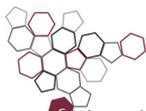
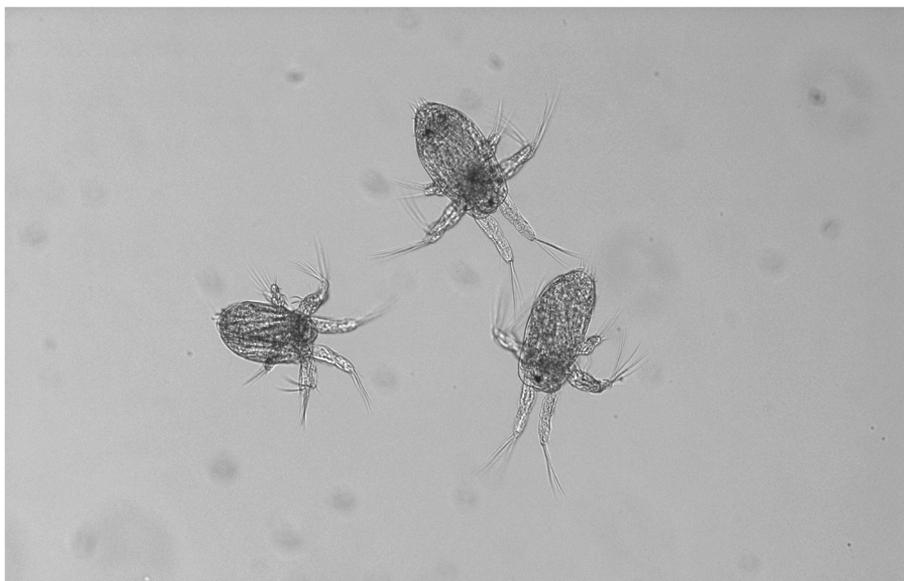




ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



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



**SAGGIO SUBCRONICO DI INIBIZIONE
DELLA MOBILITÀ NAUPLIARE A 7 GIORNI
CON IL COPEPODE CALANOIDE
PLANCTONICO *ACARTIA TONSA*
(DANA, 1848)**

QUADERNI DI ECOTOSSICOLOGIA

RICERCA MARINA

**SAGGIO SUBCRONICO DI INIBIZIONE
DELLA MOBILITÀ NAUPLIARE A 7 GIORNI
CON IL COPEPODE CALANOIDE
PLANCTONICO *ACARTIA TONSA*
(DANA, 1848)**

QUADERNI DI ECOTOSSICOLOGIA

Informazioni legali

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

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

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

Via Vitaliano Brancati, 48 - 00144 Roma

www.isprambiente.gov.it

ISPRA, Quaderni – Ricerca Marina 17/2022

ISBN 978-88-448-1109-9

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

Grafica di copertina:

Alessia Marinelli - ISPRA – Area Comunicazione Uff. Grafica

Foto di copertina: Valentina Vitiello, Isabella Buttino

ISPRA – CN-COS - Sezione sperimentale per la valutazione del rischio ecologico in aree marino costiere

Coordinamento pubblicazione online:

Daria Mazzella

ISPRA – Area Comunicazione

MAGGIO 2022

Autori:

Isabella BUTTINO (ISPRA, CN-COS)
Valentina VITIELLO (ISPRA, CN-COS)
Simona MACCHIA (ISPRA, CN-COS)
David PELLEGRINI (ISPRA, CN-COS)

Prima della pubblicazione il presente Quaderno è stato revisionato da esperti del settore appartenenti a laboratori pubblici e privati del territorio nazionale, in particolare:

Donatella Palazzi, Federica Savorelli e Cristina Zanzi (Arpae Emilia-Romagna)
Marco Cecchi e Nunzia Melchiorre (ARPA Liguria)
Donatella Franchi (ARPA Lazio)
Teresa Rosaria Verde (Arpa Campania)
Gisella Marino (ARPA Sicilia)
Alessia Cuccaro, Matteo Oliva (Consorzio per il Centro Interuniversitario di Biologia Marina ed Ecologia Applicata "G. Bacci" di Livorno)
Linda Prato (CNR IRSA Taranto)
Elisa Costa e Veronica Piazza (CNR IAS)
Monia Renzi (Università di Trieste)
Daniele Troiano (Chelab S.r.l.)
Fabrizio Perin (Consula Ambiente S.a.S.)
Martina Lorenzetto (Agrolab Italia Srl)

Il presente Quaderno è stato inoltre condiviso con i rappresentanti delle Agenzie per la protezione dell'ambiente delle Regioni costiere che partecipano al GdL SNPA in collegamento con il D.M. n. 173/2016.

Da citare come:

Buttino I., Vitiello V., Macchia S., Pellegrini D. (2022). Saggio subcronico di inibizione della mobilità naupliare a 7 giorni con il copepode calanoide planctonico *Acartia tonsa* (Dana, 1848). Quaderni di Ecotossicologia. ISPRA, Quaderni - Ricerca Marina n. 17/22

INDICE

PRESENTAZIONE	6
PREMESSA	7
INTRODUZIONE	8
1. SPECIE TEST	9
1.1 Biologia ed ecologia della specie	9
1.1.1 <i>Morfologia ed organizzazione strutturale dei copepodi</i>	9
1.1.2 <i>Distribuzione e habitat di Acartia tonsa</i>	14
1.1.3 <i>Abitudini alimentari</i>	14
1.1.4 <i>Riproduzione e sviluppo embrionale</i>	14
1.2 Utilizzo di <i>Acartia tonsa</i> in ecotossicologia	17
1.3 Campionamento e sorting degli organismi	18
1.4 Allevamento di <i>Acartia tonsa</i> in laboratorio	18
2. MATRICI AMBIENTALI E SOSTANZE TOSSICHE DA TESTARE	22
3. SOLUZIONI, STRUMENTAZIONE E MATERIALI	25
3.1 Acqua	25
3.2 Soluzioni	25
3.3 Strumentazione	25
3.4 Materiali	25
4. PROTOCOLLO METODOLOGICO	28
4.1 Allestimento del test	28
4.1.1 <i>Saggio con campioni ambientali</i>	28
4.1.2 <i>Test con sostanze chimiche o preparati</i>	28
4.1.3 <i>Prova con composto chimico di riferimento</i>	29
4.2 Fasi preparatorie	31
4.2.1 <i>Pianificazione della prova</i>	31
4.2.2 <i>Colture algali</i>	31
4.2.3 <i>Raccolta delle uova</i>	32
4.3 Preparazione soluzioni test	36

4.3.1 <i>Saggio con campioni ambientali</i>	36
4.3.2 <i>Test con sostanze chimiche o preparati</i>	38
4.3.3 <i>Prova con composto chimico di riferimento</i>	38
4.4 Pre-incubazione	38
4.5 Incubazione	40
4.6 Cambio delle soluzioni	40
4.7 Parametri da monitorare	41
4.8 Termine del saggio	41
4.9 Interpretazione e validità dei risultati	42
4.10 Elaborazione dei dati	42
4.11 Parametri di validazione del saggio	43
5. BIBLIOGRAFIA	44
APPENDICE 1 - Panoramica sulle condizioni di allevamento reperite in letteratura	53

PRESENTAZIONE

di Maurizio Ferla (Centro Nazionale Coste)

L'utilizzo delle analisi ecotossicologiche quale specifica "linea di evidenza" per la valutazione degli effetti sugli organismi viventi dovuti all'eventuale presenza di agenti inquinanti nelle matrici naturali, ha determinato un progressivo inserimento dei saggi ecotossicologici nel contesto normativo nazionale.

Al fine di garantire una maggiore confrontabilità dei risultati è necessario poter disporre di protocolli metodologici standardizzati che assicurino, unitamente alla significatività scientifica, una elevata rappresentatività ambientale e una efficace manualità esecutiva. Questa ultima condizione assume particolare rilievo nella conduzione di prove a lungo termine atte a rilevare effetti cronici, sub-cronici o sub-letali, laddove l'aspetto della manualità può introdurre maggiori variabili.

ISPRA, con la collaborazione dell'intero SNPA e delle migliori esperienze scientifiche nazionali, ha promosso la pubblicazione del presente Quaderno di Ecotossicologia, avendo come riferimento le attuali normative di settore, ed in particolare a quelle relative ai saggi biologici indicati dall'Allegato tecnico al DM173/2016, e comunque con la finalità di offrire un documento aggiornato per l'esecuzione dei saggi biologici sui sedimenti marini costieri e sulle matrici da essi derivate.

Inoltre, al fine di ottimizzare la fruibilità e la chiarezza del testo e in analogia a quanto fatto per altre pubblicazioni ISPRA della stessa serie editoriale, il presente Quaderno è stato reso disponibile alla revisione di esperti del settore appartenenti a laboratori pubblici e privati del territorio nazionale.

PREMESSA

Il protocollo per il saggio biologico subcronico di inibizione della mobilità naupliare con il copepode calanoide planctonico *Acartia tonsa* trattato nel presente Quaderno è una variante del protocollo UNICHIM M.U. 2366 (2012a) e deriva dalle competenze e dalle esperienze maturate prevalentemente dal gruppo tecnico-scientifico della “Sezione per la valutazione del rischio ecologico in ambienti marino-costieri” di ISPRA Livorno. Il protocollo metodologico UNICHIM M.U. 2366 (2012a) è stato infatti modificato per renderlo di più semplice esecuzione, prevedendo l'utilizzo di sistemi filtranti per il trasferimento rapido di uova e/o nauplii durante le fasi di cambio delle soluzioni e di lettura del test. Filtri di questo tipo allestiti utilizzando falcon da 50 ml, già impiegati per la filtrazione e la selezione di uova e nauplii, sono stati adottati anche per l'allestimento di questo test su suggerimento del Consorzio per il Centro Interuniversitario di Biologia Marina ed Ecologia Applicata “G. Bacci” di Livorno (CIBM).

Il saggio subcronico di inibizione della mobilità naupliare è previsto dall'Allegato Tecnico del DM n. 173 del 15 luglio 2016 “Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini” in alternativa ad altri saggi ecotossicologici come terza tipologia, da eseguire su fase liquida. Il presente Quaderno di Ecotossicologia contiene informazioni metodologiche e operative utili per l'applicazione del saggio subcronico di inibizione della mobilità naupliare, incluso suggerimenti e indicazioni applicative ed operative, aggiornate sulla base di recenti studi e pubblicazioni scientifiche riguardanti l'allevamento ed il mantenimento del copepode *A. tonsa*, nonché alcuni specifici approfondimenti tecnico-scientifici legati all'allestimento delle colture algali necessarie per l'alimentazione di *A. tonsa*.

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

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

INTRODUZIONE

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

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

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

Negli ultimi anni sono stati messi a punto nuovi protocolli che utilizzano il copepode *A. tonsa* per la determinazione degli effetti tossici cronici di sostanze chimiche con esposizioni prolungate (ISO 16778, 2015; Buttino et al., 2018, Picone et al., 2018, Buttino et al., 2019).

Nel presente volume viene trattata la metodologia di esecuzione del saggio biologico subcronico di inibizione della mobilità naupliare o della mortalità con il copepode calanoide planctonico *A. tonsa*. Il metodo descritto è una variante del protocollo UNICHIM M.U. 2366 (2012a) e prevede l'incubazione di embrioni di *A. tonsa* a differenti concentrazioni, o diluizioni, di un tossico o di un campione naturale, e la determinazione della percentuale di inibizione della mobilità dei nauplii dopo 7 giorni di incubazione.

1. SPECIE TEST

1.1 - Biologia ed ecologia della specie

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

1.1.1 - Morfologia ed organizzazione strutturale dei copepodi

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

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

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

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

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

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

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

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

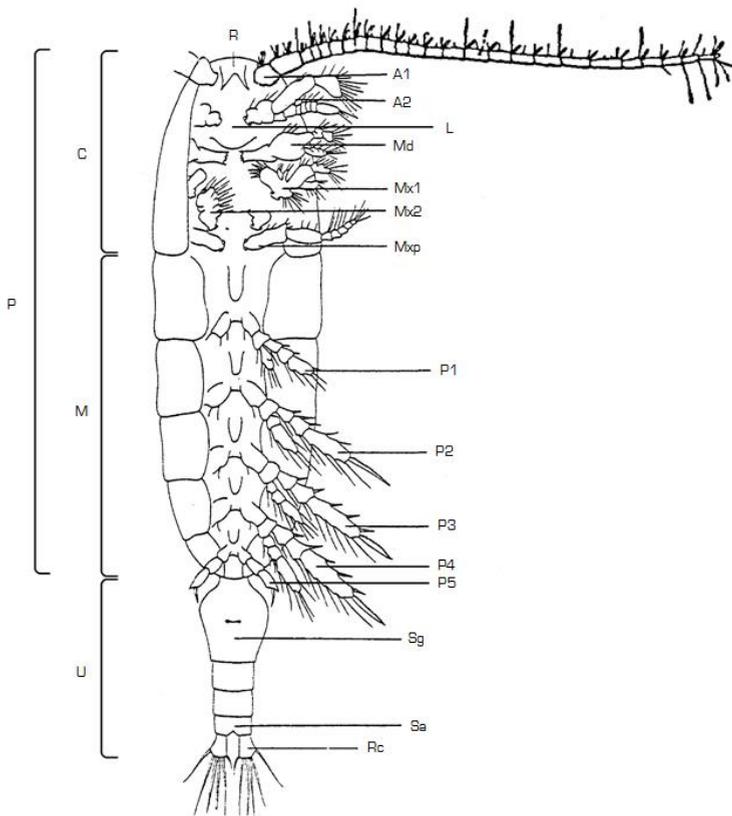


Figura 1: Morfologia esterna di copepode calanoide. P, prosoma; C, cefalosoma o testa; M, metasoma o segmenti toracici; U, urosoma o segmenti addominali; R, rostro; A1, prima antenna; A2, seconda antenna; L, labrum; Md, mandibola; Mx1, maxilla 1; Mx2, maxilla 2; Mxp, massillipede; P1-P5, pereopodi natatori;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

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

È possibile differenziare un individuo adulto di sesso femminile da uno maschile principalmente per lo sviluppo del I segmento genitale dell'addome e dal V piede. Nel maschio l'ultima appendice natatoria è modificata per l'accoppiamento (costituisce l'organo copulatore). In Figura 3 sono riportati il V piede di un individuo maschile (M) e di una femmina (F). Il primo segmento dell'urosoma risulta più grande e prolungato rispetto a quello del maschio, a questo seguono altri 3 segmenti (Fig. 4b-e e Fig. 4i-l). L'urosoma è

costituito da 5 segmenti, il secondo dei quali risulta tondeggiante e munito di spinule dorso laterali.

