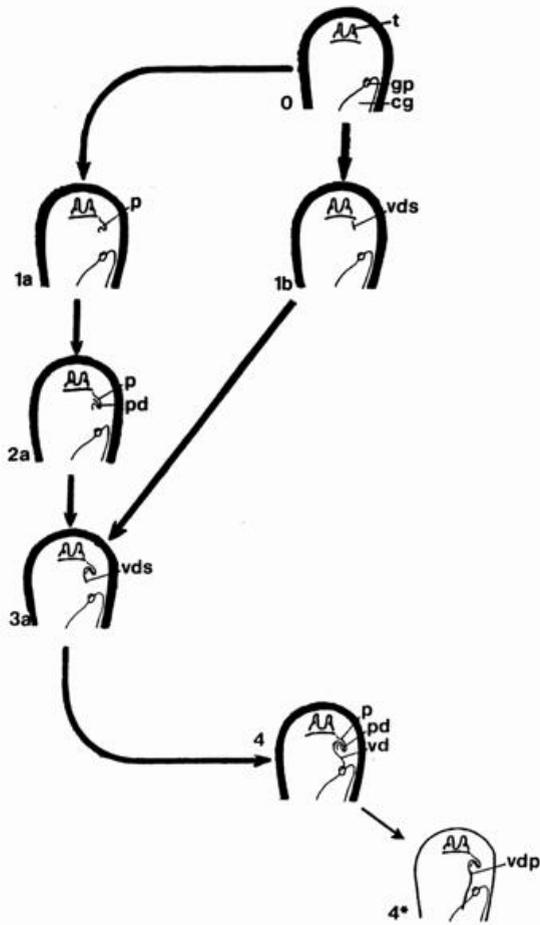


Figura G. Schema di evoluzione del grado di imposex per la specie *Nassarius reticulatus* (Stroben et al., 1992, modificato).

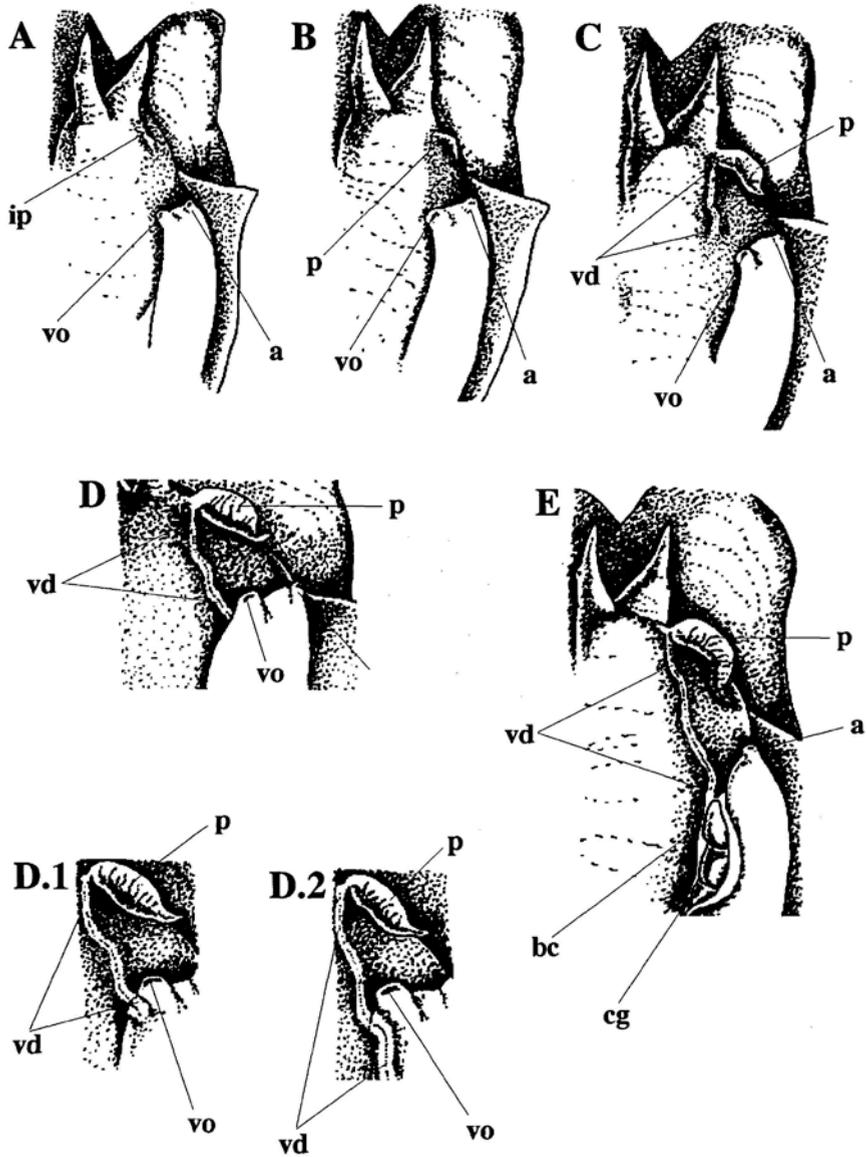


Figura H. Scala di insorgenza del grado di imposex in *Hexaplex trunculus*. A, stadio 1; B, stadio 2; C, stadio 3; D, stadio 4; D.1, stadio 4.3; D.2, stadio 4.7; E, stadio 5 (Terlizzi et al., 1999).

BIBLIOGRAFIA

ABALOS M., BAYONA J.M., COMPAÑÓ R., GRANADOS M., LEAL C., PRAT M.D., 1997. Analytical procedures for the determination of organotin compounds in sediments and biota: a critical review. *Journal of Chromatography A*, 788: 1-49.

ABIDLI S., COSTA CASTRO L.F., LAHBIB Y., REIS-HENRIQUES M.A., EL MENIF N.T., SANTOS M.M., 2013. Imposex development in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Caenogastropoda) involves changes in the transcription levels of the retinoid X receptor (RXR). *Chemosphere*, 93(6): 1161-1167.

ABIDLI S., LAHBIB Y., TRIGUI EL MENIF N., 2012. Relative growth and reproductive cycle into two populations of *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) from northern Tunisia (Bizerta Lagoon and small Gulf of Tunis). *Biologia*, 67(4):1-11.

AIRAKSINEN R., RANTAKOKKO P., TURUNEN A.W., VARTIAINEN T., VUORINEN P.J., LAPPALAINEN A., VIHERVUORI A., MANNIO J., HALLIKAINEN A., 2010. Organotin intake through fish consumption in Finland. *Environ Res*, 110(6): 544-547.

ALZIEU C., 1998. Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean & Coastal Management*, 40:23-36.

ALZIEU C., 1991. Environmental problems caused by TBT in France: assessment, regulations, prospects. *Marine Environmental Research*. 32: 7-17.

ALZIEU C., 2000a. Impact of tributyltin on marine invertebrates. *Ecotoxicology*, 9: 71-76.

ALZIEU C., 2000b. Environmental impact of TBT: the French experience. *The Science of the total environment*, 258 (1-2): 99-102.

ALZIEU C., SANJUAN J., MICHEL P., BOREL M., DRENO J.P., 1989. Monitoring and assessment of butyltins in Atlantic coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, 20: 22-26.

ALZIEU C., THIBAUD Y., HERAL M., BOUTIER B., 1980. Evaluation des risques dus a l'emploi des peintures anti-salissures dans les zones conchylicoles. *Rev. Trav. Inst. Peches Marit.*, 44: 301-348.

ANTIZAR-LADISLAO B., 2008. Environmental levels, toxicity and human exposure to Tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. *Environment International*, 34: 292-308.

APAT-IRSA/CNR. Metodi Analitici per le Acque. Volume Primo, Sezione 1000. Manuali e linee guida 29/2003 ISBN: 88-448-0083-7.

ARAMBARRI I., GARCIA R., MILLÁN E., 2003. Assessment of tin and butyltin species in estuarine superficial sediments from Gipuzkoa, Spain. *Chemosphere*, 51: 643-649.

ARTHUR C.L., PAWLISZYN J., 1990. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibres. *Analytical Chemistry*, 62(19): 2145–2148.

AXIAK V., VELLA A.J., MICALLEF D., CHIRCOP P., MINTOFF B., 1995. Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gasteropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. *Marine Biology*, 121: 685-691.

AZENHA M., VASCONCELOS M.T., 2002. Butyltin compounds in Portuguese wines. *J Agric Food Chem*, 50(9): 2713–2716.

BARROSO C.M., RATO M., VERISSIMO A., SOUSA A., SANTOS J.A., COELHO S., GASPAR M.G., MAIA F., GALANTE-OLIVERA S., 2011. Combined use of *Nassarius reticulatus* imposex and statolith age determination for tracking temporal evolution of TBT pollution in the NW Portuguese continental shelf. *J. Environ. Monit.*, 13:3018-3025.

BATLEY G.E., 1996. The distribution and fate of tributyltin in the marine environment. In: DE MORA S.J. (Ed.), *Tributyltin: a Case Study of an Environmental Contaminant*. Cambridge Environmental Chemistry Series. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 139-165.

BAIRD R.H., 1958. Measurement of condition in mussels and oysters. *J. Cons. Perm. Inter. Explor. Mer.*, 23: 249-257.

BAYNE B.L., THOMPSON R.J., 1970. Some physiological consequences of keeping *Mytilus edulis* in the laboratory. *Helgoländerwiss Meeresunters*, 20: 526-552.

BEAUMONT A.R. NEWMAN P.B., 1986. Low levels of tributyl tin reduce growth of marine micro-algae. *Marine Pollution Bulletin*, 17: 457-461.

BECEIRO-GONZÁLEZ E., GUIMARAES A., ALPENDURADA M.F., 2009. Optimisation of a headspace-solid-phase micro-extraction method for simultaneous determination of organometallic compounds of mercury, lead and tin in water by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216: 5563–5569.

BECKER VAN SLOOTEN K., TARRADELLAS J. 1994. Accumulation, depuration and growth effects of tributyltin in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* under field conditions, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(5): 755-762.