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

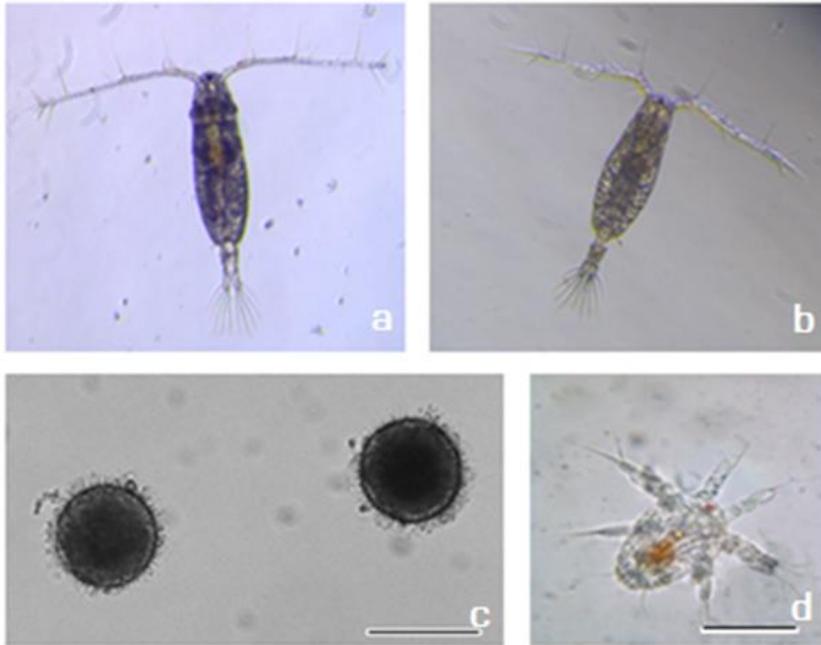


Figura 2: *Acartia tonsa*: a) femmina adulta; b) maschio adulto c) uova/embrioni; d) nauplio (a,b ingrandimento 40x; c,d bar= 80µm).



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

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

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

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

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

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

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

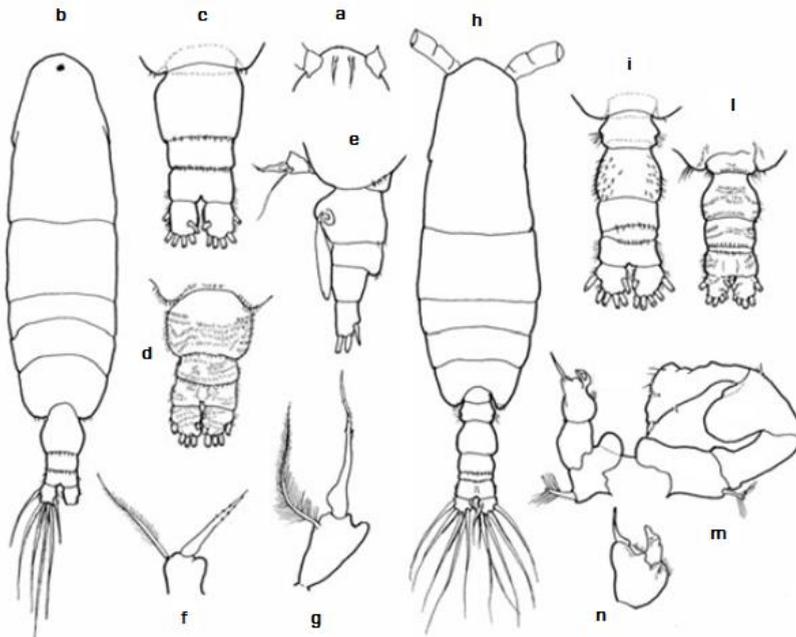


Figura 4: Caratteristiche morfologiche distintive di individui maschili e femminili di *A. tonsa*: a, filamenti rostrali in entrambi i sessi. Femmina [b-g]: b, individuo intero [visione dorsale]; c-d, urosoma [visione dorsale]; e, urosoma con spermatofora [visione laterale sinistra]; f-g, quinto piede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

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

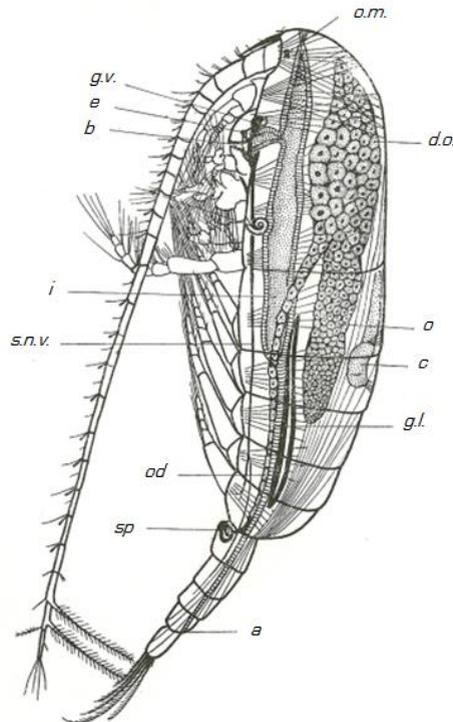


Figura 5: Anatomia di copepode calanoide femmina (visione laterale). a: ano; b: bocca; c: cuore; d.o.: diverticolo ovarico; e: esofago; g.l.: goccia lipidica; g.v.: ganglio ventrale; i: intestino; o: ovaio; od: ovidotto; o.m.: occhio mediano; s.n.v.: sistema nervoso ventrale; sp: spermateca (da Marshall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

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

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

raccolte in sacchi ovigeri, in alcune specie di copepodi sia planctoniche che bentoniche. Indipendentemente dall'accoppiamento, le femmine possono produrre un grandissimo numero di uova, tuttavia queste possono essere fecondate solo se la femmina ha ricevuto lo spermatozoo. In alcune specie un unico accoppiamento può essere sufficiente affinché le femmine producano uova fertili per un lungo periodo di tempo (come per la specie *A. tonsa*); per altre specie sono invece necessari accoppiamenti ripetuti. Per i dettagli circa la riproduzione e lo sviluppo si veda il Paragrafo 1.1.4.

1.1.2 - Distribuzione e habitat di *Acartia tonsa*

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

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

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

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

1.1.3 - Abitudini alimentari

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

1.1.4 - Riproduzione e sviluppo embrionale

Il ciclo vitale e lo sviluppo di *A. tonsa* sono tipici della maggior parte dei copepodi calanoidi. Nel caso del ceppo Mediterraneo le uova fecondate, di forma sferica e con un diametro di circa 70 - 80 μm , sono *subitaneae*, cioè schiudono in meno di 48 h a 25 °C. Popolazioni di *A. tonsa* di aree geografiche diverse dal Mediterraneo (Oceano Atlantico e Mar Baltico) possono produrre due ulteriori tipologie di uova: *quiescenti* o di *diapausa*, a seconda dei tempi di schiusa e delle condizioni ambientali (Zillioux and Gonzalez, 1972; Castro-Longoria, 2001; Drillet et al., 2008a). Finora tali tipologie non sono state segnalate per il ceppo Mediterraneo di *A. tonsa*, né in condizione naturali né di allevamento (BOX 1). Un ritardo nella schiusa delle uova può essere indotto artificialmente mantenendo gli embrioni a basse temperature (4 °C); ciò consente di conservarli in uno stato quiescente per diversi

mesi e quindi di utilizzarli in tempi successivi alla deposizione. Questa pratica può essere utile qualora sia necessario inviare gli embrioni presso altri laboratori per effettuare test ecotossicologici o avviare nuove colture [Hansen et al., 2016; Vitiello et al., 2016].

BOX 1 - Tipologie di uova nei copepodi

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

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

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

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

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

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

La percentuale di schiusa delle uova (vitalità delle uova) dipende, oltre che dalla fertilità, dalla qualità delle alghe somministrate agli adulti [Ianora et al., 2004; Zhang et al., 2013]. Come per la maggior parte dei copepodi calanoidi, anche per *A. tonsa* lo sviluppo larvale è indiretto e consiste in 6 successivi stadi naupliari (NI - NVI), seguiti da 5 stadi di copepodite (CI - CV), fino al raggiungimento dello stadio di adulto (Fig. 6).

La durata dello sviluppo e la vita media degli individui adulti variano in funzione della latitudine e della temperatura. A temperature comprese tra 15 °C e 20 °C lo sviluppo di *A. tonsa* da nauplio a copepodite dura mediamente 5 - 6 giorni. Lo stadio adulto viene raggiunto dopo 12 - 20 giorni dalla schiusa delle uova, a seconda della temperatura e della densità di popolazione [Invidia et al., 2004; UNICHIM, 2012a, 2012b; Zhang et al., 2015]. La schiusa delle uova dà origine ad un primo stadio larvale (nauplio I) di dimensioni simili alle uova (Fig. 6) e morfologicamente molto diverso dall'adulto. Il nauplio non ha segmentazione: il primo stadio (NI) ha forma triangolare, un occhio mediano, due paia di antenne, la mandibola e un solo paio di spine nell'armatura caudale e non è in grado di

nutrirsi. Maxillule, maxilla e massillipedi si formeranno durante le successive fasi di sviluppo naupliare (II-VI), caratterizzati dall'aumento del numero di appendici natatorie e dall'aumento delle dimensioni, pur mantenendo una forma triangolare [Fig. 6]. I successivi stadi naupliari (II-VI) mantengono la forma triangolare e sono caratterizzati dall'aumento del numero di appendici natatorie e dall'aumento delle dimensioni.

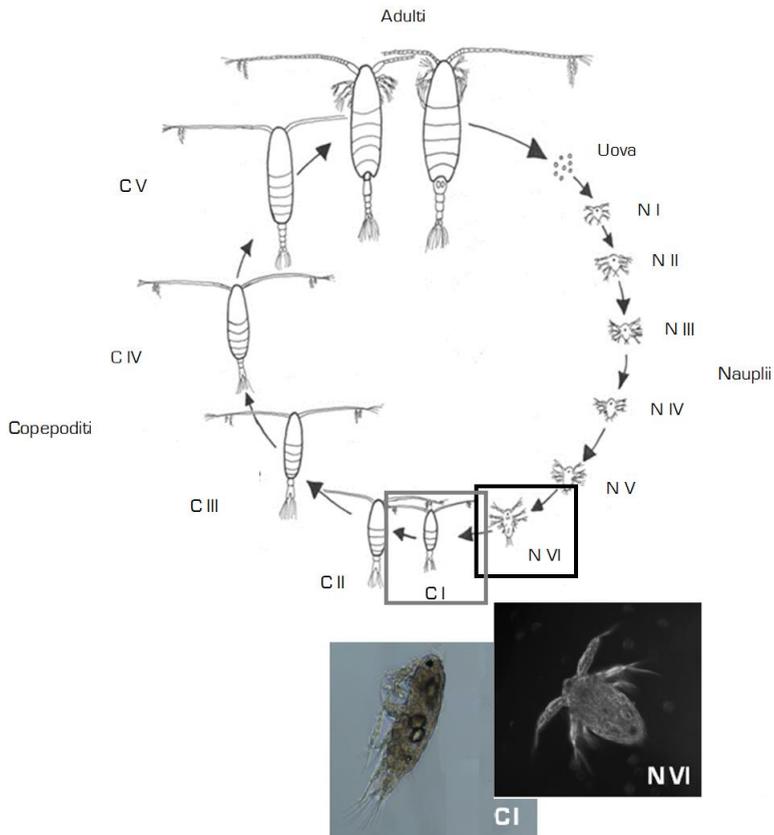


Figura 6: Ciclo vitale di *A. tonsa*. Le fotografie mostrano lo stadio naupliare VI (NVI, X 46) e copepodite I (CI, X 42,6) [da Alver et al., 2011, mod.].

Dopo i primi 6 stadi naupliari iniziano le 5 fasi di copepodite (I - V) durante le quali i copepodi assumono le caratteristiche morfologiche tipiche dell'adulto. Negli stadi di copepodite appare più chiara la distinzione tra i vari metameri e le appendici, che sono i caratteri che permettono la differenziazione tra i vari stadi. Negli ultimi stadi di copepodite, inoltre, iniziano ad essere visibili le caratteristiche distintive dei due sessi. Con il passaggio dall'ultimo stadio di copepodite a quello di adulto si ha lo sviluppo definitivo di tutte le appendici. Il VI stadio di copepodite rappresenta l'adulto.

Individui sessualmente maturi possono essere riconosciuti dalla presenza del V piede modificato e da una antenna genicolata, nel maschio, e dalla dimensione del I segmento genitale nella femmina.

1.2 - Utilizzo di *Acartia tonsa* in ecotossicologia

Il copepode *A. tonsa* è stato proposto per i test di tossicità e gli studi sull'inquinamento marino a partire dal 1977 [Lee W., 1977], sia in Europa che negli Stati Uniti, rientrando tra le specie indicate dalla International Organization for Standardization per l'esecuzione di saggi tossicologici applicati agli ambienti marini e salmastri (ISO 14669, 1999).

Successivamente alla pubblicazione del metodo ISO 14669 (1999), che prevede l'utilizzo di individui adulti o al V stadio di copepodite, Andersen et al. (2001) e Wollenberger et al. (2003) hanno proposto l'esposizione di uova per saggi di tossicità cronica allo scopo di valutare la sopravvivenza degli stadi larvali, poiché più sensibili degli adulti alle sostanze inquinanti.

Gorbi et al. (2012) hanno proposto un saggio acuto (a 24 e 48 h) ed uno subcronico (a 7 giorni) a partire dalla esposizione delle uova di *A. tonsa* ed una procedura standardizzata per l'allevamento in laboratorio. Le metodologie riportate da Gorbi e collaboratori sono state recepite da UNICHIM con i Metodi M.U. 2365 (UNICHIM, 2012b) e M.U. 2366 (UNICHIM, 2012a), rispettivamente per il saggio acuto e per il saggio subcronico. In seguito con il Decreto Direttoriale del 3 febbraio 2014 del Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare, il metodo per il saggio acuto è stato inserito nell'elenco di saggi da utilizzare per la valutazione della idoneità all'impiego in mare di prodotti disperdenti/adsorbenti da utilizzare per la bonifica da inquinamento da idrocarburi (Savorelli et al., 2006).

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

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

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

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

L'uso di *A. tonsa* come organismo modello è favorito dal fatto che questa specie è reperibile tutto l'anno, con abbondanze particolarmente elevate da marzo/aprile a ottobre/novembre in Alto Adriatico (Sei et al., 1996; Comaschi et al., 2000). Inoltre, gli studi sulla biologia ed i protocolli di allevamento in laboratorio sono oramai ben consolidati e permettono di disporre di questo organismo durante tutto l'anno.

1.3 - Campionamento e sorting degli organismi

Per il campionamento dello zooplancton è necessaria un'imbarcazione equipaggiata con un retino da plancton, generalmente di 200 μm di maglia (tipo VWP2). Lo zooplancton raccolto nel collettore di vetro o plastica posto alla base del retino viene poi trasportato in laboratorio entro 1 - 2 h dalla raccolta, in contenitori refrigerati in cui la temperatura dell'acqua è mantenuta simile a quella del luogo di raccolta. Appena giunti in laboratorio si procede alla separazione delle specie (*sorting*).

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

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

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

1.4 - Allevamento di *Acartia tonsa* in laboratorio

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

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

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

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

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

I protocolli ISO 14669 (1999) e ISO 16778 (2015) prevedono la possibilità di utilizzare anche acqua di mare sintetica; per le modalità di preparazione dell'acqua di mare sintetica è possibile fare riferimento al protocollo ISO 16778 (2015) e i protocolli UNICHIM per i saggi acuto e subcronico di inibizione della mobilità naupliare con *A. tonsa* (UNICHIM, 2012a e 2012b).

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

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

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

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

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

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

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

In tabella 1 è riportato un quadro riepilogativo delle principali condizioni per l'allevamento di *A. tonsa*, mentre nell'Appendice 1 si riporta una più approfondita panoramica sulle condizioni di allevamento reperite in letteratura per questa specie.

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

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

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

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

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

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

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

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

Per un quadro, comunque non esaustivo, delle differenti diete e metodologie di allevamento reperite in bibliografia si può consultare la Tabella 5 dell'Appendice 1.

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

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

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

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

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

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

2. MATRICI AMBIENTALI E SOSTANZE TOSSICHE DA TESTARE

Le matrici ambientali che possono essere valutate sulla base del presente protocollo sono:

- campioni liquidi ambientali marini o salmastri, tal quali (colonna d'acqua) o derivati da sedimenti (acqua interstiziale, elutriati, estratti),
- sostanze chimiche solubili nelle condizioni di prova oppure che possono essere mantenute in sospensione o dispersione stabile nelle condizioni di prova.

Nel caso di prove condotte su effluenti o campioni liquidi ambientali tal quali è necessario analizzare i campioni prima possibile, preferibilmente entro 12 h dal campionamento. Qualora non fosse possibile rispettare questi tempi, i campioni possono essere mantenuti tra $0 \div 4$ °C ed utilizzati entro 72 h.

Se la prova non può essere eseguita entro le 72 h, il campione può essere congelato a temperatura minore di -18 °C per essere utilizzato entro 2 mesi dal prelievo. Il congelamento al di sotto dei -18 °C secondo la norma ISO 5667-10 (2020) consente in generale un aumento dei tempi di conservazione, non alterando in modo significativo le caratteristiche dei nutrienti (fosfati, nitrati, silicati e nitriti) della fase liquida (Clementson and Wayte, 1992; Segura-Noguera et al., 2011). I periodi massimi di conservazione variano, a seconda della stabilità del campione, da alcune settimane fino a 2 mesi (ISO 5667-16, 2017).

Nel caso di campioni ambientali con salinità non compatibile con il range indicato, il protocollo UNICHIM M.U. 2366 (2012a) riporta che, a seconda della finalità del test, è possibile procedere:

- modificando la salinità del campione portandola a quella dell'acqua del controllo,
- modificando la salinità dell'acqua del controllo portandola a quella del campione.

L'innalzamento della salinità potrà essere ottenuto impiegando acqua ipersalina (100 ‰) oppure aggiungendo i sali per l'acqua di mare artificiale. Un metodo per la preparazione di soluzioni ipersaline è riportato in Libralato et al., 2009. L'abbassamento della salinità potrà essere ottenuto aggiungendo al campione liquido ambientale acqua distillata o deionizzata e, eventualmente, una soluzione di idrossido di sodio per ripristinare i valori ottimali di pH. Comunque, la salinità dovrà essere compresa tra 20 e 35 ‰ (UNICHIM, 2012a).

Ulteriori dettagli in merito a come preservare, trasportare e stoccare i campioni d'acqua da sottoporre ad analisi sono riportati nell'ISO 5667-3 (2018).

L'elutriato è la matrice acquosa nella quale è presente la porzione solubile delle sostanze estraibili dal sedimento (ASTM, 1994) e che meglio simula gli effetti legati alle movimentazioni dei fondali e ai dragaggi (USEPA/USACE, 1991; Onorati and Volpi Ghirardini, 2001), attività recentemente normate in Italia nell'ambito dell'Allegato Tecnico al DM 173/2016.

L'elutriato deve essere preparata entro 10 giorni dal sedimento tal quale conservato a 4 °C al buio e, se non saggiato entro le 24 h dalla preparazione, conservato a -20 °C fino al momento dell'analisi (ALLEGATO TECNICO DM 173/2016). Gli elutriati possono quindi essere impiegati immediatamente o, se correttamente conservati, entro 24 h dalla loro preparazione, oppure congelati e utilizzati in un secondo momento (ISPRA, 2021).

Per la preparazione dell'elutriato si deve utilizzare acqua di mare alla corretta salinità, verificare la salinità al termine della preparazione e, nel caso di congelamento, seguire le indicazioni riportate nel Quaderno Ricerca Marina 16/2021 (ISPRA, 2021) affinché, allo scongelamento, i campioni non abbiano subito delle alternazioni.

Per ulteriori indicazioni su come preparare gli elutriati da sottoporre al saggio, consultare il Quaderno Ricerca Marina 16/2021 (ISPRA, 2021).

Poiché il saggio prevede due cambi del mezzo (dopo 48 h e dopo 5 giorni di esposizione) devono essere preparate tre diverse aliquote di campione di volume opportuno, da congelare separatamente.

Il Quaderno Ricerca Marina 16/2021 (ISPRA, 2021) riporta, inoltre, indicazioni sui parametri chimico-fisici da controllare per verificare il rispetto dei valori ottimali per l'esecuzione del saggio, con particolare riferimento al controllo della concentrazione dell'ammonio, nella sua forma dissociata e indissociata come ammoniaca, nonché altri composti ridotti che possono essere causa di "falsi positivi" nella valutazione della tossicità di elutriati marini (ISPRA, 2021).

Gli organismi marini utilizzati come specie-test nei saggi di terza tipologia dall'Allegato tecnico del D.M. 173/2016 risultano altamente sensibili alla presenza di ammonio e dei nitriti. Di conseguenza, per discriminare la tossicità dovuta alla reale presenza di inquinanti è fondamentale l'individuazione di valori soglia oltre ai quali il saggio è da ritenersi non applicabile alle condizioni date. Nel caso del saggio di inibizione della mobilità naupliare a 7 giorni con *A. tonsa*, le prove sperimentali condotte da ISPRA utilizzando cloruro di ammonio, hanno permesso di stimare a partire dalla curva dose-risposta un valore soglia per l'ammonio di 8 mg NH_4^+ /L (ISPRA, 2021). Lo stesso Quaderno Ricerca Marina 16/2021 riporta per i nitriti un livello soglia di 0,1 mg/L per l'esecuzione dei saggi della terza tipologia.

Per i campioni di elutriato che presentano una concentrazione di ammonio totale o di nitriti superiore allo specifico livello soglia si può procedere con l'analisi del campione diluito al 50 %. Qualora i valori continuino ad essere superiori ai rispettivi valori soglia è possibile procedere al condizionamento del campione, abbattendo la concentrazione di ammonio o di nitriti dell'elutriato ad un valore compatibile con il test. Un esempio di procedura di abbattimento della concentrazione di ammonio totale è riportato sul Quaderno Ricerca Marina 16/2021.

Nel caso di prove con sostanze chimiche è necessario ottenere preventivamente informazioni sulle proprietà della sostanza chimica, del prodotto formulato o della miscela chimica da testare, comprese la concentrazione degli ingredienti principali, la solubilità in acqua, la stabilità chimica, e la biodegradabilità (Environmental Canada, 2011).

Laddove la solubilità in acqua è dubbia o problematica, dovrebbero essere ottenute e riportate procedure accettabili utilizzate in precedenza per preparare soluzioni acquose della sostanza chimica e/o la solubilità chimica nell'acqua di prova dovrebbe essere determinata sperimentalmente (Environmental Canada, 2011).

Indicazioni metodologiche per la preparazione di soluzioni test per sostanze solubili in acqua, per emulsioni e sospensioni stabili in acqua e per sostanze scarsamente solubili in acqua da utilizzare in saggi biologici sono riportati sulla Parte 16 della norma ISO 5667-16 (2017).

Per sostanze solubili in acqua le soluzioni madri della sostanza da testare devono essere preparate sciogliendo o diluendo una quantità nota della sostanza in un volume noto di acqua di diluizione, acqua deionizzata o acqua distillata in contenitori di vetro. Le soluzioni

madri devono essere preparate al momento dell'uso, a meno che la sostanza non sia nota per essere stabile in soluzione, nel qual caso possono essere preparate fino a due giorni prima (ISO 14669, 1999).

Per le sostanze che sono scarsamente solubili in acqua, nella preparazione delle soluzioni madre si possono utilizzare dispositivi ultrasonici o altri strumenti idonei per favorire la solubilizzazione o dispersione della sostanza (ISO 14669, 1999); tuttavia, la dispersione ultrasonica può produrre goccioline che differiscono per dimensioni e uniformità, alcune delle quali potrebbero migrare verso la superficie del liquido, o variare nella disponibilità biologica, creando variazioni di tossicità (Environmental Canada, 2011).

Per favorire la solubilizzazione, possono essere utilizzati solventi organici a bassa tossicità per i copepodi (ad esempio acetone), purché la concentrazione del solvente nella soluzione di prova finale non superi 0,1 mL/L (ISO 14669, 1999).

Non è possibile raccomandare un'unica procedura per la preparazione di soluzioni madre di sostanze scarsamente solubili a causa della diversa natura delle sostanze chimiche (ISO 14669, 1999). Le soluzioni da testare dovranno essere preparate al momento dell'utilizzo (UNICHIM, 2012a).

In merito all'eventuale correzione del pH dei campioni da sottoporre alla prova, sia l'ISO 5667-16 (2017) che il Quaderno Ricerca Marina 16/2021 (ISPRA, 2021) per gli elutriati, riportano che i campioni con valori di pH estremi, che superano i limiti di tolleranza degli organismi di prova, debbano essere neutralizzati. La neutralizzazione non deve essere effettuata nel caso in cui sia debba valutare anche l'effetto del pH o se si osservano modificazioni fisiche o reazioni chimiche (come precipitazioni) a seguito della neutralizzazione. In ogni caso, l'aggiunta di volume dell'acido o della base necessari per la correzione del pH dovrebbe essere minima. Si raccomanda l'uso di acido cloridrico e idrossido di sodio.

3. SOLUZIONI, STRUMENTAZIONE E MATERIALI

3.1 - Acqua

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

L'acqua di mare naturale può essere portata alla salinità idonea utilizzando acqua deionizzata o di purezza equivalente.

Sebbene l'utilizzo dell'acqua di mare naturale sia preferibile a quella sintetica, qualora si fosse nella impossibilità di raccogliere campioni di acqua naturale, si può utilizzare acqua di mare sintetica come previsto dal protocollo UNICHIM 2366 (2012a)

3.2 - Soluzioni

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

Come tossico di riferimento deve essere utilizzato il Nichel cloruro esaidrato ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). In commercio esistono soluzioni standard da 1000 mg Ni^{2+} /L in HCl pronte all'uso e che possono essere conservate a 4 °C.

Le soluzioni da preparare per l'incubazione comprendono anche le colture monospecifiche delle alghe unicellulari marine *Isochrysis galbana*, *Rhinomonas reticultata* o *Rhodomonas baltica* (rif. Paragrafo 4.2.2).

3.3 - Strumentazione

In aggiunta alle usuali apparecchiature da laboratorio sono necessari:

- camera o ambiente termostato a 20 ± 1 °C con sistema di illuminazione con la possibilità di regolare intensità luminosa e fotoperiodo;
- apparato per la filtrazione dell'acqua di mare;
- frigorifero/incubatore a 4 °C;
- pompa, aeratore e sistema di tubicini, rubinetti e pipetta/pietra porosa per l'aerazione;
- strumento per la determinazione della salinità delle matrici acquose;
- pHmetro;
- ossimetro;
- pompette in plastica o pipettatore automatico per pipette sierologiche;
- emocitometro per la determinazione della concentrazione delle alghe (ad esempio Neubauer, Thoma, Fuchs-Rosenthal o Bürker) o contacellule automatico/elettronico per la quantizzazione delle alghe;
- micropipette automatiche e/o manuali graduate da 0,010 a 10,00 mL;
- stereomicroscopio (ingrandimento tra 0,5 e 5,5) per selezione embrioni e l'allestimento del saggio;
- microscopio ottico rovesciato (obiettivi necessari 4x e 10x) per il controllo del saggio.

3.4 - Materiali

- filtri da 0,22 - 0,45 µm in nitrocellulosa per la filtrazione dell'acqua di mare;

- serie di filtri preparati con provette coniche da 50 mL tagliate e maglie da 50 a 200 μm per la separazione dei diversi stadi vitali di *A. tonsa* presenti nei contenitori di allevamento e 20 μm per l'esecuzione del saggio (Figura 7);

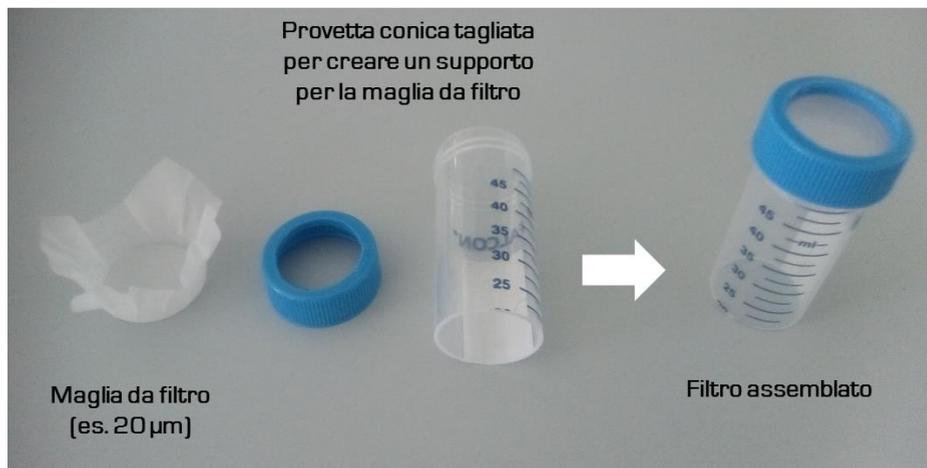


Figura 7: Costituenti per preparazione filtro con maglia da 20 μm .