BECKER VAN SLOOTEN K., TARRADELLAS J., 1995. Organotins in Swiss lakes after their ban: assessment of water, sediment, and *Dreissena polymorpha* contamination over a four-year period. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.*, 29(3): 384-392.

BELFROID A.C., PURPERHART M., ARIESE F., 2000. Organotin Levels in Seafood. *Marine Pollution Bulletin*, 40(3): 226-232.

BENINGER P.G., LUCAS A., 1984. Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat, *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve). *Journal of experimental marine biology and ecology*, 79: 19-37.

BENNETT R.F., 1983. Industrial development of organotin compounds. *Industrial Chem. Bull.* 2, 171-176.

BENNETT R.F., 1996. Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. Mora SJ, editor. *Case study of environmental contaminants*. Cambridge' Cambridge University Press, 21 – 61.

BERGE J.A., BREVIK E.M., BJØRGE A., FØLSVIK N., GABRIELSEN G.W., WOLKERS H., 2004. Organotins in marine mammals and seabirds from Norwegian territory. *J. Environ. Monit.* 6, 108–112.

BERNAT P., DŁUGOŃSKI J., 2006. Acceleration of tributyltin chloride (TBT) degradation in liquid cultures of the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Chemosphere*, 62: 3-8.

BERTO D., BOSCOLO R., CACCIATORE F., GIANI M., 2006 - Environmental assessment of organotins used in antifouling paints. Butyltin concentrations in Southern Venice Lagoon as a case study. *Oceanological and Hydrobiological studies*, 35(3): 270-283.

BERTO D., BOSCOLO R., COVELLI S., GIOVANARDI O., GIANI M., MASSIRONI M., GRASSIA L., 2007. Organotins (TBT and DBT) in water, sediments and gastropods in the southern Venice lagoon (Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 55: 425-435.

BHOSLE N.B., GARG A., HARJI R., JADHAV S., SAWANT S. S., KRISHNAMURTHY V., ANIL C., 2006. Butyltins in the sediments of Kochi and Mubai harbours, west coast of India. *Environment International*, 32: 252-258.

BINATO G., BIANCOTTO G., PIRO R., ANGELETTI R., 1998. Atomic absorption spectrometric screening and gas chromatographic-mass spectrometric determination of organotin compounds in marine mussels: an application in samples from the Venetian Lagoon, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 361: 333-337.

BLABER S.J.M., 1970. The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). *Proc. Malac. Soc. Lond.*, 39: 231 –233.

BLAIR W.R., OLSON G.J., BRINCKMAN F.E., IVERSON W.P., 1982. Accumulation and fate of tri-n- butyltin cation in estuarine bacteria, *Microb. Ecol.*, 8: 241-251.

BLUNDEN S.J., CHAPMAN A., 1986. Organotin compound in the environment. In: Craig P.J. (Ed.), *Organometallic compounds in the Environment*. Longman, London, 111-159.

BLUNDEN S.J., EVANS C.J., 1990. Organotin compounds. In: Hutzinger O. (Ed.), *The Handbook of Environmental Chemistry. Vol 3, Part E, Anthropogenic Compounds*. Springer, Berlin, 1-44.

BODOY A., PROU J.E., BERTHONNE J.P., 1986. Etude comparative de differents indices de condition chez l' huître creuse (*Crassostrea gigas*). *Haliotis*, 15: 173-182.

- BOESE B.L., LEE II H., 1992. Synthesis of methods to predict bioaccumulation of sediment pollutants. U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory Narragansett, ERL N, No. N232.
- BONNARDAB M., ROMÉOC M., AMIARD-TRIGUETA C., 2009. Effects of Copper on the Burrowing Behavior of Estuarine and Coastal Invertebrates, the Polychaete *Nereis diversicolor* and the Bivalve *Scrobicularia plana*. Human and Ecological Risk Assessment, 15: 11-26.
- BORTOLI A., TRONCON A., DARIOL S., PELLIZZATO F., PAVONI B., 2003. Butyltins and phenyltins in biota and sediments from the Lagoon of Venice. Oceanologia, 45: 7-23.
- BOSCOLO R., CACCIATORE F., GIOVANARDI O., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in transplanted Manila clams [*Tapes philippinarum*] from the Lagoon of Venice as assessed by PAHs/shell weight index: A preliminary study. Marine Pollution Bulletin, 55(10-12): 485-493.
- BOSCOLO R., CACCIATORE F., GIOVANARDI O., 2008. INDICE PCDDF/PC e analisi fattoriale per la valutazione quantitativa e qualitativa della decontaminazione da PCDD e PCDF in *Tapes philippinarum*. Biol. Mar. Med. p. 128.
- BOSCOLO R., CORNELLO M., GIOVANARDI O., 2002. Studio preliminare per la scelta di un indice di condizione applicato alla mitilicoltura nell'Adriatico settentrionale, Biol. Mar. Medit. 1: 542-546.
- BOSCOLO R., CORNELLO M., GIOVANARDI O., 2003. Condition index and air survival time to compare three kinds of Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve) farming systems. Aquaculture International 11: 243-254.
- BOSCOLO R., CACCIATORE F., BERTO D., MARIN M.G., GIANI M., 2004. Contamination of natural and cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the northern Adriatic Sea by tributyltin and dibutyltin compounds. Applied organometallic chemistry, 18: 614-618.
- BRESSA G., CARAVELLO G.U., DA VILLA G.D., SISTI E., 1999 - Organotin compounds in mussels and sediments from the Lagoon of Venice. Fresenius Environmental Bulletin, 8: 107-115.
- BRESSA G., CIMA L., 1985. Lo stagno e i suoi composti organici (parte I), Ambiente risorse e salute, 46: 45-47.
- BRESSAN M., MARIN M.G., 1985. Seasonal variations in biochemical composition and condition index of cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) in the lagoon of Venice (North Adriatic). Aquaculture, 48: 13-21.
- BURTON E.D., PHILLIPS I.R., HAWKER D.W., 2005. In situ partitioning of butyltin compounds in estuarine sediments. Chemosphere, 59: 585-592.
- BRYAN G.W., GIBBS P.E., BURT G.R., HUMMERSTONE L.G., 1987. The effects of tributyltin (TBT) accumulation on adult dog-whelks, *Nucella lapillus*. Long-term field and laboratory experiments. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 67: 525-544.

BRYAN G.W., GIBBS P.E., BURT G.R., 1988. A comparison of the effectiveness of tri-N-butyltin chloride and five other organotin compounds in promoting the development of imposex in the dog-whelk *Nucella lapillus*. J. Mar. Biol. Assoc. UK, 68: 733–744.

BRYAN G.W., LANGSTON W.J., HUMMERSTONE L.G., BURT G.R., 1985. A guide to assessment of heavy metal contamination in estuaries using biological indicators. Marine biological association United Kingdom Occ. Publ., 4: 1-92.

BUFFET P.E., TANKOUA O.F., PAN J.F., BERHANU D., HERRENKNECHT C., POIRIER L., AMIARD-TRIQUET C., AMIARD J.C., BÉRARD J.B., RISSO C., GUIBBOLINI M., ROMÉO M., REIP P., VALSAMI-JONES E., MOUNEYRAC C., 2011. Behavioral and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. Chemosphere, 84[1]: 166-174.

CACCIATORE F., BOSCOLO R., GIOVANARDI O., 2006a. Butyltin compounds in transplanted Manila clams (*Tapes philippinarum*) from the Lagoon of Venice as assessed by BTs/shell weight index. International Conference on Environmental and Biological Aspects of Main-Group Organometals (ICEBAMO), Book of Abstract, p. 72.

CACCIATORE F., BOSCOLO R., GIOVANARDI O., 2006b. Indici di decontaminazione da metalli pesanti per la vongola filippina *Tapes philippinarum*. Biol. Mar. Medit, 32-33.

CACCIATORE F., ANTONINI C., FORMALEWICZ M., GION C., NOVENTA S., BERTO D., BOSCOLO BRUSÀ R., MARIN M.G., 2015. Decreased BT levels and changes in imposex development in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) from the Northern Adriatic Sea. SETAC Europe 2015.

CACCIATORE F., NOVENTA S., ANTONINI A., FORMALEWICZ M., GION C., BERTO D., GABELLINI M., BOSCOLO BRUSÀ R., 2016. Imposex in *Nassarius nitidus* (Jeffreys, 1867) as a possible investigative tool to monitor butyltin contamination according to the Water Framework Directive: a case study in the Venice Lagoon (Italy)". Ecotoxicology and Environmental Safety, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.12.039.

CAMPILLO N., VINAS P., PENALVER R., CACHO J.I., HERNANDEZ-CORDOBA M., 2012. Solid-phase microextraction followed by gas chromatography for the speciation of organotin compounds in honey and wine samples: a comparison of atomic emission and mass spectrometry detectors. J Food Compos Anal, 25[1]: 66–73.

CARDELLICCHIO N., GIANDOMENICO S., DECATALDO A., DI LEO A., 2001. Speciation of butyltin compounds in marine sediments with headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 369: 510–515.

CARDWELL R. D., KEITHLY J. C., SIMMONDS J., 1999. Tributyltin in US market-bought seafood and assessment of human health risks. Human and Ecological Risk Assessment 5: 317-335.

CARICATO R., LIONETTO M.G., SCETTINO T., 2010. Seasonal variation of biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* sampled inside and outside Mar Piccolo of Taranto (Italy). *Chem. Ecol.*, 26: 143-153.

CARICCHIA A.M., CHIAVARINI S., CREMISINI C., MORABITO R., UBALDI C., 1993. Analytical methods for the determination of organotin in the marine-environment. *International journal of environmental analytical chemistry*, 53(1): 37-52.

CARVALHO P.N., PINTO L.F., BASTO M.C.P., VASCONCELOS M.T.S.D., 2007. Headspace solid-phase micro-extraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry method for butyltin analysis in sediments: Optimization and validation. *Microchemical Journal*, 87: 147–153.

CEULEMAN M., ADAMS F.C., 1995. Evaluation of sample preparation methods for organotin speciation analysis in sediments - focus on monobutyltin extraction. *Analytica Chimica Acta*, 317(1-3): 161-170.

CHAGOT D., ALZIEU C., SANJUAN J., GRIZEL H., 1990. Sublethal and histopathological effects of trace levels of tributyltin fluoride on adult oysters *Crassostrea gigas*. *Aquat living Resour*, 3: 121-130.

CHAMP M.A., 2000. A review of organotin strategies, pending actions, related coast and benefits. *The Science of Total Environment*, 258: 21-71.

CHAU Y.K., YANG F., BROWN M., 1995. Supercritical fluid extraction of butyltin compounds from sediment. *Analytica Chimica Acta*, 304: 85-89.

CHAU Y.K., YANG F., BROWN M., 1997. Evaluation of derivatization techniques for the analysis of organotin compounds in biological tissue. *Analytica Chimica Acta*, 338: 51-55.

CHIAVARINI S., MASSANISSO P., NICOLAI P., NOBILI C., MORABITO R., 2003 - Butyltins concentration levels and imposex occurrence in snails from the Sicilian coasts (Italy). *Chemosphere*, 50: 311-319.

CHOI M., MOON H.B., CHOI H.G., 2012. Intake and potential health risk of butyltin compounds from seafood consumption in Korea. *Arch Environ Contam Toxicol*, 62(2): 333–340.

CHOI M., MOON H.B., YU J., EOM J.Y., CHOI H.G., 2010. Temporal Trend of Butyltins in Seawater, Sediments, and Mussels from Busan Harbor of Korea Between 2002 and 2007: Tracking the Effectiveness of Tributyltin Regulation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58: 394–402.

CHOU C.C., LEE M.R., 2005. Determination of organotin compounds in water by headspace solid phase microextraction with gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1064: 1-8.

CICERO A.M., DI GIROLAMO I., 2001. Metodologie analitiche di riferimento del programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino costiero (triennio 2001-2003). Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, ICAM.

- CLARK K.E., GOBAS F.A.P.C., MACKAY D., 1990. Model of organic chemical uptake by fish from food and water. *Environ. Sci. Technol.*, 24 [8].
- CLARK E.A., STERRITT R.M., LESTER J.N., 1988. The fate of tributyltin in the aquatic environment. *Environmental Science and Technology*, 22: 600-604.
- COUCEIRO L., DIAZ J., ALBAINA N., BARREIRO R., IRABIEN J.A., RUIZ J.M., 2009. Imposex and gender-independent butyltin accumulation in the gastropod *Nassarius reticulatus* from the Cantabrian coast (N Atlantic Spain). *Chemosphere*, 76: 424.
- CRAVO A., BEBIANNO M., 2005. Bioaccumulation of metals in the soft tissue of *Patella aspera*: Application of metal/shell weight indices. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65: 571-586.
- CROSBY M.P., GALE L.D., 1990. A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *J. Shellfish Res.*, 91: 233-237.
- CRUZ A., CAETANO T., SUZUKI S., MENDO S., 2007. *Aeromonas veronii*, a tributyltin (TBT)-degrading bacterium isolated from an estuarine environment, Ria de Aveiro in Portugal. *Mar. Environ. Res.*, 64: 639-650.
- CRUZ A., OLIVEIRA V., BAPTISTA I., ALMEIDA A., CUNHA A., SUZUKI S., MENDO S., 2012. Effect of tributyltin (TBT) in the metabolic activity of TBT-Resistant and sensitive estuarine bacteria. *Environ. Toxicol.*, 27: 11-17.
- DAFFORN K.A., LEWIS J.A., JOHNSTON E.L., 2011. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 453-465.
- DAVENPORT J., CHEN X., 1987. A comparison of methods for the assessment of condition in the mussel (*Mytilus edulis* L.). *J. Molluscan. Stud.*, 53: 293-297.
- DE MORA S.J., PELLETIER E., 1997. Environmental tributyltin research: past, present, future. *Environmental Science and Technology*, 18: 1167-1177.
- DE SANTIAGO A., AGUILAR-SANTELISES M., 1999. Organotin compounds decrease in vitro survival, proliferation and differentiation of normal human B lymphocytes. *HUI12. Exp. Toxicol.* 18: 619-664.
- DE ZWANN A., CATTANI O., ISANI G., CORTESI P., 1991. Survival and anaerobic metabolism of the arcid clam *Scapharca inaequivalvis* under anoxia and oxia in the presence of sulphide and cyanide. In: Cellular defence strategies to hypoxia [ed. by Lutz P.L.]. Second IUB Satellite Symposium, Noordwijkerhout, Netherlands, Abst. p. 17.
- DELGADO A., USOBIAGA A., PRIETO A., ZULOAGA O., DE DIEGO A., MADARIAGA J.M., 2008. Optimisation of the headspace-solid phase microextraction for organomercury and organotin compound determination in sediment and biota. *Journal of Separation Science*, 31: 768-774.

DEPLEDGE M.H., FOSSI M.C., 1994. The role of biomarker in environmental assessment: invertebrates. *Ecotoxicology*, 3: 173-179.

DEPLEGE M.H., HOPKIN S.P., 1995. Methods to assess effects on brackish, estuarine and near-coastal water organism. In: *Scope 53 - Methods to assess the effects of Chemical on Ecosystems*. JohnWiley & Sons , 7: 125-149.

DEVOS C., VLIEGEN M., WILLAERT B., DAVID F., MOENS L., SANDRA P., 2005. Automated headspace-solid-phase micro extraction-retention time locked-isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of organotin compounds in water and sediment samples. *Journal of Chromatography A*, 1079: 408-414.

DÍEZ S., ABALOS M., BAYONA J.M., 2002. Organotin contamination in sediments from the western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. *Water Research*, 36: 905-918.

DIRKX W.M.R., LOBINSKI R., ADAMS F.C., 1994. Speciation analysis of organotin in water and sediments by gas chromatography with optical spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 286: 309-318.

DOWSON P.H., BUBB J.M., LESTER J.N., 1996. Persistence and degradation pathways of tributyltin in freshwater and estuarine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 42: 551-562.

DUBEY S.K., ROY U., 2003. Biodegradation of tributyltin by marine bacteria. *Applied Organometallic Chemistry*, 17: 3-8.

EBINGHAUS R., 1991. Aufnahme und Umwandlung von Quecksilber (II) und Methylquecksilberchlorid durch Schwebstoffbakterien und mikrobielle biofilme – Untersuchungen zum Spezies Verhalten de Quecksilbers in wäbrigen Systemen. Dissertation, Hamburg.

EERTMAN R.H.M., WAGENVOORT A.J., HUMMEL H., SMAAL A.C., 1993. "Survival in air" of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 170: 179-175.

EISLER R., 1979. Behavioural responses of marine poikilotherms to pollutants. *Phil. Trans r. Soc. London. B.*, 286: 507-521.

EPA, Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Tributyltin (TBT) – Draft. EPA-822-B-02-001, December 2002, 155 p.

EVANS S.M., 1999. Tributyltin Pollution: the Catastrophe that Never Happened. *Marine Pollution Bulletin*, 38(8): 629-636.

EVANS C.J., HILL R., 1983. Organotin-based antifouling system. *Reviews on Silicon, Germanium, Tin and Lead Compounds*, 7(1): 57-125

- EVANS S.M., LEKSONO T., MCKINNELL P.D., 1995. Tributyltin Pollution: a diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints. *Marine Pollution Bulletin*, 30(1): 14-21.
- FALOMO J., 2008. Sviluppo di metodiche innovative nel campo del biomonitoraggio ambientale, Ph.D tesi, Trieste University, Italy.
- FENT K., 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 26: 3-117.
- FENT K., 1996. Organotin in municipal wastewater and sewage sludge, ed. Champ M.A., Seligeman P.F., *Organotin Environmental Fate and Effects*, Chapman & Hall London, pp. 1-25.
- FERAL C., LEGALL S., 1983. The influence of a pollutant factor (tributyltin) on the neuroendocrine mechanism responsible for the occurrence of a penis in the females of *Ocenebra erinacea*. In: *Molluscan neuro-endocrinology*, Lever, J., Boer, H.(eds.). North Holland Publishing Co., Amsterdam, 173-175.
- FIORONI P., OEHLMANN J., STROBEN E., 1991. The pseudo-hermaphroditism of prosobranchs; morphological aspects. *Zool. Anz.*, 226: 1-26.
- FISHER H., 1983. Shell weight as an independent variable in relation to cadmium content of molluscs. *Marine Ecology Progress Series*, 12: 59-75.
- FISHER H., 1984. Cadmium body burden/shell weight index of mussels: a precise index for environmental monitoring. C.M. International Council for the Exploration of the Sea, CM-HCES/E, 41: 1-19.
- FISHER H., 1988. *Mytilus edulis* as a quantitative indicator of dissolved cadmium, Final study and synthesis. *Marine Ecology Progress Series*, 48: 163-174.
- FORSYTH D.S., WEBER D., CLEROUX C., 1992. Determination of butyltin, cyclohexyltin and phenyltin compounds in beers and wines. *Food Addit Contam.* 9(2): 161-169.
- FORSYTH D.S., SUN W.F., DALGLISH K., 1994. Survey of organotin compounds in blended wines. *Food Addit Contam.* 11(3): 343-350.
- FORTIBUONI T., NOVENTA S., RAMPAZZO F., GION C., FORMALEWICZ M., BERTO D., RAICEVICH S. 2013. Evidence of butyltin biomagnification along the northern Adriatic food-web (Mediterranean Sea) elucidated by stable isotope ratios. *Environmental Science and Technology*, 47: 3370-3377.
- FRANCOIS R., SHORT F.T., WEBER J.H., 1989. Accumulation and Persistence of tributyltin in eelgrass (*Zostera marina* L.) tissue. *Environmental Science Technology*, 23: 191-196.
- GABBOT P. A., WALKER A.J.M., 1971, Changes in the condition index and biochemical content of adult oyster (*Ostrea edulis* L.) maintained under hatchery conditions. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, 34: 99-106.

GABBOT P.A., STEPHENSON R.R., 1974. A note on the relationship between the dry weight condition index and the glycogen content of adult oyster (*Ostrea edulis* L.) kept in the laboratory. J. Cons. Int. Explor. Mer., 35: 359-361.