- spruzzetta con acqua di mare per la pulizia dei filtri (e recupero del materiale trattenuto dal filtro);
- beaker da 1000 mL in vetro borosilicato per il mantenimento degli organismi;
- cristallizzatori di varie capacità (60 - 70 - 100 mL) di materiale chimicamente inerte (preferibilmente vetro borosilicato);
- contenitori (provetta, bicchierino, beaker o cristallizzatore) con coperchio per stoccaggio delle uova a 4 °C;
- contenitori per l'esecuzione del saggio: bicchierino in plastica tipo contenitore urine in plastica di volume 100 - 125 mL oppure beacker di vetro da 50 a 100 mL;
- puntali per micropipette di precisione;
- pipette sierologiche monouso;
- matracci in vetro da 10 mL e 250 mL;
- pipette Pasteur in vetro da 7 x 230 mm e relative tettarelle per selezione organismi/uova/residui da allontanare; in alternativa è possibile utilizzare un sistema costituito da un puntale per pipette di precisione con un tubicino in gomma chiuso all'altra estremità oppure con una tettarella (Figura 8);
- pellicola Parafilm®.

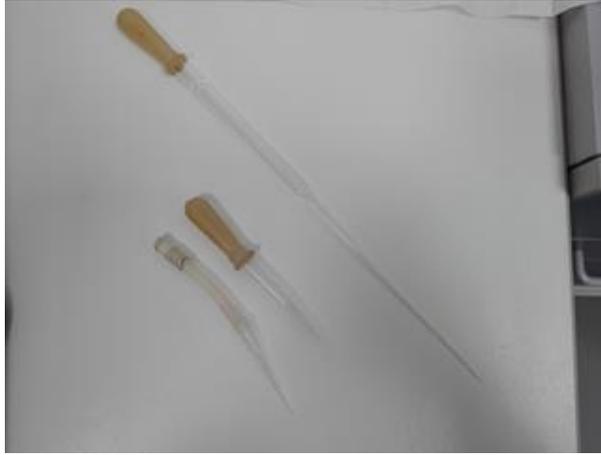


Figura 8: Pipetta Pasteur con punta tirata e alternative assemblate con puntali e pezzo di tubo o tettarella.

4. PROTOCOLLO METODOLOGICO

4.1 - Allestimento del test

Per l'esecuzione dei test devono essere allestite almeno 3 repliche per ognuno dei seguenti campioni:

- il controllo negativo;
- il controllo positivo, rappresentato da concentrazioni crescenti della sostanza tossica di riferimento;
- la matrice ambientale o altre soluzioni da testare.

Ciascuna replica è costituita da 3 diversi contenitori di prova in cui sono distribuite le uova che costituiscono il replicato.

4.1.1 - Saggio con campioni ambientali

Per i saggi condotti su campioni liquidi di ambienti marini o salmastri (acqua della colonna ed effluenti di scarico) o su campioni liquidi derivati da sedimenti di ambienti marini o salmastri (acqua interstiziale ed elutriati) è consigliabile effettuare una "prova preliminare" con una sola concentrazione (campione tal quale) per verificare l'eventuale assenza di tossicità.

Il risultato ottenuto testando il campione ambientale tal quale viene confrontato con il risultato del controllo utilizzando la statistica di base al fine di verificare se le due serie di dati abbiano la stessa varianza, condizione necessaria per poter poi applicare i test statistici più comuni per determinare se il risultato ottenuto con il campione si discosta significativamente da quanto ottenuto nel controllo.

Nel caso in cui la prova preliminare abbia fatto registrare livelli di immobilizzazione naupliare statisticamente differenti rispetto al controllo negativo è necessario effettuare una seconda prova, questa volta allestendo almeno 3 diluizioni del campione in esame. La sequenza 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % e 6,25 % [v/v] caratterizzata da un fattore di diluizione 0,5 è applicabile a gran parte delle situazioni. Viceversa, basandosi anche sulle informazioni ottenute dal saggio preliminare, si potrà adottare un diverso intervallo di sperimentazione, un diverso fattore di diluizione o anche un maggior numero di concentrazioni, oppure escludere le concentrazioni più alte nel caso in cui siano stati ottenuti elevati valori di immobilizzazione naupliare. I risultati ottenuti possono essere utilizzati per il calcolo dei parametri di interesse (es. EC_x).

Per gli elutriati relativi ad attività di caratterizzazione, classificazione e gestione dei sedimenti marini da sottoporre a movimentazione, è disponibile uno specifico tool applicativo gratuito (SediquaSoft 109.0®) realizzato da ISPRA, con la collaborazione di Università Politecnica delle Marche, per l'elaborazione dei dati in accordo a quanto previsto dal DM 173/2016 attraverso i criteri di integrazione ponderata. Il tool, disponibile sul sito ISPRA, è fornito di un Manuale d'uso che riporta le modalità di raccolta e inserimento dei dati ottenuti dalla prova.

4.1.2 - Test con sostanze chimiche o preparati

Quando si effettuano saggi con soluzioni acquose di sostanze chimiche, preparati solubili o preparati che possono essere mantenuti in sospensione o dispersione stabile nelle condizioni di prova, le concentrazioni della sostanza o preparato da testare devono essere scelte in serie geometrica in modo da ottenere almeno una concentrazione inferiore e una superiore al range in cui, sulla base di precedenti prove o di informazioni bibliografiche, dovrebbe ricadere il valore del parametro di interesse (EC_x oppure NOEC o LOEC). Il

rapporto tra le concentrazioni in serie non dovrebbe essere superiore a 3,2 (ISO 10253, 2016; ISO 16778, 2013).

In aggiunta, dovrebbero essere incluse almeno due concentrazioni che diano livelli di inibizione compresi tra il 10 % e il 90 % in modo da permettere l'analisi della regressione. Nel caso in cui non siano disponibili informazioni bibliografiche sulla tossicità della sostanza chimica, è necessario prevedere una prova preliminare con 5 diluizioni in serie geometrica e piuttosto spaziate tra loro per definire poi il range di concentrazione da indagare più approfonditamente testando concentrazioni più vicine, in base allo scopo del test (es. definire il valore di ECx oppure i livelli di NOEC o di LOEC).

Le soluzioni stock devono essere preparate sciogliendo la sostanza test in acqua ultrapura utilizzando un matraccio in vetro. Da tale soluzione stock vengono preparate le diluizioni da testare sciogliendo aliquote di tale stock in acqua di mare e aggiungendo le opportune quantità di colture algali, sempre utilizzando matracci in vetro.

4.1.3 - Prova con composto chimico di riferimento

L'uso di una sostanza tossica di riferimento è necessario per valutare, in condizioni standard, la percentuale di immobilizzazione naupliare. Ciò permette, inoltre, di ottenere informazioni sulla precisione del metodo e sulla riproducibilità intralaboratorio, attraverso il confronto con apposite carte di controllo per garantire che venga stimato correttamente l'effetto misurato nel saggio (BOX 2).

Per questo specifico saggio, la prova con il composto chimico di riferimento permette di verificare la qualità del batch di uova utilizzato e quindi dello stato della coltura. Il protocollo UNICHIM M.U. 2366 (2012b) riporta i risultati di un esercizio di interconfronto con il cloruro di nichel esaidrato ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) come sostanza di riferimento.

BOX 2 - Costruzione ed uso delle carte di controllo

Le carte di controllo costituiscono uno strumento utile per riconoscere e correggere le anomalie in una ampia varietà di processi (Smeti et al., 2007): originariamente sviluppati per gestire facilmente la qualità dei prodotti di fabbricazione (Shewhart, 1931), questi strumenti grafici sono attualmente utilizzati in analisi microbiologiche (Eissa, 2016) o chimiche (Arciszewski et al., 2018) delle acque e il loro utilizzo si sta diffondendo anche in studi di tossicità ambientale (Yearley et al., 1995; Araújo et al., 2008; Arciszewski et al., 2017). Recentemente, uno studio specifico è stato sviluppato per valutare la risposta fisiologica e la sensibilità di *A. tonsa* in otto anni di esecuzione del saggio di inibizione della mobilità di naupli dopo 48 h di esposizione (UNICHIM, 2012b) e confrontare i valori registrati dei diversi parametri analizzati con i valori di riferimento, al fine di valutare l'idoneità di una coltura a lungo termine per studi di ecotossicologia (Rotolo et al., 2021).

La carta di controllo, quindi, costituisce un metodo grafico per valutare l'affidabilità delle condizioni in cui è stato eseguito un saggio ecotossicologico, in quanto prevede la registrazione cronologica e grafica dei valori ottenuti e quindi la loro variabilità.

Le carte di controllo rappresentano uno strumento immediato, di facile attuazione, statisticamente rigoroso e universalmente riconosciuto, poiché si basano sulle norme internazionali della serie ISO 7870 (2014a-e).

In ecotossicologia le carte di controllo permettono di verificare se la risposta di un modello biologico in un saggio di tossicità è confrontabile con quella normalmente riscontrata nei saggi dello stesso tipo effettuati in precedenza nello stesso laboratorio di prova con lo stesso protocollo metodologico.

All'interno di una procedura analitica sono presenti due tipi di variabilità:

1) la **variabilità naturale o accidentale** che indica l'effetto cumulato di un gran numero di piccole cause inevitabili ed incontrollabili;

2) la **variabilità sistematica** che indica distorsioni nella procedura che possono essere dovute a macchine non regolari, materie prime difettose, errori degli operatori, ecc.

L'obiettivo è quello di individuare la presenza di variabilità sistematica, poiché la variabilità naturale è impossibile da eliminare e non influenza particolarmente il risultato; se, infatti, all'interno di una procedura analitica è presente solo una variabilità naturale, la si definisce "in controllo", mentre in presenza di variabilità sistematica il saggio è da considerarsi "fuori controllo".

Graficamente la carta di controllo presenta una linea centrale (**Central Line - CL**) che rappresenta il valore attorno al quale le misurazioni dovrebbero trovarsi se nel processo fosse presente solo una variabilità naturale (Fig. 9).

Oltre alla linea centrale nella carta sono presenti due limiti (Fig. 9), uno inferiore (**Lower Control Limit - LCL**) ed uno superiore (**Upper Control Limit - UCL**) che sono determinati tramite procedure statistiche.

Tipicamente una carta di controllo stabilisce dei limiti che si collocano a ± 3 scarti quadratici medi dalla misura statistica di interesse (media, proporzione, range, ecc.) (ISO 7870-1, 2014a). Quindi in generale per costruire una carta possiamo seguire la seguente semplice regola (indicando con W una statistica campionaria generica):

$$CL = E[W];$$

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

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

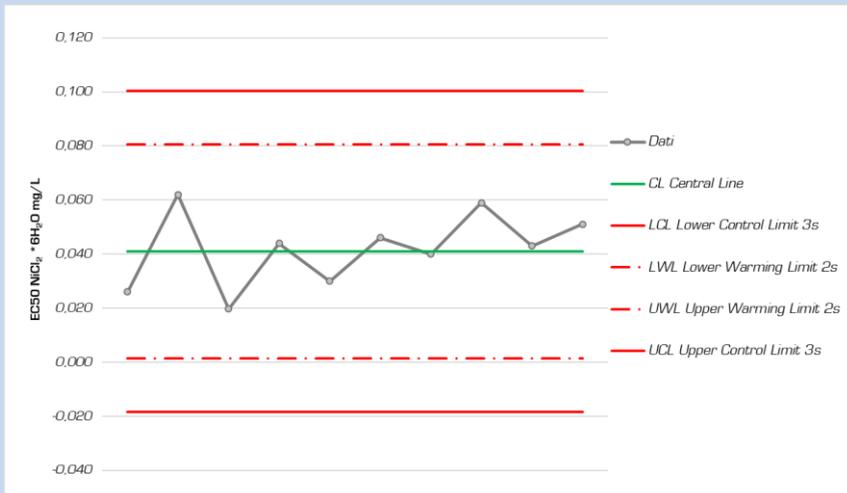


Figura 9: Esempio di rappresentazione grafica di una carta di controllo.

Una volta definiti i limiti di controllo, inserendo i dati all'interno del grafico, la carta ci consente di individuare eventuali andamenti sistematici (*pattern*) dei valori che i processi ottengono nel tempo e di stabilire se ciascun punto cade all'interno o all'esterno dei limiti. Oltre ai limiti di controllo, possono essere presenti dei limiti più interni chiamati limiti di guardia o sorveglianza. Tali limiti chiamati UWL (Upper Warning Limit) e LWL (Lower Warning Limit), si collocano a ± 2 scarti quadratici medi dalla misura statistica di

BOX 3 – Sostituzione di *Tetraselmis suecica* con *Rhodomonas baltica*

Il protocollo UNICHIM M.U. 2366 (2012 a, b) prevede l'utilizzo della primnesiofitea *Isochrysis galbana* e della clorofitea *Tetraselmis suecica*. Tuttavia, come riportato già in precedenza, è stato dimostrato che *T. suecica* non favorisce una buona produzione di uova, riduce il successo di schiusa e influenza negativamente la vitalità naupliare di *A. tonsa* (Zhang et al, 2013). Di conseguenza si suggerisce di sostituire, sia per il mantenimento delle colture che per l'esecuzione del saggio, questa specie con alghe criptofitee come *Rhinomonas reticulata* e *Rhodomonas baltica*.

Per calcolare il quantitativo di *R. baltica* da utilizzare in sostituzione di *T. suecica*, è stato preso come riferimento la corrispondenza tra contenuto di carbonio e densità algale riportata in Zhang et al. (2013) per ciascuna specie algale.

Un contenuto di 500 µg C/L corrisponde ad una densità di 11000 cell/mL di *T. suecica* e 4000 cell/mL di *R. baltica*.