GADD G.M., 2000. Microbial interaction with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate, The Science of the Total Environment., 258 pp.119-127.

GE J.M., MADDOCK L., DAVEY J.T., 1977. The relationship between infestation by *Mytilicola intestinalis*, Steuer [Copepoda, Cyclopoidea] and the condition index of *Mytilus edulis* in South West England. J. Cons. Int. Explor. Mer., 37: 300-308.

GIBBS P.E., BRYAN G.W., 1996 - TBT-induced imposex in neogastropod snails: masculinization to mass extinction. In: MoraSJ [ed] Tributyltin: case study of an environmental contaminant. Cambridge Environmental Chemistry Series 8, Cambridge University Press, Cambridge, 212–236.

GIBBS P.E., BRYAN G.W., PASCOE P.L., 1987. The use of dog-whelk *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 67: 507-523.

GIBBS P.E., PASCOE P.L., BURT G.R., 1988. Sex change in the female dog-whelk, *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 68: 715–731.

GMELIN L., 1979. Handbuch der anorganischen Chemie, Zinnorganische Verbindungen, Teil 5, 6. Springer, Berlin

GOLDBERG E. D., 1986. TBT: An environmental dilemma. Environment, 28:17–44.

GOLDBERG E.D., BOWEN V.T., FARRINGTON J.W., HARVEY G., MARTIN J.H., PARKER P.L., RISENBROUGH R.W., ROBERTSON W., SCHNEIDER E., GAMBLE E., 1978. The mussel watch. Environmental Conservation, 5: 101-125.

GOMEZ-ARIZA J.L., MORALES E., BELTRAN R., GIRALDEZ I., RUIZ-BENITEZ M., 1995. Ultrasonic treatment of molluscan tissue for organotin speciation. Analyst, 120: 1171-1174.

GRACELI J.B., SENA G.C., LOPES P.F., ZAMPROGNO G.C., DA COSTA M.B., GODOI A.F., DOS SANTOS D.M., DE MARCHI M.R., DOS SANTOS FERNANDEZ M.A., 2013. Organotins: a review of their reproductive toxicity, biochemistry and environmental fate. Reprod Toxicol., 36: 40-52.

GRANBY K., SPLIID N.H., 1995. Hydrocarbons and organochlorines in common mussels from the Kattegat and the Belts and their relation to condition indices. Mar. Pollut. Bull., 30: 74–82.

GRÜN F., WATANABE H., ZAMANIAN Z., MAEDA L., ARIMA K., CUBACHA R., GARDINER D.M., KANNO J., IGUCHI T., BLUMBERG B., 2006. Endocrinedisrupting organotin

compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Molecular Endocrinology*, 20: 2141–55.

GUERIN T., SIROT V., VOLATIER J.L., LEBLANC J.C., 2007. Organotin levels in seafood and its implications for health risk in high-seafood consumers. *Science of the Total Environment*, 338(1–3): 66–77.

HARINO H., FUKUSHIMA M., TANAKA M., 1992. Simultaneous determination of butyltin and phenyltin compounds in the aquatic environment by gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 264(1): 91–96.

HEROULT J., BUENO M., POTIN-GAUTIER M., LESPEDES G., 2008. Organotin speciation in French brandies and wines by solid-phase microextraction and gas chromatography–pulsed flame photometric detection. *J Chromatogr A*, 1180(1–2): 122–130.

HEIDRICH, D.D., STEPHAN, S., KLINGMULLER, D., 2001. Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. *Steroids*, 66: 763-769.

HICKMAN R.W., ILLINGWORTH J., 1980. Condition cycle of green lipped mussel *Perna canaliculus*, in New Zealand. *Mar. Biol.*, 60: 27-38.

HOCH M., 2001. Organotin compounds in the environment, an overview. *Applied Geochemistry*, 16: 719-743.

HOCH M., SCHWESIG D., 2004. Parameters controlling the partitioning of tributyltin. *Applied Geochemistry*, 19: 323-334.

HOPKIN S.P., 1993. In situ biological monitoring of pollution in terrestrial and aquatic ecosystem. In: *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Science Publication London, Edinburgh, Boston. 397-427.

HOPKINS A.E., 1949. Determination of condition of oyster. *Science*, 110: 567-568.

HORIGUCHI T., SHIRAIISHI H., SHIMIZU M., MORITA M., 1994. Imposex and organotin compounds in *Thais clavigera* and *T. Bronni* in Japan. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 74: 651–669.

HORIGUCHI T., SHIRAIISHI H., SHIMIZU M., MORITA M., 1996. Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*. *Environ. Pollut.*, 95: 85–91.

HRS-BRENKO M., 1967. Index of condition in cultured mussels on the Adriatic coast. *Thalassia Jugosl.*, 3: 173-179.

HRUDEY S.E., CHEN W., ROUSSEAU C.G., 1996. *Bioavailability in Environmental Risk Assessment*. CRC Press, Lewis Publishers, Boca Raton.

HU J.Y., ZHEN H.J., WAN Y., GAO J.M., AN W., AN L.H., 2006. Trophic magnification of triphenyltin in a marine food web of Bohai Bay, north China: comparison to tributyltin. *Environ Sci Technol*, 40: 3142–7.

HU J., ZHANG Z., WEI Q., ZHEN H., ZHAO Y., PENG H., WAN Y., GIESY J.P., LI L., ZHANG, B., 2009. Malformations of the endangered Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, and its causal agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 9339–9344.

HUNGERFORD J.M., WALKER K.D., TORKELSON J.D., STEINBRECHER K., WEKELL M.M., 1990. Determination of tri-n-butyltin in oysters by reaction-gas chromatography of hydride derivatives. *Talanta*, 37(10): 975-979.

HWANG H.M., OH J. R., KAHNG S.-H., LEE K. W., 1999. Tributyltin compounds in mussels, oysters and sediments of Chinhae Bay, Korea. *Marine Environmental Research*, 47(1): 61-70.

ISPRA, 2009. "Uso sostenibile delle risorse rinnovabili ed impatto delle attività antropiche in Laguna di Venezia e nell'Alto Adriatico - Sintesi dei risultati delle principali ricerche condotte dal 2004 al 2008". Quaderno n. 3 della Struttura Tecnico-Scientifica (STS) dell'ISPRA di Chioggia.

IWATA H., TANABE S., MIYAZAKI N., TATSUKAWA R., 1994. Detection of butyltin compound residues in the blubber of marine mammals. *Mar Pollut Bull*, 28: 607-612.

IWATA H., TANABE S., MIZUNO T., TATSUKAWA R., 1995. High accumulation of toxic butyltins in marine mammals from Japanese coastal waters. *Environmental Science and Technology*, 29(12): 2959–2962.

IWATA H., TANABE S., MIZUNO T., TATSUKAWA R., 1997. Bioaccumulation of butyltin compounds in marine mammals: the specific tissue distribution and composition. *Appl. Organomet. Chem.*, 11, 257–264.

JACKSON J.A., BLAIR W.R., BRINCKMAN F.E., IVERSON W.P., 1982. Gas-chromatographic speciation of methylstannanes in the Chesapeake Bay using purge and trap sampling with a tin-selective detector. *Environmental Science and Technology*, 16: 110-119.

JENSEN H.F., HOLMER M., DAHLÖF I., 2004. Effects of tributyltin (TBT) on the seagrass *Ruppia maritima*. *Marine Pollution Bulletin*, 49(7–8): 564-573.

JIANG G.B., MAXWELL P.S., SIU K.W.M., LUONG V.T., BERMAN S.S., 1991. Determination of butyltins in mussel by gas chromatography with flame photometric detection using quartz surface-induced luminescence. *Analytical Chemistry*, 63(15): 1506–1509.

JOHANSEN K., MOHLENBERG F., 1987. Impairment of egg production in *Acartia tonsa* exposed to tributyltin oxide. *Ophelia*, 27: 137-141.

KANNAN K., FALANDYSZ J., 1997. Butyltin residues in sediment, fish, fish-eating birds, harbour porpoise and human tissue from the Polish coast of the Baltic Sea. *Mar Pollut Bull*, 34(3): 203–7.

KANNAN K., SENTHILKUMAR K., LOGANATHAN B.G., TAKAHASHI S., ODELL D.K., TANABE S., 1997. Elevated accumulation of tributyltin and its breakdown products in bottle-nosed

dolphins (*Tursiops-Truncatus*) found stranded along the US Atlantic and Gulf coasts. Environ. Sci. Technol., 31: 296-301.

KAPLAN E.L., MEIER P., 1958. Non parametric estimation from incomplete observation. J. Amer. Statist. Assoc., 53: 457-481.

KEITHLY J.C., CARDWELL R.D., HENDERSON G., 1997. Tributyltin in seafood from Asia, Australia, Europe, and North America. In: Harmful Effects of the Use of Antifouling Paints for Ships, Parametrix, Kirkland, Washington (Ed), 79-93.

KIM N.S., SHIM W.J., YIM U.H., HA S.Y., PARK P.S., 2008. Assessment of tributyltin contamination in a shipyard area using a mussel transplantation approach. Marine Pollution bulletin, 57(6-12): 883-888.

KRONE C.A., BROWN D.W., BURROWS D.G., BOGAR R.G., CHAN S.L., VARANASI U., 1989. A method for analysis of butyltin species and measurement of butyltins in sediment and English sole livers from Puget Sound. Marine Environmental Research, 27: 1-18.

KUBALLA J., WILKEN R.D., JANTZEN E., KWAN K.K., CHAU Y.K., 1995. Speciation and genotoxicity of butyltin compounds. Analyst, 120: 667-673.

KURE L.K., DEPLEDGE M.H., 1994. Accumulation of organotin in *Littorina littorea* and *Mya arenaria* from Danish coastal waters. Environ. Pollut., 84: 149-157.

LALÈRE B., SZPUNAR J., BUDZINSKI H., GARRIGUES P.H., DONARD O.F.X., 1995. Speciation analysis for organotin compounds in sediments by capillary gas chromatography with flame photometric detection after microwave-assisted acid leaching. Analyst, 120: 2665-2673.