Il contenuto di carbonio fornito dalla densità finale (10000 cell/mL) di *T. suecica* prevista dal protocollo UNICHIM è facilmente calcolabile considerando la seguente proporzione:

$$500 \mu\text{g C/L} : 11000 \text{ cell/mL} = x \mu\text{g C/L} : 10000 \text{ cell/mL},$$

da cui risulta che 10000 cell/mL corrispondono a 454,55 µg C/L.

Per calcolare la densità finale di *R. baltica* da utilizzare per fornire lo stesso quantitativo di C/L, è possibile utilizzare la proporzione che segue:

$$500 \mu\text{g C/L} : 4000 \text{ cell/mL} = 454,55 \mu\text{g C/L} : x \text{ cell/mL},$$

da cui risulta una densità finale di *R. baltica* di 3636 cell/mL, arrotondato a 3650 cell/L.

Le colture algali sono allestite secondo le modalità riportate nel protocollo UNICHIM M.U. 2366 (2012a).

La determinazione della densità cellulare della coltura di *R. baltica* può essere effettuata mediante emocitometri con microscopio ottico o con contacellule automatico/elettronico. Le colture di *I. galbana* e *R. baltica* possono raggiungere, rispettivamente, concentrazioni di $3,5 \cdot 10^6$ cell/mL e $3,5 \cdot 10^5$ cell/mL se mantenute ad opportune condizioni, tali densità permettono di utilizzare bassi volumi di colture algali e quindi evitare eccessive diluizioni delle soluzioni da testare.

Nel caso in cui le colture algali non abbiano raggiunto densità elevate, oppure nel caso si voglia ridurre ulteriormente i volumi algali da aggiungere alle soluzioni, è possibile procedere concentrando le colture mediante centrifugazione. L'utilizzo di colture algali concentrate per l'alimentazione di *A. tonsa* è suggerito anche nel protocollo ISO 14669 (1999) per il saggio acuto di letalità condotto con adulti e copepoditi: tale protocollo riporta che è possibile concentrare le colture algali mediante centrifugazione a 3300 x g per 30 minuti a 10 °C per ottenere una sospensione stock di 3×10^7 cell/mL che può essere mantenuta per una settimana a 4 °C.

4.2.3 - Raccolta delle uova

Le fasi per la raccolta delle uova da utilizzare per la prova sono le seguenti:

1. due giorni prima dell'inizio della prova, prelevare 40 - 45 organismi adulti dall'allevamento: filtrando un'aliquota della coltura mediante un filtro di maglia da 200 µm in modo da trattenere gli animali di dimensioni maggiori e lasciar passare uova, nauplii e copepoditi (Fig. 11);

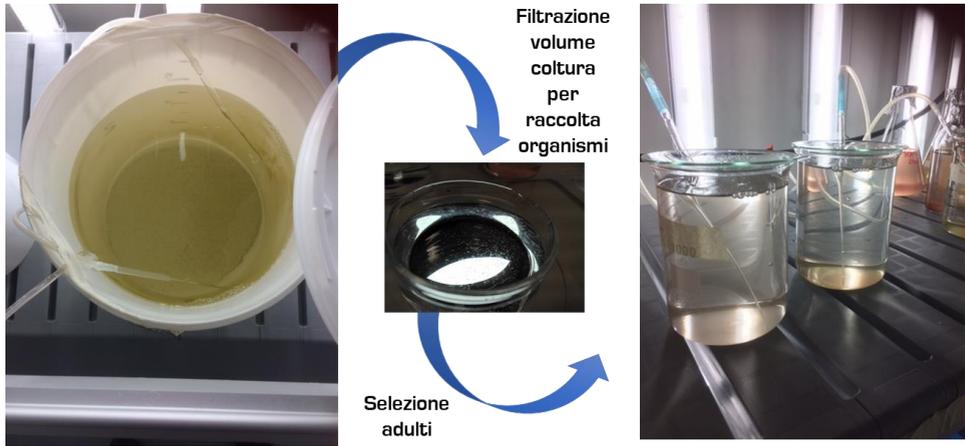


Figura 11: raccolta adulti *A. tonsa* mediante filtrazione e incubazione in beaker a bassa densità (1 ind./ml) per favorire la deposizione di uova.

2. trasferire in un cristallizzatore o in una piastra Petri gli animali trattenuti dal filtro aiutandosi con una spruzzetta riempita con acqua di mare e facendo attenzione a non danneggiarli o stressarli troppo;
3. controllare gli animali allo stereomicroscopio per verificare che ci siano adulti di entrambi i sessi ed eventualmente allontanare morti o residui vari trattenuti dal filtro e trasferiti anch'essi nel cristallizzatore;
4. trasferire gli adulti selezionati in un cristallizzatore e da qui in un beaker contenente acqua di mare pulita e un mix algale costituito da un'alga unicellulare della classe delle primnesioficee [*I. galbana*] e una o due alghe unicellulari rosse della classe delle criptoficee [*R. reticulata* e/o *R. baltica*] in base alla disponibilità, considerando le possibili opzioni e le densità riportate in Tabella 3;
5. porre i beaker contenenti gli adulti selezionati alle stesse condizioni di temperatura e fotoperiodo di mantenimento della coltura (temperatura costante di 20 ± 1 °C, con un fotoperiodo di 14 h di luce e 10 h di buio, intensità luminosa $500 \div 600$ lux mediante lampade a luce fredda);

Tabella 3: Opzioni di diete da utilizzare per gli adulti di *A. tonsa* mantenuti in beaker per la raccolta delle uova. Sono riportate le densità finali espresse in cell./mL e i relativi quantitativi di mg/L di carbonio.

Opzioni	Primnesioficea	Criptoficee	
	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Rhinomonas reticulata</i>	<i>Rhodomonas baltica</i>
1	40000 cell/mL (2,5 mg C/L)	2000 cell/mL (0,11 mg C/L)	3360 cell/mL (0,21 mg C/L)
2	40000 cell/mL (2,5 mg C/L)	5820 cell/mL (0,32 mg C/L)	
3	40000 cell/mL (2,5 mg C/L)		5120 cell/mL (0,32 mg C/L)

6. aggiungere una leggera aerazione utilizzando una pipetta Pasteur collegata ad un aeratore o sistema soffiante con rubinetto per ridurre il flusso d'aria (Fig. 11);
7. effettuare la raccolta delle uova ogni mattina fino al giorno di inizio della prova: filtrare il contenuto del beaker con filtro da 50 µm in modo da trattenere embrioni, eventuali nauplii e adulti (Fig.12 a-b);
8. riversare in un cristallizzatore da 60 mL quanto trattenuto dal filtro aiutandosi con la spruzzetta con acqua di mare pulita (Fig.12 c-d);
9. quindi filtrare il contenuto del cristallizzatore su una maglia con porosità maggiore di 100 µm in modo da trattenere sul filtro gli adulti e far passare embrioni e nauplii (Fig.12 e-f);
10. riversare il contenuto del filtro in un cristallizzatore da 60 - 70 mL (Fig.12 g-i);
11. conservare le uova in frigo a 4 °C fino all'allestimento della prova. Se sono presenti molti residui e pellet fecali, operando allo stereomicroscopio, trasferire le uova in un cristallizzatore con acqua pulita e già fredda. Per comodità è possibile facilitare l'accumulo delle uova al centro del fondo del cristallizzatore agitando la sospensione delicatamente con una pipetta con movimenti circolari lungo il bordo del cristallizzatore e creando quindi un vortice che lentamente porta prima le uova in sospensione quindi le fa avvicinare al centro del fondo del cristallizzatore (Fig. 13);
12. incubare il beaker con gli adulti alle stesse condizioni di luce e temperatura descritte sopra, per l'eventuale raccolta di uova anche nei giorni successivi.

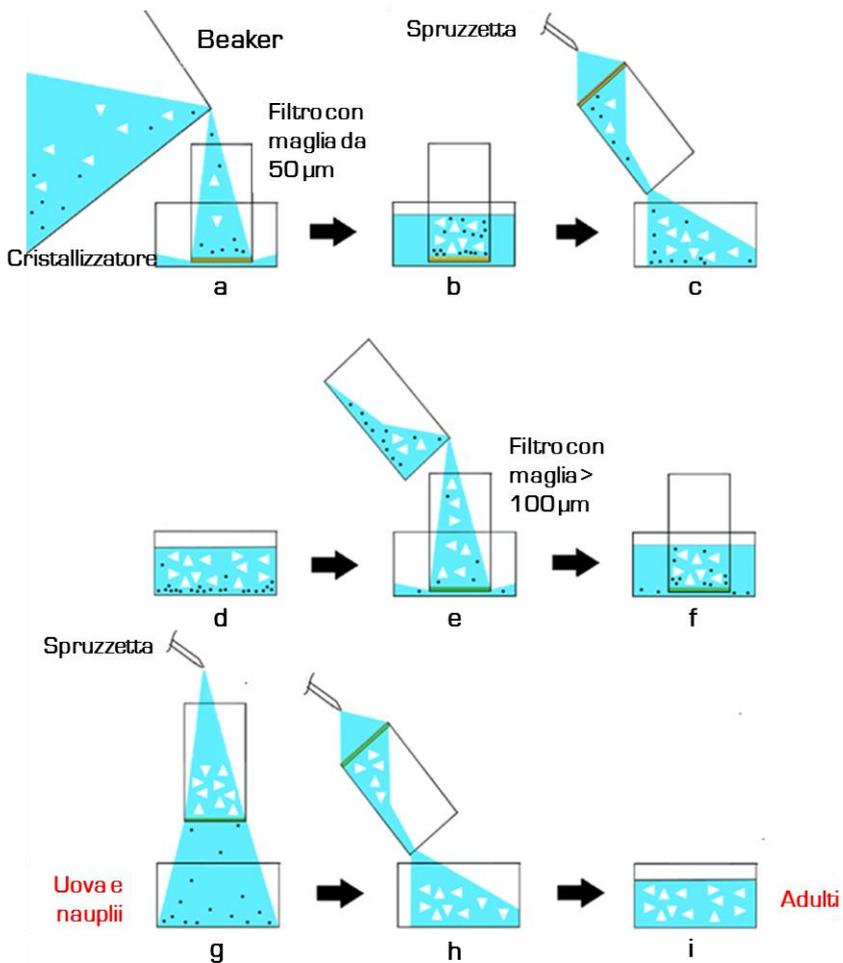


Figura 12: Procedura per la raccolta delle uova: [a, b] filtrazione dell'intero volume della coltura contenente gli adulti mediante un filtro con maglia da 50 μm che trattiene sia le uova che gli adulti; [c, d] trasferimento nel cristallizzatore di adulti e uova trattenuti dal filtro mediante l'uso di una spruzzetta; [e, g] filtrazione del contenuto del cristallizzatore mediante filtro con maglia superiore a 100 μm che trattiene gli adulti ma lascia passare le uova; [h, i] trasferimento degli adulti trattenuti dal filtro in un altro cristallizzatore. Triangolo bianco = adulto; cerchio nero = uovo o primo stadio naupliare.

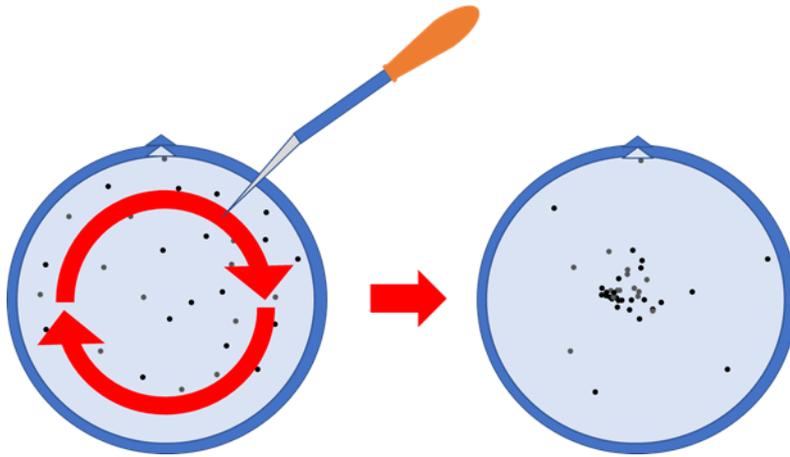


Figura 13: Procedura per facilitare l'accumulo delle uova la centro del cristallizzatore mediante l'utilizzo di una pipetta.

Eventualmente è possibile raccogliere le uova e stoccarle in frigorifero a 4° C fino all'allestimento della prova. Una repentina raccolta delle uova subito dopo la deposizione e un rapido trasferimento a 4 °C permette il loro utilizzo per saggi ecotossicologici fino ad un mese dalla raccolta [Vitiello et al., 2016].

4.3 - Preparazione soluzioni test

Le soluzioni di prova devono essere preparate al momento dell'uso utilizzando le opportune quantità di alghe e possono essere conservate a 4 °C fino all'allestimento.

Ciascuno dei 3 replicati è costituito da 3 contenitori di prova contenenti ognuno 25 mL di soluzione test; per il passaggio di pre-incubazione è necessario un volume aggiuntivo di soluzione test (10 mL).

È raccomandabile, inoltre, che il volume delle diverse soluzioni di prova sia sufficiente a garantire anche un'aliquota supplementare necessaria per la determinazione dei parametri chimico-fisici da controllare.

4.3.1 - Saggio con campioni ambientali

Nel caso di campioni acquosi ambientali (acque o elutriati) congelati, prevedere il giorno precedente la data di utilizzo il trasferimento a 4 °C delle aliquote necessarie per l'allestimento (o il cambio delle soluzioni), per dare loro il tempo di scongelarsi ed evitare lunghe attese.

I volumi di campione necessari per lo svolgimento del saggio dipendono dalla metodologia di esecuzione del saggio stesso.

Le diluizioni da testare devono essere preparate in contenitori sterili, utilizzando la stessa acqua impiegata per l'allestimento del controllo negativo e prevedendo l'aggiunta di opportune quantità di colture concentrate di *R. baltica* [densità finale durante l'esposizione 3650 cell/mL] e *I. galbana* [densità finale durante l'esposizione 50000 cell/mL] (Fig. 14).

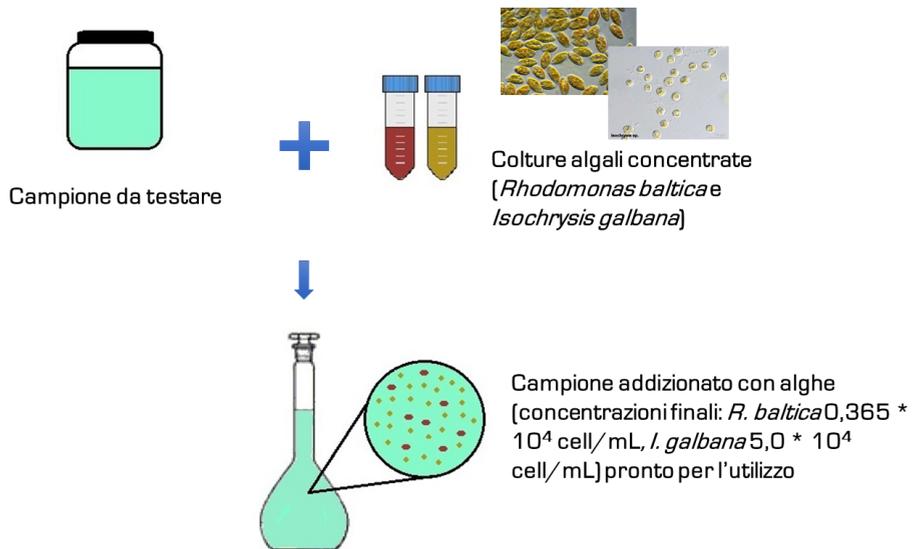


Figura 14: Preparazione campione ambientale addizionato con alghe.

La massima concentrazione di campione ambientale analizzabile dipenderà dalle densità delle colture algali utilizzate e quindi dai volumi delle colture da aggiungere.

La Tabella 4 riporta alcuni esempi di diluizione dei campioni in base alle densità delle colture algali [coltura a bassa densità, coltura che ha raggiunto una densità più elevata e coltura algale concentrata mediante centrifugazione] utilizzate per preparare i campioni da testare.

Tabella 4: Esempio di diluizione dei campioni in base alle densità delle colture algali.

	Coltura algale a bassa densità		Coltura algale che ha raggiunto densità più elevate		Coltura algale concentrata mediante centrifugazione	
	Esempio densità (cell/mL)	Volume da aggiungere rispetto al volume totale (%)	Esempio densità (cell/mL)	Volume da aggiungere rispetto al volume totale (%)	Esempio densità (cell/mL)	Volume da aggiungere rispetto al volume totale (%)
<i>R. baltica</i>	118000	3,08	350000	1,04	3500000	0,104
<i>I. galbana</i>	1041500	11,04	3500000	4,8	9500000	0,527
Totale alghe		14,12		5,84		0,631
Massima diluizione di campione ambientale che può essere testata		85,88		94,16		99,37

4.3.2 - Test con sostanze chimiche o preparati

La preparazione delle diluizioni dovrà essere svolta al momento dell'allestimento del test e ad ogni cambio del mezzo (dopo 48 h e 5 giorni di esposizione).

Se viene utilizzato un solvente per solubilizzare o disperdere le sostanze, preparare un secondo controllo con l'acqua di diluizione contenente il solvente alla massima concentrazione utilizzata.

4.3.3 - Prova con composto chimico di riferimento

Per la preparazione delle diluizioni del composto chimico di riferimento $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, è possibile utilizzare una soluzione standard da 1000 $\text{mg Ni}^{2+}/\text{L}$ conservata a 4 °C. Inoltre, deve essere preparata una soluzione stock intermedia da 10 $\text{mg Ni}^{2+}/\text{L}$ in acqua ultrapura, per evitare l'utilizzo di volumi troppo ridotti di soluzione standard.

A partire dalla soluzione stock intermedia, preparare le concentrazioni da testare (0,025 - 0,04 - 0,063 - 0,1 $\text{mg Ni}^{2+}/\text{L}$) utilizzando l'acqua di mare e gli opportuni volumi di colture algali concentrate. (Fig. 15).

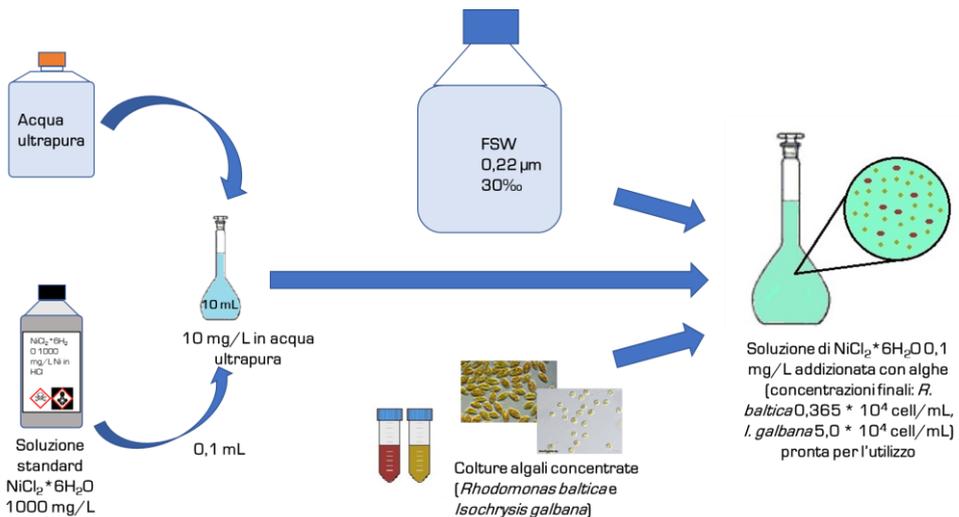


Figura 15: Esempio di preparazione soluzione di $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mg/L Ni in FSW addizionata con alghe per validazione prova e sensibilità batch di embrioni/uova.

4.4 - Pre-incubazione

Per ogni gruppo sperimentale (diluizione di campione ambientale o concentrazione di sostanza da testare, e per ogni tipologia di controllo prevista) preparare:

- un cristallizzatore o una piastra Petri contenente 10 mL della soluzione di prova per effettuare la pre-incubazione,
- 9 contenitori di prova (3 contenitori per 3 replicati) equipaggiati con altrettanti sistemi filtranti allestiti come indicato in Figura 7.

Trasferire in ciascun contenitore di prova 15 mL di soluzione di campione ambientale/soluzione da testare/controllo addizionata con alghe (Figura 15).

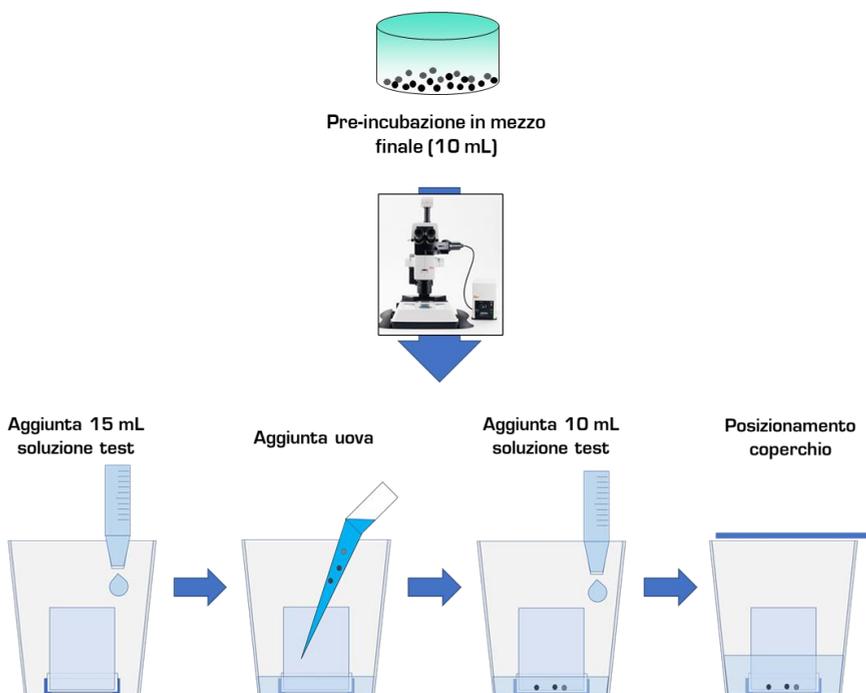


Figura 16: Passaggi dell'allestimento test: pre-incubazione delle uova nel mezzo finale, aggiunta di parte della soluzione test nel contenitore di prova, trasferimento delle uova, aggiunta della restante porzione della soluzione test e posizionamento della copertura.

Trasferire dal cristallizzatore a ciascun contenitore di prova 3 uova facendo attenzione che cadano sul filtro. Verificare che su ciascun filtro ci siano effettivamente 3 uova posizionando il bicchierino sotto l'obiettivo dello stereomicroscopio e spostando il fuoco fino a riuscire a distinguere distintamente la maglia da filtro (Figg. 16 e 17).

Aggiungere in ciascun contenitore di prova 10 mL di soluzione di campione ambientale/soluzione da testare/controllo addizionata con alghe; l'aggiunta della soluzione tra la parete del contenitore di prova e il filtro è preferibile per evitare di danneggiare le uova (Fig. 16). Coprire il contenitore di prova con pellicola Parafilm forata per permettere il ricircolo dell'aria o in alternativa utilizzare il tappo (appoggiato sopra) nel caso siano stati impiegati contenitori per urine. Incubare i contenitori come riportato nel paragrafo 4.5

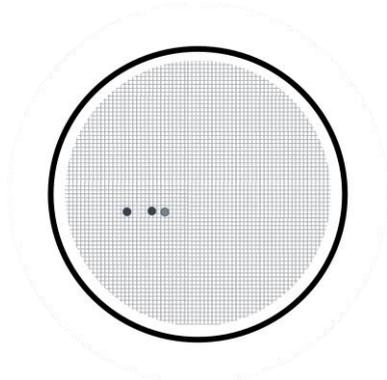


Figura 17: Osservazione al microscopio delle uova posizionate in ciascuna camera test nel volume di soluzione delimitato dal filtro e dal tessuto filtrante.

4.5 - Incubazione

Posizionare i contenitori di prova in una camera/armadio termostato alla temperatura di 20 ± 1 °C con un fotoperiodo di 14 h di luce e 10 h di buio, intensità luminosa 500 ÷ 600 lux mediante lampade a luce fredda.

4.6 - Cambio delle soluzioni

Il test prevede il rinnovo delle soluzioni test dopo 48 h e 5 giorni di esposizione utilizzando soluzioni fresche.

Ad ogni rinnovo è opportuno segnalare su apposite schede le uova schiuse e non schiuse, gli organismi morti, immobilizzati e vivi presenti in ciascun contenitore di prova: in questo modo si faciliteranno le operazioni di rinnovo.

La verifica è effettuata allo stereomicroscopio osservando la superficie del filtro e cercando di esaminare l'intera colonna d'acqua.

Le uova schiuse appaiono come membrane trasparenti in cui frequentemente è possibile osservare la frattura attraverso la quale il nauplio è fuoriuscito dall'uovo; le uova non schiuse appaiono ancora scure.

I naupli sono considerati immobilizzati quando incapaci di spostarsi attivamente in senso verticale e/o orizzontale; l'osservazione è protratta fino a 30 secondi.

Il rinnovo è effettuato mediante il trasferimento delle uova e dei naupli vivi e immobilizzati in nuovi contenitori di prova contenenti le nuove soluzioni: l'utilizzo del filtro agevola il recupero di uova e organismi e l'allontanamento del mezzo. Il trasferimento nel nuovo contenitore di prova viene effettuato spostando direttamente il filtro.

È consigliabile effettuare il trasferimento del filtro (e del suo contenuto) posizionando i due contenitori di prova (vecchio e nuovo) adiacenti e avendo già riempito la pipetta sierologica con 10 - 12,5 mL di soluzione fresca in modo da velocizzare i tempi di trasferimento ed evitare che gli organismi rimangano a secco per troppo tempo (Fig. 18):

- sollevare il filtro e trasferirlo rapidamente nel nuovo contenitore di prova (Fig. 18 a);
- per evitare che si formino bolle d'aria al di sotto del filtro, tenere inclinato il filtro durante le prime fasi di riempimento del contenitore di prova con la soluzione fresca (Fig. 18 b) e, durante la fase di riempimento, raddrizzarlo appoggiandolo quindi al fondo del contenitore di prova (Fig. 18 c);

- aggiungere la restante parte del volume di soluzione nuova (15 - 12,5 mL, in base al volume già precedentemente aggiunto, mantenendo il totale di 25 mL), eventualmente facendo scorrere la soluzione lungo la superficie interna del filtro in modo da facilitare la mobilitazione di organismi eventualmente rimasti adesi alla parete interna del filtro durante la fase di trasferimento (Fig. 18 d).

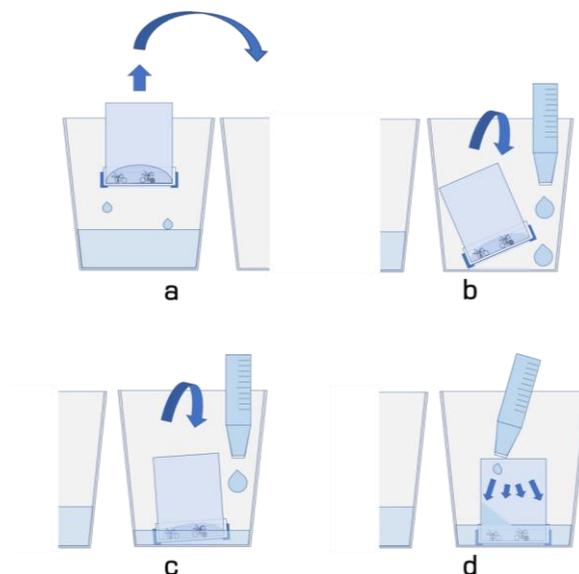


Figura 18: Operazione di trasferimento del filtro e del suo contenuto per il cambio di soluzioni a 48 h e 5 giorni.

4.7 - Parametri da monitorare

Il protocollo UNICHIM M.U. 2366 (2012a) riporta, tra i dati da inserire nel rapporto di prova, anche i parametri chimici e fisici (come salinità, ossigeno disciolto e pH) eventualmente determinati durante l'esecuzione della prova.

Tuttavia, è consigliabile misurare i parametri delle soluzioni vecchie al termine di ciascun rinnovo delle soluzioni test e al termine dell'incubazione, in modo da verificare se ci sono state modifiche delle condizioni che potrebbero avere influenzato il risultato della prova (parametri che non rientrano più negli intervalli di eseguibilità della prova).