LAM P.K.S., GRAY J.S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. Mar Pollut Bull., 46: 182-186.

LAMBROPOULOU D.A., KONSTANTINOOU I.K., ALBANIS T.A., 2007. Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices. Journal of Chromatography A, 1152: 70-96.

LANGSTON W.J., BURT G.R., ZHOU MINGJIANG, 1987. Tin and organotin in water, sediments, benthic organisms of Poole Harbour. Marine Pollution Bulletin, 18: 634-639.

LAUGHLIN R.B. Jr, FRENCH W., GUARD H.E., 1986. Accumulation of bis(tributyltin)oxide by the marine mussel *Mytilus edulis*. Environ. Sci. Technol., 20: 884-890.

LAWSON G., 1986. Organometallic compounds in polymers their interactions with the environment. In: Craig, P.J. (Ed.), Organometallic Compounds in the Environment. Principles and Reactions. Longman, London, 308-344.

LE GAC M., LESPES G., POTIN-GAUTIER M., 2003. Rapid determination of organotin compounds by headspace solid-phase microextraction, Journal of Chromatography A, 999: 123-134.

LEBLANC G.A., 1995. Trophic-level differences in the bioconcentration of chemicals: implications in assessing environmental biomagnification. *Environ. Sci. Technol.*, 29 (1): 154-160.

LEE C.C., HSIEH C.Y., TIEN C.J., 2006. Factors influencing organotin distribution in different marine environmental compartments, and their potential health risk. *Chemosphere*, 65: 547–559.

LEE R.F., VALKIRS A.O., SELIGMAN P.F., 1989. Importance of microalgae in the biodegradation of tributyltin in estuarine waters. *Environmental Science and Technology*, 23: 1515-1518.

LEPPER P., 2002. Towards the derivation of quality standards for priority substances in the context of the Water Framework Directive. Preparatory work for the European Commission. Report from the Fraunhofer—Institute Molecular Biology and Applied Ecology, 124 pp.

LEVINE S.N., RUDNICK D.T., KELLY J.R., MORTON R.D., BUTTEL L.A., CARR K.A., 1990. Pollutant dynamics as influenced by seagrass beds: experiments with tributyltin in *Thalassia* microcosms. *Marine Environmental Research*, 30: 297–322.

LIMA D., REIS-HENRIQUES M.A., SILVA R., SANTOS A.I., COSTA CASTRO L.F., SANTOS M.M., 2011. Tributyltin-induced imposex in marine gastropods involves tissue-specific modulation of the retinoid X receptor, *Aquatic Toxicology*, 101(1): 221-227.

LISCIO C., DI CARRO M., MAGI E., 2009. Comparison of two analytical methods for the determination of organotin compounds in marine organisms. *Comptes Rendus Chimie*, 12: 831-840.

LIU J.Y., JIANG G.B., 2002. Survey on the presence of butyltin compounds in Chinese alcoholic beverages, determined by using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-flame photometric detection. *J Agric Food Chem*, 50(23): 6683–6687.

LIU Y., LÓPEZ-AVILA M., ALCARAZ M., BECKERT W.F., 1994. Off-line complexation/supercritical fluid extraction and gas chromatography with atomic emission detection for the determination and speciation of organotin compounds in soils and sediments. *Analytical Chemistry*, 66: 3788-3796.

LIU R., ZHOU J.L., WILDING A., 2004. Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments. *Journal of Chromatography A*, 1038: 19-26.

LIU T., LI S., LIU S., LV G., 2011. Optimization of supercritical fluid extraction/headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry method for determining organotin compounds in clam samples. *Journal of Food Process Engineering*, 34(4): 1125–1143.

- LUAN T.G., JIN J., CHAN S.M.N., WONG Y.S., TAM N.F.Y., 2006. Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. *Process Biochemistry*, 41: 1560-1565.
- MADHUSREE B., TANABE S., OZTGRK A.A., TATSUKAWA R., MIYAZAKI N., OZDAMAR E., 1997. Contamination of butyltin compounds in the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) from the Black Sea. *Fresenius J Anal Chem*, 359: 244-8.
- MAGGI C., AUSILI A., BOSCOLO R., CACCIATORE F., BONOMETTO A., CORNELLO M., BERTO D., 2012. Sediment and biota in trend monitoring of contaminants in transitional waters. *Trends in Analytical Chemistry*, 36: 82-91.
- MAGUIRE R.J., 1984. Butyltin compounds and inorganic tin in sediments in Ontario (Canada). *Environmental Science and Technology*, 18(4): 291-294.
- MAGUIRE R.J., TKACZ R.J., 1985. Degradation of the tri-n-butyltin species in water and sediment from Toronto Harbor. *J. Agric. Food Chem.*, 33: 947-953.
- MANN R., GLOMB S. J., 1978. The effect of temperature of growth and ammonia excretion of the Manila clam *Tapes japonica*. *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, 6: 335-339.
- MARAN C., CENTANNI E., PELLIZZATO F., PAVONI B., 2006. Organochlorine compounds (polychlorinated biphenyls and pesticides) and polycyclic aromatic hydrocarbons in populations of *Hexaplex trunculus* affected by Imposex in the Lagoon of Venice, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 486-495.
- MARIGOMEZ I., IRELAND M.P., 1990. A laboratory study of cadmium exposure in *Littorina littorea* in relation to environmental cadmium and exposure time. *The Science of the Total Environment*, 90: 75-87.
- MARIN M.G., MOSCHINO V., DEPPIERI M., LUCCHETTA L., 2003. Variations in gross biochemical composition, energy value and condition index of *T. philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquaculture*, 219: 859-871.
- MARTIN N., ICHIKAWA G., GOETZL J., DE LOS REYES M., STEPHENSON M. D., 1984. Relationships between physiological stress and trace toxic substances in the bay mussel, *Mytilus edulis* from San Francisco Bay, California. *Marine Environmental Research*, 11: 91-110.
- MARTÍN P., SÁNCHEZ P., RAMÓN M., 1995. Population structure and exploitation of *Bolinus brandaris* (Mollusca: Gastropoda) of the Catalan Coast (North-western Mediterranean). *Fish. Res.*, 23: 319-331.
- MATHIESSEN P., GIBBS P.E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine destruction in molluscs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 37-43.
- MATTHIESSEN P., REYNOLDSON T., BILLINGHURST Z., BRASSARD D.W., CAMERON P., CHANDLER G.T., DAVIES, I.M., HORIGUCHI T., MOUNT D.R., OEHLMANN J., POTTINGER T.G., SIBLEY P.K., THOMPSON H.M., VETHAAK A.D., 1999. Field assessment of

endocrine disruption in invertebrates. In: Endocrine Disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing and Assessment. DeFur, P.L., Crane, M., Ingersoll, C. and Tattersfield, L. (eds.). SETAC Technical Publication, Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, Florida, pp. 303.

McCARTHY F., SHUGART L.R., 1990. Biomarker of environmental contamination. Lewis Publisher, Chelsea, MI, USA, pp. 457.

MEADOR J., 2011. Organotins in Aquatic Biota - Occurrence in Tissue and Toxicological Significance. In: Environmental Contaminants in Biota: Interpreting Tissue Concentrations. Beyer W.N e Meador J.P. (ed). Taylor and Francis, Boca Raton, FL., pp. 751.

MERCIER A., PELLETIER E., HAMEL J.E., 1994. Metabolism and subtle toxic effects of butyltin compounds in starfish. *Aquat. Toxicol.* 28: 259-273.

MICHEL P., AVERTY B., 1999. Contamination of French coastal waters by organotin compounds: 1997 update. *Marine Pollution Bulletin*, 38(4): 268-275.

MILLÁN E., PAWLISZYN J., 2000. Determination of butyltin species in water and sediment by solid-phase microextraction-gas chromatography-flame ionization detection, *Journal of Chromatography A*, 873: 63-71.

MOLANDER S., DAHL B., BLANCK H., JONSSON J., SJÖSTRÖM M., 1992. Combined effects of tri-n-butyl tin (TBT) and diuron on marine periphyton communities detected as pollution-induced community tolerance. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 22: 419-427.

MORABITO R., 2001. Metodo per la determinazione di composti organostannici in sedimenti e matrici biologiche tramite GC-MS e GC-FPD. In: Cicero, A.M., Di Girolamo, I. (Eds.), Metodologie analitiche di riferimento del programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino costiero (triennio 2001-2003). Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, ICRAM, Appendice I.

MORABITO R., CHIAVARINI S., CREMISINI C., 1995. Speciation of organotin compounds in environmental samples by GC-MS. In: Quevauviller, P., Maier, E.A., Griepink, B. (Eds.), *Quality Assurance for Environmental Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 17: 435-464.

MORCILLO Y., ALABALAT A., PORTE C., 1999. Mussels as sentinels of organotin pollution: bioaccumulation and effects on P450-mediated aromatase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18: 1203-1208.

MORCILLO Y., PORTE C., 1998. Monitoring of organotin compounds and their effects in marine molluscs. *Trends in Analytical Chemistry*, 77(2): 109-116.

MORCILLO Y., PORTE C., 2000. Evidence of endocrine disruption in calms - *Ruditapes decussata* - transplanted to a tributyltin-polluted environment. *Environmental Pollution*, 107: 47-52.