4.8 - Termine del saggio

Dopo 7 giorni di esposizione verificare l'immobilizzazione degli organismi:

1. effettuare la verifica dell'immobilizzazione allo stereomicroscopio; non è raro che, al termine del test, gli organismi abbiano raggiunto la fase larvale di copepodite e risultino quindi facilmente visibili perché di dimensioni maggiori; tuttavia, può comunque accadere che non vengano visualizzati perché in movimento lungo la colonna d'acqua;
2. nel caso in cui il numero di organismi tra vivi e immobili o morti non corrisponda al numero di uova schiuse trovate, è necessario effettuare un ulteriore controllo più approfondito;

3. posizionare accanto a ciascun contenitore di prova un cristallizzatore in vetro borosilicato basso da 50 - 70 mL, o un qualsiasi contenitore trasparente con fondo piatto, che sia sufficientemente basso da permettere l'osservazione al microscopio invertito;
4. sollevare delicatamente il filtro dal contenitore di prova e utilizzare acqua di mare per pulire la superficie interna del filtro per evitare che gli organismi rimangano attaccati alla parete;
5. capovolgere il filtro e posizionarlo sopra il cristallizzatore, con l'aiuto di una spruzzetta favorire il trasferimento di uova e organismi nel cristallizzatore, in modo simile a quanto riportato in Figura 11. Utilizzare il quantitativo minimo di acqua in questo passaggio per evitare di avere troppa acqua;
6. osservare il contenuto del cristallizzatore allo stereomicroscopio e, eventualmente, anche al microscopio invertito che permette di visionare in modo chiaro il fondo e, quindi, visualizzare meglio uova schiuse ed eventuali organismi morti in degradazione;
7. nel caso il cui anche svolgendo questo controllo approfondito il numero di organismi trovati (tra vivi e morti) risulti minore del numero di uova schiuse, è probabile che alcuni organismi siano morti e si siano degradati.

4.9 - Interpretazione e validità dei risultati

I valori ottenuti dai contenitori che costituiscono un singolo replicato vanno sommati.

I valori di uova schiuse (U. s.) e uova totali (U. tot, come somma tra uova schiuse e uova non schiuse) sono utilizzati per calcolare la percentuale di schiusa:

$$\text{Schiusa uova (\%)} = (U. s. / U. tot) * 100$$

Il numero di nauplii (N. tot) corrisponde al numero di uova schiuse (U. s.).

La percentuale di Immobilizzazione degli organismi è calcolata a partire dal valore di organismi immobili (N. i.) e il numero di organismi totali (N. tot) come segue:

$$\text{Immobilizzazione naupliare (\%)} = (N. i. / N. tot) * 100.$$

Nel caso in cui, a seguito del controllo approfondito a fine test, la somma del numero di nauplii vivi e morti fosse inferiore al numero di uova schiuse, gli organismi "mancanti" devono essere conteggiati tra gli immobili poiché la loro assenza può essere dovuta ad una degradazione *post mortem*. In questo caso il numero totale di nauplii mancanti va sommato a quello dei nauplii immobili, rientrando quindi nel calcolo della percentuale di immobilizzati.

4.10 - Elaborazione dei dati

L'EC50 oppure il generico ECx vanno calcolati considerando il numero di organismi esposti e quello di organismi che hanno risposto per ciascuna concentrazione testata. Poiché si considera come endpoint l'immobilizzazione naupliare, il numero di organismi esposti corrisponderà al numero totale di nauplii (e quindi di uova schiuse), mentre il numero di organismi che hanno risposto corrisponderà ai nauplii immobilizzati.

L'EC50 dovrà essere determinato mediante un idoneo metodo statistico (analisi Probit, Trimmed Spearman-Kärber o stima grafica su un diagramma logaritmico gaussiano), la cui scelta dipende dal tipo di risultati ottenuti e, più precisamente, dal numero di risposte

parziali ottenute, comprese cioè tra la risposta della totalità degli organismi (100 %) e la risposta nulla (0 %).

4.11 - Parametri di validazione del saggio

Affinché il saggio svolto possa essere considerato valido, devono essere soddisfatte le condizioni riportate nella Tabella 5.

Il valore di EC50 ottenuto deve essere confrontato con l'intervallo di validità riportato nel protocollo UNICHIM M.U. 2366 (2012a) (Tab. 5), oppure con l'intervallo ottenuto dopo la costruzione della carta di controllo con i dati delle prove effettuate dal laboratorio. In alternativa al test con NiCl₂*6H₂O a 7 giorni, può essere eseguito il test a 48 h secondo quanto riportato nel protocollo UNICHIM M.U. 2365 (2012b; Tab. 5).

Tabella 5: Criteri di validazione saggio.

	Parametro di validazione	Risultato richiesto
Controllo negativo (SW)	Schiusa delle uova	≥ 80 %
	Immobilizzazione dei nauplii dopo 7 giorni	≤ 30 %
NiCl ₂ *6H ₂ O	EC50 Immobilizzazione dei nauplii dopo 7 giorni	0,015 - 0,079 mg Ni ²⁺ /L
	EC50 Immobilizzazione dei nauplii dopo 48 ore	0,12 - 0,36 mg Ni ²⁺ /L

5. BIBLIOGRAFIA

- Alver M.O., Storøy W., Bardal T., Overrein I., Onsøyen M.K., Tennøy T., Øie G., 2011. Automatic measurement of *Acartia tonsa* nauplii density, and estimation of stage distribution. *Aquaculture* 313: 100–106.
- Andersen H.R., Wollenberger L., Halling-Sørensen B., Kusk K.O., 2001. Development of copepod nauplii to copepodites. A parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environ Toxicol Chem*, 20: 2821–2829.
- Anderson B.S., Hunt J.W., Hester M.M., Phillips B.M., 1996. Assessment of sediment toxicity at the sediment–water interface. In: Ostrander, G.K. (Ed.), *Techniques in Aquatic Toxicology*. Lewis, Ann Arbor, MI, USA, pp. 609–624.
- Anderson B.S., Hunt J.W., Phillips B.M., Fairey R., Puckett H.M., Stephenson M., Taberski K., Newman J., Tjeerdema R.S., 2001. Influence of sample manipulation on contaminant flux and toxicity at the sediment-water interface. *Mar Environ Res* 51, 191–211.
- Araújo C.V.M., Diz F.R., Moreno-Garrido I., Lubián, L.M., Blasco, J., 2008. Effects of cold-dark storage on growth of *Cylindrotheca closterium* and its sensitivity to copper. *Chemosphere* 72 (9), 1366–1372.
- Arciszewski T.J., Hazewinkel R.R., Munkittrick K.R., Kilgour B.W., 2018. Developing and applying control charts to detect changes in water chemistry parameters measured in the Athabasca River near the oil sands: a tool for surveillance monitoring: control charts and water chemistry parameters. *Environ Toxicol Chem* 37 (9), 2296–2311.
- Arciszewski T.J., Munkittrick K.R., Kilgour B.W., Keith H.M., Linehan J.E., McMaster M.E., 2017. Increased size and relative abundance of migratory fishes observed near the Athabasca oil sands. *FACETS* 2 (2), 833–858.
- ASTM, 1994. Standard guide for designing biological tests with sediments. ASTM E1525: 22 pp.
- ASTM, 2004. Standard guide for conducting static acute toxicity test starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. ASTM E724: 21pp.
- ASTM, 2007. Standard guide for conducting sediment toxicity tests with marine and estuarine polychaetous annelids ASTM E1611-00. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. 26 pp.
- Baetens J., 2015. Culturing *Acartia tonsa* Dana and acute testing with copper on different life cycle stages. *Master's thesis*. Ghent University, Faculty of Bioscience Engineering, Belgium.
- Bianchi F., Acri F., Aubry F. B., Berton A., Boldrin A., Camatti E., Cassin D., Comaschi A., 2003. Can plankton communities be considered as bioindicators of water quality in the lagoon of Venice? *Mar Pollut Bull*, 46: 964-971.
- Buttino I., De Rosa G., Carotenuto Y., Mazzaella M., Ianora A., Esposito F., Vitiello V., Quaglia F., La Rotonda M.I., Miralto, A., 2008a. Aldehyde-encapsulating liposomes impair marine grazer survivorship. *J Exp Biol*, 211: 1426-1433.

- Buttino I., Vitiello V., Macchia S., Scuderi A., Pellegrini D., 2018. Larval development ratio test with the calanoid copepod *Acartia tonsa* as a new bioassay to assess marine sediment quality. *Ecotox Environ Safe*, 149: 1–9.
- Buttino I., Vitiello V., Macchia S., Pellegrini D., Gorbi G., 2019. Saggio di sviluppo larvale in presenza di sedimento con il copepode calanoide planctonico *Acartia tonsa* (Dana, 1848). Quaderni di Ecotossicologia. ISPRA, Quaderni - Ricerca Marina n. 13/2019.
- Calliari D., Borg M., Thor P., Gorokhova E., Tiselius P., 2008. Instantaneous salinity reductions affect the survival and feeding rates of the co-occurring copepods *Acartia tonsa* Dana and *A. clausi* Giesbrecht differently. *J Exp Mar Biol Ecol*, 362: 18-25.
- Carotenuto Y., Ianora A., Buttino I., Romano G., Miralto A., 2002. Is post-embryonic development in the copepod *Temora stylifera* negatively affected by diatom diets? *J Exp Mar Biol Ecol*, 276: 49–66.
- Castro-Longoria E., 2001. Comparative observations on the external morphology of subitaneous and diapause eggs of *Acartia* species from Southampton water. *Crustaceana*, 74: 225–236.
- Chen F. and Marcus N.H., 1997. Subitaneous, diapause, and delayed hatching eggs of planktonic copepods from the northern Gulf of Mexico: morphology and hatching success. *Mar Biol*, 127: 587–597.
- Clementson L.A., Wayte S.E., 1992. The effect of frozen storage of open-ocean seawater samples on the concentration of dissolved phosphate and nitrate. *Wat Res* 26 (9): 1171-1176.
- Comaschi A., Aciri F., Bianchi F., Bressan M., Camatti E., 2000. Temporal changes of species belonging to *Acartia* genus [Copepoda: Calanoida] in the Northern Basin of the Venice Lagoon. *Boll Mus Civ Stor Nat Ven*, 50: 189–193.
- Costa, F.O., Neuparth, T., Correia, A.D., Costa, M.H., 2005. Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: II. Organism and population-level endpoints. *Mar Environ Res*, 60, 93–110.
- DD del 3 febbraio 2014 del Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare Pubblicato nella Gazzetta ufficiale del 19 febbraio 2014, n. 41: Definizione delle procedure per il riconoscimento di idoneità dei prodotti assorbenti e disperdenti da impiegare in mare per la bonifica della contaminazione da idrocarburi petroliferi.
- DM 173, 2016. Decreto n. 173 del 15 luglio 2016 del Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare, pubblicato sul Supplemento ordinario n. 208 alla "Gazzetta Ufficiale del 6 settembre 2016 - Serie generale Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini.
- Drillet G., Iversen M.H., Sørensen T.F., Ramløv H., Lund T., Hansen B.W., 2006a. Effect of cold storage upon eggs of a calanoid copepod, *Acartia tonsa* (Dana) and their offspring. *Aquaculture*, 254: 714–729.
- Drillet G., Jørgensen N.O.G., Sørensen T.F., Ramløv H., Hansen B.W., 2006b. Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as relevant live feed organisms in marine larviculture. *Aquac Res*, 37: 756–772.

- Drillet G., Lindley L.C., Michels A., Wilcox J., Marcus N.H., 2007. Improving cold storage of subitaneous eggs of the copepod *Acartia tonsa* Dana from the Gulf of Mexico (USA-Florida). *Aquac Res*, 38: 457–466.
- Drillet G., Goetze E., Jepsen P.M., Højgaard J.K., Hansen B.W., 2008a. Strain-specific vital rates in four *Acartia tonsa* cultures, I: strain origin, genetic differentiation and egg survivorship. *Aquaculture*, 280:109–116.
- Drillet G., Jepsen P.M., Højgaard J.K., Jørgensen N.O.G., Hansen B.W., 2008b. Strain specific vital rates in four *Acartia tonsa* cultures II: life history traits and biochemical contents of eggs and adults. *Aquaculture*, 279:47–54.
- Drillet G., Frouël S., Sichlau M.H., Jepsen P.M., Højgaard J.K., Joarder A.K., Hansen B.W., 2011a. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. *Aquaculture*, 315: 155–166.
- Drillet G., Hansen B.W., Kiørboe T., 2011b. Resting egg production induced by food limitation in the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Limnol Oceanogr*, 56: 2064–2070.
- Eissa M.E., 2016. Shewhart control chart in microbiological quality control of purified water and its use in quantitative risk evaluation. *UK Journal of Pharmaceutical Biosciences* 4 (1), 45–51.
- Environmental Canada, 2011. Biological test method: fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars). EPS 1/RM/27 Second Edition. Science and Technology Branch, Environmental Canada, pp. 140.
- Farabegoli A., Ferrari I., Manzoni C., Pugnetti A., 1989. Prima segnalazione nel Mare Adriatico del copepode calanoide *Acartia tonsa* DANA. *Nova Thalassia*, 10: 207–208.
- Franco S.C., Augustin C.B., Geffen A.J., Dinis M.T., 2017. Growth, egg production and hatching success of *Acartia tonsa* cultured at high densities. *Aquaculture*, 468: 569–578.
- Gaudy R. and Vinas M., 1985. Première signalization en Méditerranée du copépode pélagique *Acartia tonsa*. *Rapp Comm Int Mer Médit*, 29(9): 227–229.
- Gorbi G., Invidia M., Savorelli F., Faraponova O., Giacco E., Cigar M., Buttino I., Leoni T., Prato E., Lacchetti I., Sei S., 2012. Standardized methods for acute and semichronic toxicity tests with the copepod *Acartia tonsa*. *Environ Toxicol Chem*, 31: 2023–2028.
- Grice G.D. and Marcus N.H., 1981. Dormant eggs of marine copepods. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev*, 19: 125–140.
- Hagemann A., Øie G., Evjemo J.O., Olsen Y., 2016. Effects of light and short-term temperature elevation on the 48-h hatching success of cold-stored *Acartia tonsa* Dana eggs. *Aquacult Int*, 24(1): 57–68.
- Hansen B.W. and Drillet G., 2013. Comparative oxygen consumption rates of subitaneous and delayed hatching eggs of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *J Exp Mar Biol Ecol*, 442: 66–69.
- Hansen B.W., Buttino I., Cunha M.E., Drillet G., 2016. Embryonic cold storage capability from seven strains of *Acartia* spp. isolated in different geographical areas. *Aquaculture*, 457: 131–139.