- MORCILLO Y., RONIS M.J.J., PORTE C., 1998. Effects of tributyltin on the Phase I testosterone metabolism and steroid titres of the clam *Ruditapes decussata*. *Aquatic Toxicology*, 42: 1-13.
- MURAI R., SUGIMOTO A., TANABE S., TAKEUCHI I., 2008. Biomagnification profiles of tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) in Japanese coastal food webs elucidated by stable nitrogen isotope ratios. *Chemosphere*, 73: 1749-56.
- NAKAYAMA K., OSHIMA Y., YAMAGUCHI T., TSURUDA Y., KANG I.J., KOBAYASHI M., IMADA N., HONJO T., 2004. Fertilization success and sexual behavior in male medaka, *Oryzias latipes*, exposed to tributyltin. *Chemosphere*, 55(10): 1331-1337.
- NAGASE M., KONDO H., HASEBE K., 1995. Determination of tributyltin and triphenyltin compounds in hair and fish using a hydrolysis technique and gas chromatography with flame photometric detection. *Analyst*, 120: 1923-1926.
- NIPPER M.G., ROPER D.S., WILLIAMS E.K., MARTIN M.L., VANDAM L.F., MILLS G.N. 1998. Sediment toxicity and benthic communities in mildly contaminated mudflats. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 502-510.
- NIRMALA K., OSHIMA Y., LEE R., IMADA N., HONJO T., KOBAYASHI K., 1999. Transgenerational toxicity of tributyltin and its combined effects with polychlorinated biphenyls on reproductive processes in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 717-721.
- NISHIKAWA J., MAMIYA S., KANAYAMA T., NISHIKAWA T., SHIRAIISHI F., HORIGUCHI T., 2004. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotin in gastropods. *Environ Sci Technol*, 38: 6271-6276.
- NISHIKAWA J., 2006. Imposex in marine gastropods may be caused by binding of organotin to retinoid X receptor. *Mar Biol*, 149: 117-124.
- NOVENTA S., BARBARO J., FORMALEWICZ M., GION C., RAMPAZZO F., BOSCOLO BRUSÀ R., GABELLINI M., BERTO D., 2015. A fast and effective routine method based on HS-SPME-GC-MS/MS for the analysis of organotin compounds in biota samples. *Analytica Chimica Acta*, 858: 66-73.
- NOWELL L.H., CAPEL P.D., DILEANIS P.D., 1999. Pesticides in stream sediment and aquatic biota-Distribution, trends, and governing factors: Boca Raton, Fla., Lewis Publishers, pp. 1001.
- OEHLMANN J., SCHULTE-OEHLMANN U., 2003. Endocrine disruption in invertebrates. *Pure Appl Chem.*, 75: 2207-2218.
- OEHLMANN J., SCHULTE-OEHLMANN U., TILLMANN M., MARKERT B., 2000. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology*, 9: 383-397.
- OEHLMANN J., STROBEN E., FIORONI P., 1996. New facts about TBT-induced imposex in prosobranchs: general aspects. *Macaol. Rev. Suppl. - Molluscan Reproduction*, 6: 149-155.

OKAMOTO K. 1991. Biological Reference Materials for Metal Speciation. National Institute for Environmental Studies Fish Tissue Reference Material for Organotin Compounds Biological Trace Element Research, [ACS Symposium Series], 445(20): 257-264.

OKUMUŞ I., STIRLING H. P. 1998. Seasonal variations in the meat weight, condition index and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L.) in suspended culture in two Scottish sea lochs. *Aquaculture*, 159: 249-261.

OLLA B.L., PEARSON W.H., STUDHOLME A.L., 1980. Applicability of behavioral measures in environmental stress assessment. *Int Explor Mer.*, 179: 162–173.

PAGE D.S., GILFILLAN E.S., HANSON S.A., HOTHAM J.R., FOSTER J.C., 1984. Correlation of body burden of heavy metals with physiological stress indicators in *Mytilus edulis* and *Mya arenaria* exposed to heavy metals in the field. *Mar. Environ. Res.*, 14 : 505.

PAGE D.S., OZBAL C.C., LANPHEAR M.E., 1996. Concentration of butyltin species in sediments associated with shipyard activity. *Environmental Pollution*, 91(2): 237-243.

PAGLIARANI A., NESCI S., VENTRELLA V., 2013. Toxicity of organotin compounds: Shared and unshared biochemical targets and mechanisms in animal cells. *Toxicology in Vitro*, 27: 978–990.

PANG F.Y., NG Y.L., PHANG S.M., TONG S.L., 1993. Determination of total tin and tributyltin in biological tissues. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 53(1): 53-61.

PAZOS A. J., ROMÀN G., ACOSTA C. P., ABAD, M. E SÀNCHEZ J. L., 1997. Seasonal changes in condition and biochemical composition of the scallop *Pecten maximus* L. from suspended culture in the Ria de Arousa (Galicia, N.W. Spain) in relation to environmental conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79: 19-37.

PEARSON W.H., WOODRUFF D.L., SUGARMAN P.C., OLLA B.L., 1981. Effects of Oiled Sediment on Predation on the Littleneck Clam, *Protothaca staminea*, by the Dungeness Crab, *Cancer magister*. *Estuarine, Coastal and Shelf Sci.*, 13: 445-454.

PESSOA M.F., FERNANDO A., OLIVEIRA J.S., 2001 - Use of imposex (pseudohermaphroditism) as indicator of the occurrence of organotin compounds in Portuguese coastal waters— Sado and Mira estuaries. *Environmental Toxicology*, 16(3): 234-241.

PETERSEN, S., GUSTAVSON, K., 2000. Direct toxic effects of TBT on natural enclosed phytoplankton at ambient TBT concentrations of coastal waters. *Ecotoxicology*, 9: 273–285.

PHERNAMBUQ A.J.W., VROONLAND C.S., 1983. A comparison of four indexes of condition of the european flat oyster (*Ostrea edulis* L.). *Inte. Coun. Explor. Sea C.M.* 1983/F3, pp. 11.

- QUEVAUVILLER P., CHIAVARINI S., CREMISINI C., MORABITO R., BIANCHI M., MUNTAU H., 1995. Preparation and homogeneity study of a mussel candidate reference material for the certification of organotin compounds. *Mikrochimica Acta*, 120: 281-287.
- QUNFANG Z., GUIBIN J., ZHONGYANG L., LINA L., CHUNGANG Y., YONGNING W., 2004. Survey of butyltin compounds in 12 types of foods collected in China. *Food Addit Contam*, 21(12): 1162-1167.
- RAMÓN M., AMOR M.J., 2001 - Increasing Imposex in populations of *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) in the north-western Mediterranean. *Marine Environmental Research*, 52: 463-475.
- RANDALL L., WEBER J.H. 1986. Adsorptive behavior of butyltin compounds under stimulated estuarine conditions. *Science of Total Environment*, 57: 191-203.
- RANKE J., JASTORFF B., 2000. Multidimensional risk analysis of antifouling biocides. *Environmental Science and Pollution Research*, 7(2): 105-114.
- RANTAKOKKO P., KUNINGAS T., SAASTAMOINEN K., VARTIAINEN T., 2006. Dietary intake of organotin compounds in Finland: a marketbasket study. *Food Addit Contam*, 23(8): 749-756.
- RATO M., FERREIRA N., SANTOS J., BARROSO C., 2009. Temporal evolution of imposex in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast: the efficacy of EC regulation 782/2003. *J. Environ. Monit.*, 11: 100-107.
- REES H.L., WALDOCK R., MATTHIESSEN P., PENDLE M.A., 2001. Improvements in the epifauna of the Crouch Estuary (UK) following the decline in TBT concentrations. *Marine Pollution Bulletin*, 42(2): 137-144
- REGOLI L., CHAN H.M., DE LAFONTAINE Y., MIKAEIAN I., 2001 - Organotins in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and sediments of the Quebec City harbour area of the St. Lawrence River, *Aquat. Toxicol.*, 53: 115-126.
- REINFELDER J.R., FISHER N.S., LUOMA S.N., NICHOLS J.W., WANG W.X., 1998. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: A critique of the Kinetic model approach. *Sci. Total. Environ.*, 219: 117-135.
- RELINI G., 1977. Le metodologie per lo studio del fouling nell'indagine di alcuni ecosistemi marini, *Bollettino di Zoologia*, 44: 97-112.
- RISTICEVIC S., LORD H., GÓRECKI T., ARTHUR C.L., PAWLISZYN J., 2010. Protocol for solid-phase microextraction method development. *Nature Protocols*, 5: 122-139.
- RODRÍGUEZ E.M., MEDESANI D.A., FINGERMAN M., 2007. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: a review. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.*, 146: 661-671.

- ROPER J.M., SIMMERS J.W., CHERRY D.S., 2001. Bioaccumulation of butyltins in *Dreissena polymorpha* at a confined placement facility in Buffalo, New York. *Environ. Poll.*, 111: 447-452.
- RUIZ J.M., BARREIRO R., GONZÁLEZ J.J., 2005. Biomonitoring organotin pollution with gastropods and mussels. *MEPS*, 287: 169-176.
- RURANGWA E., BIEGNIIEWSKA A., SLOMINSKA E., SKORKOWSKI E.F., OLLEVIER F., 2002. Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: A biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 131(3): 335-344.
- SANTOS M.M., ENES P., REIS-HENRIQUES M.A., KUBALLA J., CASTRO L.F.C., VIEIRA M.N., 2009. Organotin levels in seafood from Portuguese markets and the risk for consumers. *Chemosphere*, 75: 661-666.
- SANTOS M.M., FILIPE L.C., VIEIRA M.N., MICAEL J., MORABITO R., MASSANISSO P., REIS-HENRIQUES M.A., 2005 - New insights into the mechanism of imposex induction in the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 141C: 101-109.
- SANTOS M.M., REIS-HENRIQUES M.A., VIEIRA M.N., SOLÉ M., 2006. Triphenyltin and tributyltin, single and in combination, promote imposex in the gastropod *Bolinus brandaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64: 155-162.
- SARGIAN P., PELLETIER E., MOSTAJIR B., FERREYRA G.A., DEMERS S., 2005. TBT toxicity on a natural planktonic assemblage exposed to enhanced ultraviolet-B radiation, *Aquatic Toxicology*, 73: 299-314.
- SARRANDIN P.M., 1993. Reparation et evolution du tributylétain dans le sediments marine. PhD Thesis, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau, France.
- SASAKI K., ISHIZAKA T., SUZUKI T., SAITO Y., 1988. Determination of tri-n-butyltin and di-n-butyltin compounds in fish by gas chromatography with flame photometric detection. *J Assoc Off Anal Chem.*, 71(2): 360-3.
- SCHER, 2006. Scientific committee on health and environmental risks (SCHER). Revised assessment of the risks to health and the environment associated with the use of the four organotin compounds TBT, DBT, DOT and TPT. Health and Consumer Protection Directorate. Opinion adopted by the SCHER during the 14th plenary of 30 November 2006. European Commission, EC.
- SCHULTE-OEHLMANN U., TILLMANN M., MARKERT B., OEHLMANN J., WATERMANN B., SCHERF S., 2000. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the Laboratory. Part II: triphenyltin as a xeno-androgen. *Ecotoxicology*, 9: 399-412.
- SELIGMAN P.F., VALKIRS A.O., LEE R.F., 1986. Degradation of tributyltin in San Diego bay, CA waters, Draft Report, Naval Ocean Systems Centre, San Diego, CA, 7 pp.