- Holmstrup M., Overgaard J., Sørensen T.F., Drillet G., Hansen B.W., Ramløv H., Engell-Sørensen K., 2006. Influence of storage conditions on viability of quiescent copepod eggs [*Acartia tonsa* Dana]: effects of temperature, salinity and anoxia. *Aquac Res*, 37: 625–631.
- Holste L. and Peck M.A., 2006. The effects of temperature and salinity on egg production and hatching success of Baltic *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida): a laboratory investigation. *Mar Biol*, 148: 1061–1070.
- Hutchinson T.H., Solbe J., Kloepper-Sams P.J., 1998. Analysis of the ecetoc aquatic toxicity (EAT) database III—comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. *Chemosphere* 36, 129–142.
- Ianora A., Poulet S.A., Miralto A., 2003. The effects of diatoms on copepod reproduction. *Phycologia*, 42: 351–363.
- Ianora A., Miralto A., Poulet S.A., Carotenuto Y., Buttino I., Romano G., Casotti R., Pohnert G., Colucci-D'Amato L., Terrazzano G., Smetacek V., 2004. Aldehyde suppression of copepod recruitment in blooms of a ubiquitous planktonic diatom. *Nature*, 429: 403–407.
- ICRAM 2006. Guida al riconoscimento del plancton dei mari italiani. (<http://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/manuali-e-linee-guida/guida-al-riconoscimento-del-plancton-dei-mari>).
- Ihara P.M., Pinho G.L.L., Fillmann G., 2010. Avaliação do copépodo *Acartia tonsa* (Dana, 1849) como organismo-teste para ensaios de toxicidade crônica. *J Braz Soc Ecotoxicol*, 5(1): 27-32.
- Invidia M., Sei S., Gorbi G., 2004. Survival of the copepod *Acartia tonsa* following egg exposure to near anoxia and sulfide at different pH values. *Mar Ecol Prog Ser*, 276: 187–196.
- ISO 14669, 1999. Water quality — Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). ISO, Genève, Switzerland.
- ISO 16712, 2005. Water quality – Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods. ISO, Genève, Switzerland.
- ISO 7870-1, 2014a. Control charts — Part 1: General guidelines. ISO, Genève, Switzerland.
- ISO 7870-2, 2014b. Control charts — Part 2: Shewhart control charts. ISO, Genève, Switzerland.
- ISO 7870-3, 2014c. Control charts — Part 3: Acceptance control charts. ISO, Genève, Switzerland.
- ISO 7870-4, 2014d. Control charts — Part 4: Cumulative sum charts. ISO, Genève, Switzerland.
- ISO 7870-5, 2014e. Control charts — Part 5: Specialized control charts. ISO, Genève, Switzerland.
- ISO 16778, 2015. Water quality-Calanoid copepod development test with *Acartia tonsa*. ISO/FDIS16778. Calanoid copepod early-life stage test with *Acartia tonsa*. ISO, Genève, Switzerland.

ISO 5667-16, 2017. Water quality - Sampling - Part 16: Guidance on biotesting of samples. ISO, Genève, Switzerland.

ISO 5667-3, 2018. Water quality - Sampling - Part 3: Preservation and handling of samples. ISO, Genève, Switzerland.

ISO 5667-10, 2020. Water quality - Sampling - Part 10: Guidance on sampling of waste waters. ISO, Genève, Switzerland.

ISO 10253, 2016. Water quality – Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*. ISO, Genève, Switzerland.

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

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

ISPRA, 2021. Aspetti metodologici finalizzati all'applicazione dei saggi biologici previsti dall'allegato tecnico al D.M. 173/16: protocollo per la preparazione dell'elutriato. Quaderni- Ricerca Marina 16/2021, 91 pp.

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

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

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

Kennedy A.J., Steevens J.A., Lotufo G.R., Farrar J.D., Reiss M.R., Kropp R.K., Doi J., Bridges T.S., 2009. A comparison of acute and chronic toxicity methods for marine sediments. *Mar Environ Res* 68, 118–127.

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

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

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

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

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

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

- Leandro S.M., Tiselius P., Queiroga H., 2006. Growth and development of nauplii and copepodites of the estuarine copepod *Acartia tonsa* from southern Europe (Ria de Aveiro, Portugal) under saturating food conditions. *Mar Biol*, 150: 121–129.
- Lee W., 1977. Some laboratory cultured crustaceans for marine pollution studies. *Mar Poll Bull*, 8 (11): 258–259.
- Libralato G., Losso C., Avezù F., Volpi Ghirardini A., 2009. Influence of the salinity adjustment methods, salts and brine, on the toxicity of wastewater samples to mussel embryos. *Environ Technol* 30: 85-91.
- Lotufo G.R., 1997. Toxicity of sediment-associated PAHs to an estuarine copepod: effect on survival, feeding, reproduction and behavior. *Marine Environmental Research*, Vol 44(2):149-166.
- Marcus N.H. and Wilcox J.A., 2007. A guide to the meso-scale production of the copepod *Acartia tonsa*. Fla. Sea Grant 27. http://www.flseagrant.org/program_areas/aquaculture/copepod/about.htm
- Marshall S.M. and Orr A.P., 1972. The biology of a marine copepod *Calanus finmarchicus* (Gunnerus). Oliver and Boyd, Edingburgh and London.
- Mauchline J., 1998. The Biology of Calanoid Copepods. Elsevier Academic London, UK, pp. 710
- Medina M. and Barata C., 2004. Static-renewal culture of *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) for ecotoxicological testing. *Aquaculture*, 229: 203–213.
- Miralto A., Barone G., Romano G., Poulet S.A., Ianora A., Russo G.L., Buttino I., Mazzarella G., Laabir M., Cabrini M., Giacobbe M.G., 1999. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature*, 402: 173–176.
- Murphy J.A. and Cohen R.E., 1978. A guide to the developmental stages of common coastal, Georges Bank and Gulf of Maine Copepods. National Marine Fisheries Service, Northeast Fisheries Center, Woods Hole Laboratory, Woods Hole, MA 02543, Laboratory Reference No. 78-53.
- Olivotto I., Gaiot G., Holste L., Tulli F., Cardinaletti G., Piccinetti C.C., Gioacchini G., Carnevali O., 2012. Are *Acartia tonsa* cold-stored eggs a suitable food source for the marine ornamental species *Amphiprion polymnus*? A feeding study. *Aquacul Nutr*, 18(6): 685-696.
- Onorati F. and Volpi Ghirardini A., 2001. Informazioni fornite dalle diverse matrici da testare con i saggi biologici: applicabilità di *Vibrio fischeri*. *Biol Mar Medit*, 8(2): 31-40.
- Pane L., Giacco E., Corrà C., Greco G., Mariottini G.L., Varisco F., Faimali M., 2008. Ecotoxicology evaluation of harbour sediments using marine organisms from different trophic levels. *J Soils Sediments* 8 (2): 74-79.
- Parrish K.K. and Wilson D.F., 1978. Fecundity studies on *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) in standardized culture. *Mar Biol*, 46: 65–81.
- Perez-Landa V. and Simpson S.L., 2011. A short life-cycle test with the epibenthic copepod *Nitocra spinipes* for sediment toxicity assessment. *Environ Toxicol and Chemistry*, Vol 30 (6): 1430-1439.

- Picone M., Bergamin M., Delaney E., Volpi Ghirardini A., Kusk K.O., 2018. Testing lagoonal sediments with early life stages of the copepod *Acartia tonsa* (Dana): An approach to assess sediment toxicity in the Venice Lagoon. *Ecotox Environ Safe*, 147(24): 217-227.
- Pinho G.L.L. and Bianchini L., 2010. Acute copper toxicity in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*: implications for the development of an estuarine and marine biotic ligand model. *Environ Toxicol Chem*, 29: 1834–1840.
- Ringwood A.H., 1992. Comparative sensitivity of gametes and early developmental stages of a sea urchin species [*Echinometra mathaei*] and a bivalve species [*Isognomon californicum*] during metal exposures. *Arch Environ Con Tox* 22, 288-295.
- Rotolo F., Vitiello V., Pellegrini D., Carotenuto Y., Buttino I., Historical control data in ecotoxicology: eight years of tests with the copepod *Acartia tonsa*. *Environ Pollut* 284: 117468.
- Savorelli F., Sei S., G. Gorbi, M. Invidia, D. Palazzi, F. Gelli, P.L. Trentini, E. Magaletti. Valutazione della tossicità di prodotti disperdenti: applicazione della metodologia di saggio sugli stadi uovo/nauplio del copepode *Acartia tonsa*. *Biol. Mar. Medit.*, 2006, 13 (1): 1112-1115
- Scheef L.P. and Marcus N.H., 2010. Occurrence and significance of copepod resting egg accumulation in seagrass sediments. *Mar Ecol Prog Ser*, 407:125–134.
- Schipp G.R., Bosmans J.M.P., Marshall A.J., 1999. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*, 174: 81–88.
- Segura-Noguera M., Cruzado A., Blasco D., 2011. Nutrient preservation, analysis precision and quality control of an oceanographic database (inorganic nutrients, dissolved oxygen and chlorophyll a) from the NW Mediterranean Sea. *Sci Mar* 75(2): 321-33.
- Sei S., Rossetti G., Villa F., Ferrari I., 1996. Zooplankton variability related to environmental changes in a eutrophic coastal lagoon in the Po Delta. *Hydrobiologia*, 329: 45-55.
- Sei S., Invidia M., Gorbi G., 2006. Near anoxia and sulfide as possible factors influencing the spatial distribution of *Acartia tonsa* and *Acartia clausi*. Comparative evaluation of egg tolerance. *J Exp Mar Biol Ecol*, 337(2): 121-130.
- Sei S., Invidia M., Giannetto M., Gorbi G., 2016. *Acartia tonsa* eggs as a biomonitor to evaluate bioavailability/toxicity of persistent contaminants in anoxic/sulfidic conditions: The case of cadmium and nickel. *Ecotox Environ Safe*, 132: 1–8.
- Shewhart W.A., 1931. Economic Control of Quality of Manufactured Product. Van Nostrand, D. Inc. Republished by American Society for Quality (1980), New York, 1931.
- Simpson A.L. and Spadaro D.A., 2011. Performance and sensitivity of rapid sublethal sediment toxicity tests with the amphipod *Melita plumulosa* and copepod *Nitocra spinipes*. *Environ Toxicol and Chemistry*, Vol 30 (10), 2326-2334.
- Smeti E.M., Koronakis D.E., Golfinoopoulos S.K., 2007. Control charts for the toxicity of finished water—modeling the structure of toxicity. *Water Res* 41 (12), 2679–2689.
- Støttrup J.G. and Jensen J., 1990. Influence of algal diet on feeding and egg production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *J Exp Mar Biol Ecol*, 141: 87-105.

- Støttrup J.G., 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquac Res*, 31: 703-711.
- Støttrup, J.G., 2006. Review on status and progress in rearing copepods for marine larviculture ñ Advantages and Disadvantages among calanoid, harpacticoid and cyclopoids copepods. In: I.Elizabeth Cruz Suarez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, G. Martha , Nieto Lopez, David A. Villarreal Cavazos, Anna C. Puello Cruz y Armando Garcia Ortega. *Advances en Nutricion Acuicola. VIII Symposium Internacional Acuicola 15-17 Noviembre*, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Mexico.
- Teixeira P.F., Kaminski S.M., Avila T.R., Cardozo A.P., Bersano J.G.F, Bianchini A., 2010. Diet influence on egg production of the copepod *Acartia tonsa*. *An Acad Bras Cienc*, 82(2): 333-339.
- Toledo J.D., Golez M., Ohno A., 2005. Studies on the use of copepods in the semi-intensive seed production of Grouper *Epinephelus coioides*. In: Lee C-S, O'Bryen PJ, Marcus NH (eds) *Copepods in aquaculture*. Blackwell, Iowa, USA.
- UNICHIM, 2012a. M.U. 2366. Qualità dell'acqua. Determinazione dell'inibizione della mobilità di nauplii di *Acartia tonsa* Dana (Crustacea: Copepoda) dopo 7 giorni di esposizione.
- UNICHIM, 2012b. M.U. 2365. Qualità dell'acqua. Determinazione dell'inibizione della mobilità di nauplii di *Acartia tonsa* Dana (Crustacea: Copepoda) 24 h e 48 h di esposizione.
- USEPA/USACE, 1991. Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal: Testing manual. EPA-503/8-91/001, Office of Water, Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS.
- Vitiello V., Zhou C., Scuderi A., Pellegrini D., Buttino I., 2016. Cold storage of *Acartia tonsa* eggs: a practical use in ecotoxicological studies. *Ecotoxicology*, 25: 1033–1039.
- Ward D.J., Perez-Landa V., Spadaro D.A., Simpson S.L., Jolley D.F., 2011. An assessment of three harpacticoid copepod species for use in ecotoxicological testing. *Arch Environ Contam Toxicol* 61:414-425.
- Wilson C.B., 1932. The copepods of the Woods Hole region. Smithsonian Institution United States National Museum Bull. 158. United States Government Printing Office (1972 edition), 635 p.
- Wollenberger L., Breitholtz M., Kusk K.O., Bengtsson B.-E., 2003. Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances. *Sci Total Environ*, 305: 53–64.
- Yardley R.B., Lazorchak, J.M., Pence M.A., 1995. Evaluation of alternative reference toxicants for use in the earthworm toxicity test. *Environ Toxicol Chem* 14 (7), 1189–1194.
- Zhang J., Wu C., Pellegrini D., Romano G., Esposito F., Ianora A., Buttino I., 2013. Effects of different monoalgal diets on egg production, hatching success and apoptosis induction in a Mediterranean population of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *Aquaculture*, 400–401: 65–72.
- Zhang J., Ianora A., Wu C., Pellegrini D., Esposito F., Buttino I., 2015. How to increase productivity of the copepod *Acartia tonsa* (Dana): effects of population density and food concentration. *Aquac Res*, 46: 2982–2990.

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

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

APPENDICE 1 - Panoramica sulle condizioni di allevamento reperite in letteratura

Tabella 5: Condizioni di allevamento dei copepodi

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

¹ Kester et al., 1967

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

² Kusk and Wollenberger, 1999

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

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

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

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

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

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

ND= non disponibile

³ ASTM, 2004