SELIGMAN P.F., VALKIRS A.O., STANG P.M., LEE R.F., 1988. Evidence for rapid degradation of tributyltin in marina. *Marine Pollution Bulletin*, 19: 531-534.

SERRA H., NOGUEIRA J.M.F., 2005. Organotin speciation in environmental matrices by automated on-line hydride generation-programmed temperature vaporization-capillary gas chromatography-mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1094: 130-137.

SKINNER H.A., 1964. The strengths of metal-to-carbon bonds. *Advances in Organometallic Chemistry*, 2: 39-114.

SHIM W.J., KAHNG S.H., HONG S.H., KIM N.S., KIM S.K., SHIM J.H., 2000. Imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, as evidence of organotin contamination in the marine environment of Korea. *Mar. Environ. Res.*, 49: 435-451.

SHIMASAKI Y., KITANO T., OSHIMA Y., INOUE S., IMADA N., HONJO T., 2003. Tributyltin causes masculinization in fish. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22: 141 - 144.

SHUMWAY S.E., SCOTT T.M., SHICK M.J., 1983. The effects of anoxia and hydrogen sulphide on survival, activity and metabolic rate in the coot clam, *Mulina lateralis* [Say]. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 71: 135-146.

SIDHARTHAN M., YOUNG K.S., WOUL L.H., SOON P.K., SHIN H.W., 2002. TBT toxicity on the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Mar Pollut Bull.*, 45(1-12): 177-80.

SIGOVINI M., MASIERO E., FRANGIPANE G., ZANON V., TAGLIAPIETRA D., 2006. Crescita dimensionale e ponderale in una popolazione di *Nassarius nitidus* nella laguna di Venezia. Poster presentato al 37° congresso Società Italiana di Biologia Marina (S.I.B.M.).

SMALL A.C., VAN STRALEN M.R., 1990. Average annual growth and condition of mussels as a function of food source. *Hydrobiologia*, 195: 179-188.

SMITH B.S., 1971. Sexuality in the American mud snail, *Nassarius obsoletus*: abnormalities in the reproductive system. *J. moll. Stud.*, 46: 247-256.

SMITH B.S., 1981A. Male characteristics in female *Nassarius obsoletus*: variation related to locality, season and year. *Veliger*, 23: 212-216.

SMITH B.S., 1981B. Reproductive anomalies in stenoglossan snails related to pollution from marinas. *Journal of Applied Toxicology*, 1: 15-21.

SMITH B.S., 1981C. Reproductive anomalies in stenoglossan snails related to pollution from marinas. *Journal of Applied Toxicology*, 1: 15-21.

SMITH B.S., 1981D. Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails. *Nassarius obsoletus*, *Ilyanassa obsoleta*. *Journal of Applied Toxicology*, 3: 141-144.

SMITH R., BOLAM S.G., REES H.L., MASON C., 2008. Macrofaunal recovery following TBT ban. *Environmental Monitoring Assessment*, 136: 245-256.

SOLÉ M., MORCILLO Y., PORTE C., 1998. Imposex in the commercial snail *Bolinus brandaris* in the northwestern Mediterranean. *Environ. Pollut.*, 99: 241–246.

SOLÉ M., 2000. Effects of tributyltin on the MFO system of the clam *Ruditapes decussata*: a laboratory and field approach. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 125(1): 93-101.

SOTO M., IRELAND M.P., MARIGÒMEZ I., 2000. Changes in mussel biometry on exposure to metals: implications in estimation of metal bioavailability in 'Mussel-Watch' programmes. *The Science of the Total Environment*, 247: 175–187.

SOUSA A., MATSUDAIRA C., TAKAHASHI S., TANABE S., BARROSO C., 2007. Integrative assessment of organotin contamination in a southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal): tracking temporal trends in order to evaluate the effectiveness of the EU ban. *Marine Pollution Bulletin*, 54(2007): 1645-1653.

SOUSA A.C.A., PASTORINHO, M.R., TAKAHASHI S., TANABE S., 2014. History on organotin compounds, from snails to humans. *Environmental Chemistry Letters*, 12(1): 117-137.

SOUSA A.C.A., OLIVEIRA I.B., LARANJEIRO F., TAKAHASHI S., TANABE S., M.R. CUNHA, C.M. BARROSO, 2012. Organotin levels in Nazaré canyon (west Iberian Margin, NE Atlantic) and adjacent coastal area. *Marine Pollution Bulletin*, 64: 422–426.

STÄB J.A., BRINKMAN U.A.T., COFINO W.P., 1994. Validation of the analysis of organotin compounds in biological tissues using alkylation and gas chromatography. *Applied Organometallic Chemistry*, 8: 577–585.

STÄB J.A., COFINO W.P., VAN-HATTUM B., BRINKMAN U.A.T., 1993. Comparison of GC-MSD and GC-AES for the determination of organotin compounds in the environment. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 347(6-7): 247-255.

STÄB J.A., FRENAY M., FRERIKS I.L., BRINKMAN U.A.T., COFINO W.P., 1995. Survey of nine organotin compounds in the Netherlands using the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) as biomonitor. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14: 2023–2029.

STANG P.M., SELIGMAN P.F., 1986. Distribution and fate of butyltin compounds in the sediments of San Diego bay. In *Proceeding of Ocean'86*, 4: 1256-1261.

STANGE D., SIERATOWICZ A., OEHLMANN J., 2012. Imposex development in *Nucella lapillus* – evidence for the involvement of retinoid X receptor and androgen signalling pathways in vivo. *Aquatic Toxicology*, 106: 20–24.

STERNBERG R.M., HOTCHKISS A.K., LEBLANC G.A., 2008. Synchronized expression of the retinoid X receptor mRNA with reproductive tract recrudescence in an imposex-susceptible mollusc. *Environ Sci Technol*, 42: 1345-1351.

STERNBERG R.M, GOODING M.P., HOTCHKISS A.K., LEBLANC G.A., 2010. Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology*, 19(1):4-23.

STEWART C., DE MORA S.J., 1990. A review of the degradation of tri(n-butyl)tin in the marine environment. *Environmental Technology*, 11: 567-570.

STEWART C., THOMPSON J.A.J., 1994. Extensive butyltin contamination in southwestern coastal British Columbia, Canada. *Marine Pollution Bulletin*, 28(10): 601-606.

STORE K.B., STOREY J.M., 1990. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Quart. Rev. Biol.*, 65: 145-174.

STRAND J., JACOBSEN J.A., 2005. Accumulation and trophic transfer of organotins in a marine food web from the Danish coastal waters. *Sci. Total Environ.*, 350: 72-85.

STROBEN E., OEHLMANN J., FIORONI P., 1992. *Hinia reticulata* and *Nucella lapillus*. Comparison of two gastropods tributyltin bioindicators. *Marine Biology*, 114: 289-296.

SULLIVAN J.J., TORKELESON J.D., WEKELL M.M., HOLLINGWORTH T.A., SAXTON W.L., MILLER G.A., PANARO K.W., UHLER A.D., 1988. Determination of tri-n-butyltin and di-n-butyltin in fish as hydride derivatives by reaction gas chromatography. *Analytical Chemistry*, 60(7): 626-630

SUZUKI T., MATSUDA R., SAITO Y., YAMADA H., 1994. Application of helium microwave-induced plasma emission detection system to analysis of organotin compounds in biological samples. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42: 216-220.

TANABE S., 1999. Butyltin contamination in marine mammals - a review. *Mar. Pollut. Bull.*, 39: 62-72.

TANABE S., PRUDENTE M., MIZUNO T., HASEGAWA J., IWATA H., MIYAZAKI N., 1998. Butyltin contamination in marine mammals from North Pacific and Asian coastal waters. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 193-198.

TAKAHASHI S., TANABE S., TAKEUKI I., MIYAZAKI N., 1999. Distribution and specific bioaccumulation of butyltin compounds in a marine ecosystem. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37: 50-61.

TERLIZZI A., FRASCHETTI S., GIANGUZZA P., FAIMALI M., BOERO F., 2001. Environmental impact of antifouling technologies: state of art and perspectives. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 11: 311-317.

TERLIZZI A., GERACI S., GIBBS P.E., 1999a. Tributyltin (TBT)-induced imposex in the Neogastropod *Hexaplex trunculus* in Italian coastal waters morphological aspects and ecological implications. *Italian Journal of Zoology*, 66: 141-146.

TERLIZZI A., GERACI S., MINGANTI V., 1999b. Tributyltin (TBT) pollution in the coastal waters of Italy as indicated by imposex in *Hexaplex trunculus*. *Marine Pollution Bulletin*, 36(9): 749-752.

THOMAS R.E., HARRIS P.M., RICE S.D., 1999. Survival in air of *Mytilus trossulus* following long-term exposure to spilled Exxon Valdez crude oil in Prince William Sound. *Comparative biochemistry and physiology*, 122(1): 147-52.

THURSBY G.B., HARLIN M.M., 1984. Interaction of leaves and roots of *Ruppia maritima* in the uptake of phosphate, ammonia and nitrate. *Marine Biology*, 83: 61–67.

TILLMANN M., SCHULTE-OEHLMANN U., DUFT M., MARKERT B., OEHLMANN J., 2001. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails [Mollusca: Gastropoda] in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozoline as antiandrogens. *Ecotoxicology*, 10: 373-388.

TITLEY-O'NEAL C.P., MUNKITTRICK K.R., MACDONALD B.A., 2011. The effects of organotin on female gastropods. *J. Environ. Monit.*, 13: 2360-2388.

TONG S.L., PANG F.Y., PHANG S.M., LAI H.C., 1996. Tributyltin distribution in the coastal environment of Peninsular Malaysia. *Environmental Pollution*, 91(2): 209-216.

TORRES E., CID A., HERRERO C., ABALDE J., 2000. Effect of cadmium on growth, ATP content, carbon fixation and ultrastructure in the marine diatom *Phaeodactylum tricarnutum* Bohlin. *Water, Air and Soil Pollution*, 117: 1–14.

TUTSCHKU S., SCHANTZ M.M., WISE S.A., 2002. Determination of methylmercury and butyltin compounds in marine biota and sediments using microwave-assisted acid extraction, solid-phase microextraction, and gas chromatography with microwave-induced plasma atomic emission spectrometric detection. *Analytical Chemistry*, 74: 4694-4701.

UENO S., SUSAN N., FURUKAWA Y., KOMATSU Y., KOYAMA S., SUZUKI T., 1999. Butyltin and phenyltin compounds in some marine fishery products on the Japanese market. *Arch Environ Health*, 54(1): 20–25.

UHLER A.D., DURELL G.S., SPELLACY A.M., 1991. Extraction procedure for the measurement of butyltin compounds in biological tissues using toluene, HBr, and tropolone. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(2): 217-221.

UHLER A.D., DURELL G.S., STEINHAEUER W.G., SPELLACY A.M. 1993. Tributyltin levels in bivalve mollusks from the east and west coast of the United States: results from the 1988-1990 national status and trends mussel watch project. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(1): 139-153.

U.S. Environmental Protection Agency, 1995. Great Lakes Water Quality Initiative Technical Support Document for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. EPA-820-B-95-005. U.S. Environmental Protection Agency, Office of water, Washington, DC.

U.S. Environmental Protection Agency, 2000, Bioaccumulation testing and interpretation for the purpose of sediment quality assessment. February 2000; EPA 823-R-00-001.

VALLI G., MAZZOLINI D., RAIMONDI V., 1995. Ciclo riproduttivo e biometria in *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) dell'alto Adriatico durante un ciclo annuale. *Hydrores*, 15: 41-53.

VELDHUIZEN-TSOERKAN M.B., HOLWERDA D.A., ZANDEE D.I., 1991. Anoxic survival time and metabolic parameters as stress indices in sea mussels exposed to cadmium or polychlorinated biphenyls. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 20: 259-265.

VIARENGO A., CANESI L., PERTICA M., MANCINELLI G., ACCOMANDO R., SMAAL A.C., 1995. Stress on stress response: A simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. *Mar. Env. Res.*, 39(1-4): 245-248.

WADE T.L., GARCIA-ROMERO B., BROOKS J.M., 1988. Tributyltin contamination of bivalves from U.S. coastal estuaries. *Environmental Science and Technology*, 22: 1488-1493.

WADE T.L., GARCIA-ROMERO B., BROOKS J.M., 1990. Butyltins in sediments and bivalves from U.S. coastal areas. *Chemosphere*, 20: 647-662.

WALDOCK M.J., THAIN J.E., SMITH D., MILTON S., 1990. The degradation of TBT in estuarine sediments. *Proc. 3rd Int. Organotin Symp.*, Monaco, 46-49.

WALNE P. R., MANN R., 1975. Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. In, *Proc. Ninth Europ. Mar. Biol. Symp.*, edited by H. Barnes, Aberdeen University Press, Aberdeen, 587-607.

WALNE P.R., 1970. The seasonal variation of meat and glycogen content of seven population of oyster *Ostrea edulis* L. and a review of the literature. *Fish. Invest. Ser. II Mar. Fish. G.B. Minist. Agric. Fish. Food*, 26-35.

WALNE P.R., 1976. Experiments on the culture in the sea of the Butterfish *Venerupis decussata* L. *Aquaculture*, 8: 371-381.

WATANABE N., SAKAI S., TAKATSUKI H., 1992. Examination for the degradation path of butyltin compounds in natural waters. *Water Science and Technology*, 25(11): 117-124.

WATANABE N., SAKAI S., TAKATSUKI H., 1995. Release and degradation half lives of tributyltin in sediment. *Chemosphere*, 31: 2809-2816.

WEIDENHAUPT A., ARNOLD C., MÜLLER S.R., HADERLEIN S.B., SCHWARZENBACH R.P., 1997. Sorption of organotin biocides to mineral surfaces. *Environmental Science and Technology*, 31(9): 2603-2609.

WEIDENHAUPT A., 1995. Trialkylzinnverbindungen: Spezierung im Oktanol/Wasser-System, Sorption an Mineraloberflächen. PhD Thesis, ETH Zürich, Nr 10940.

WHALEN M.M., LOGANATHAN B.G., KANNAN K., 1999. Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells in vitro. *Environ. Res.*, 81: 108-116.

- WIDDOWS J., DONKIN P., 1989 - The application of combined tissue residue chemistry and physiological measurements of mussels (*Mytilus edulis*) for the assessment of environmental pollution. *Hydrobiologia*, 188/189: 455-461.
- WILKEN R.D., 1994. Quecksilber spezies und deren metabolismus in der Umwelt. Habilitationsschrift [Postdoctoral thesis].
- WONG P.T.S., WHITTLE D.M., CHAU Y.K., BROWN M., 1994. Butyltin compounds in Severn Sound, Lake Huron, Canada. *Applied Organometallic Chemistry*, 8(4): 385-391.
- YANG J., MIYAZAKI N., 2006. Transplacental transfer of butyltins to fetus of Dall's porpoises (*Phocoenoides dalli*). *Chemosphere*, 63: 716-721.
- YI A.X., LEUNG K.M.Y., LAM M.H.W., LEE J.S., GIESY J.P., 2012. Review of measured concentrations of triphenyltin compounds in marine ecosystems and meta-analysis of their risks to humans and the environment. *Chemosphere*, 89(9): 1015-1025.
- ZANON F., RADO N., CENTANNI E., ZHAROVA N., PAVONI B., 2009. Time trend of butyl- and phenyl-tin contamination in organisms of the Lagoon of Venice (1999-2003). *Environmental monitoring and assessment*, 52(1-4): 35-45.
- ZHANG S., CHAU Y.K., LI W.C., CHAU A.S.Y., 1991. Evaluation of extraction techniques for butyltin compounds in sediment. *Applied Organometallic Chemistry*, 5: 431-434.
- ZHANG Z., HU J., ZHEN H., WU X., HUANG C., 2008. Reproductive inhibition and transgenerational toxicity of triphenyltin on medaka (*Oryzias latipes*) at environmentally relevant levels. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 8133-8139.
- ZHANG Z., HU J., ZHEN H., WU X., HUANG C., 2008. Reproductive inhibition and transgenerational toxicity of triphenyltin on medaka (*Oryzias latipes*) at environmentally relevant levels. *Environ. Sci. Technol.*, 42: 8133-8139.
- ZUCKERMAN J.J., REISDORF R.P., ELLIS H.V., WILKINSON R.R., 1978. Organotins in biology and the environment. In: Brinckman, F.E., Bellama, J.M. (Eds.), *Organometals and Organometalloids Occurrence and Fate in the Environment*, Am. Chem. Soc. No 82, Washington DC, ACS Symp., 388-422.

RIFERIMENTI LEGISLATIVI

European Council Directive (76/769/EEC) of 27 July 1976 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations. Official Journal L 262, 201. 27/9/1976.

European Council Directive (89/677/EEC) of 21 December 1989 amending for the eighth time Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the member states relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations. Official Journal L 398. 30/12/1989.

European Commission Directive (1999/51/EC) of 26 May 1999 adapting to technical progress for the fifth time Annex I to Council Directive 76/769/EEC on the approximations of the laws, regulations, and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (tin, PCP and cadmium). Official Journal L 142. 05/06/1999.

European Commission Directive (2002/62/EC) of 9 July 2002 adapting to technical progress for the ninth time Annex I to Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (organostannic compounds). Official Journal L 183/58. 12/7/2002.

European Parliament and Council Regulation (No. 782/2003) of 4 November 2003 on the prohibition of the use of organotin compounds on ships. Official Journal L 115/1. 9/5/2003.

IMO (International Maritime Organisation), 2001. International convention on the control of harmful antifouling systems on ships. International Maritime Organisation, London UK.

European Parliament and Council Directive (2000/60/EC) of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal L 327/1. 22/12/2000.

European Parliament and of the Council Decision (No. 2455/2001/EC) of the of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. Official Journal L 3. 15/12/2001.

European Parliament and of the Council Directive (2008/105/EC) of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. Official Journal L 348/84. 24/12/2008.

European Parliament and of the Council Directive (2008/56/EC) of 17 June 2008 establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive). Official Journal L 164/19. 25/6/2008.

European Commission Decision (2010/477/EU) of 1 September 2010 on criteria and methodological standards on good environmental status of marine waters. Official Journal L 232/14. 2/9/2010.

Decreto Ministeriale 29 luglio 1994. Attuazione delle direttive CEE numeri 89/677, 91/173, 91/338 e 91/339 recanti, rispettivamente, l'ottava, la nona, la decima e l'undicesima modifica della direttiva CEE n. 76/769 per il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati membri relative alle restrizioni in materia di immissione sul mercato e di uso di talune sostanze e preparati pericolosi, ai sensi dell'art. 27 della legge 22 febbraio 1994, n. 146 (Gazzetta ufficiale 13 settembre 1994, n. 214 e 10 dicembre 1994, n. 288, suppl. ord.).

Decreto Ministeriale 13 dicembre 1999 (D.M. 13-12-1999/1999). Recepimento delle direttive 99/43/CE recanti modifiche alla direttiva 76/769/CEE del Consiglio del 27 luglio 1976 relativa alle restrizioni in materia di immissione sul mercato e di uso di talune sostanze e preparati pericolosi (Gazzetta ufficiale n. 67 del 21/03/2000)

Decreto del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (260/2010) del 8 novembre 2010. Regolamento recante i criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali, per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del medesimo decreto legislativo (Gazzetta ufficiale n. 30 del 7/2/2011).

