

# Prevenzione del rischio chimico: dalla sperimentazione alla legislazione

Silvana Galassi<sup>1\*</sup> e Roberta Bettinetti<sup>2</sup>

*1 Dipartimento di Biologia, Università di Milano, Via Celoria 26, 20133 Milano.*

*2 Dipartimento di Scienze Chimiche e Ambientali, Università dell'Insubria, Via Valleggio, 11, 22100 Como.*

\* *Referente per la corrispondenza: silvana.galassi@unimi.it*

*Pervenuto il 29.8.2006; accettato il 8.9.2006*

## RIASSUNTO

Sebbene nell'ultimo trentennio siano stati ottenuti straordinari progressi delle conoscenze in campo ecotossicologico, sia sul piano della sperimentazione di laboratorio sia in quello della modellistica previsionale, la normativa in materia di protezione del patrimonio idrico li ha in gran parte ignorati, continuando a ispirarsi al principio di attenuazione dell'impatto ambientale delle sostanze pericolose piuttosto che alla prevenzione del rischio. La Legge Merli, che per prima stabilì standard di qualità per le acque di scarico, prese in considerazione solo poche categorie di composti come metalli, solventi e pesticidi. Il Testo Unico 152 del 1999 non migliorò il livello di prevenzione del rischio chimico e il Decreto 367 del novembre 2003, che stabilisce gli standard di qualità per un gran numero di sostanze potenzialmente pericolose, è troppo oneroso dal punto di vista analitico per venire realmente applicato nei piani di monitoraggio e potrebbe risultare comunque inadeguato nel caso di sostanze di recente produzione o di neoformazione.

Al di là delle contraddizioni legislative esistenti in materia, che potrebbero aggravarsi in seguito alla recente entrata in vigore del Decreto Legge 152 dell'aprile 2006, una maggiore prevenzione della contaminazione delle acque può essere ottenuta unicamente abbinando le metodologie ecotossicologiche a quelle analitiche per individuare i composti prioritari a livello locale. I vantaggi di questo approccio sono illustrati con alcuni esempi, che mettono in luce l'inadeguatezza dell'attuale sistema di controllo previsto dalla normativa in vigore o in recepimento.

**PAROLE CHIAVE:** obiettivi di qualità / standard di qualità / bioaccumulo / Testo Unico Ambientale / test di ecotossicità

## Prevention of the chemical risk: from testing to legislation

Even if during the last 30 years a great progress has been made in the ecotoxicological field, both in the experimental and in the modelling approaches, the Italian legislation for the protection of the aquatic environment is still lacking, ignoring almost completely the risk assessment aspect. The Merli law, the first which defined the water quality standards for the discharge waters, took into account only some categories of compounds such as metals, solvents and pesticides. The Testo Unico 152/1999 did not improve the prevention and the application of the Decreto 367/2003, which defines the quality standards for a great number of potentially dangerous substances, in the monitoring programmes is too onerous from an analytical point of view and not suitable for the new substances.

Even not considering the existing contradictions in the legislation which could become worse with the new Decreto Legge 152 of April 2006, we think that a better prevention of the water contamination could be achieved combining the ecotoxicological tests with the analytical analyses to find out the priority substances on a local scale. The advantages of this approach are described through some examples showing the unsuitability of the control system of the law in force.

**KEY WORDS:** quality objectives / quality standards / bioaccumulation / Testo Unico Ambientale / ecotoxicity tests

## PREMESSA

Dalla seconda metà del XX secolo sono state introdotte nell'ambiente tra 70.000 e 100.000 molecole che giocano un ruolo molto importante nel progresso tecnologico. Molte di esse hanno migliorato le condizioni di vita, la possibilità di cura delle malattie, le rese dei

raccolti e la disponibilità di prodotti di vasto impiego. Insieme alla percezione dell'indispensabilità di questi composti di sintesi è aumentata, tuttavia, la consapevolezza del rischio potenziale associato alla loro presenza nell'ambiente, nei cibi e nei manufatti. La chimi-

ca del cloro, ad esempio, ha prodotto composti particolarmente stabili come il DDT e i PCB (policlorobifenili) e cancerogeni, come i solventi clorurati, il cui rischio è stato accertato quando ormai la loro diffusione era molto ampia, planetaria in alcuni casi. Per questo, appellandosi al principio precauzionale, Joe Thornton di Greenpeace dal 2000 lancia appelli perché si adotti la politica dello “scarico zero” per il cloro e i suoi derivati (THORNTON, 2000).

Sebbene sia uno dei più temuti tra quelli causati dalle attività umane, forse perché relativamente recente e poco conosciuto, il rischio chimico è uno dei costi da pagare per il mantenimento del nostro stile di vita e l'unico sistema per tenerlo sotto controllo è quello di imparare a valutarlo in modo quantitativo piuttosto che emotivo.

Per la valutazione di ogni tipo di rischio esistono, infatti, metodologie che permettono di determinare la probabilità che una certa azione provochi un danno (è possibile calcolare, ad esempio la probabilità di incidenti, in un certo percorso automobilistico).

Nel caso dei composti chimici, l'analisi del rischio consiste nel mettere a confronto le concentrazioni ambientali con quelle d'effetto. Questo confronto può essere fatto seguendo un approccio modellistico, basato sulla conoscenza delle proprietà chimico-fisiche delle sostanze per prevederne la distribuzione ambientale e sulle relazioni struttura-attività per prevederne gli effetti, o seguendone uno di tipo sperimentale basato sulla misura delle concentrazioni ambientali da una parte e delle concentrazioni che determinano effetti negativi dall'altra.

L'approccio modellistico è più approssimativo, ma offre il vantaggio di pronosticare il comportamento dei potenziali contaminanti nell'ambiente prima che essi vi siano rilasciati e permette, quindi, di rispettare il principio precauzionale. Purtroppo, non sono sempre disponibili tutte le informazioni necessarie per utilizzare i modelli, soprattutto per molecole prodotte prima che le normative a tutela della salute umana e dell'ambiente imponessero l'obbligo dell'etichettatura per le nuove molecole e della registrazione per farmaci e fitofarmaci.

D'altra parte, l'approccio sperimentale, che prevede la misura della concentrazione dei contaminanti nei diversi comparti ambientali, non è sempre applicabile perché si possono verificare casi in cui le concentrazioni d'effetto sono inferiori a quelle rilevabili con gli attuali sistemi analitici. Anche sul fronte degli effetti, del resto, le soglie di sicurezza tendono ad abbassarsi man mano che la sperimentazione viene estesa a un numero maggiore di specie o a *end-point* tossicologici ed ecotossicologici più sensibili.

Per questo la valutazione del rischio deve essere

ritenuta un processo per nulla definitivo e soggetto a continua revisione, sia che si adotti un approccio modellistico, in quanto i modelli possono migliorare la loro predittività aumentando i dati di input, sia che si usi quello sperimentale perché sia gli strumenti analitici sia quelli ecotossicologici possono essere continuamente migliorati.

L'accelerazione impressa allo sviluppo di queste metodologie dipende dallo sforzo scientifico che viene dedicato a questo campo della ricerca scientifica che, se da un lato può avere immediate ripercussioni in campo normativo, dall'altro riceve impulso proprio dalla crescente richiesta di controlli che le leggi in materia di tutela dell'ambiente e della salute impongono.

## LA NORMATIVA A TUTELA DELLA QUALITÀ DELLE ACQUE

I microinquinanti sono stati considerati nella normativa italiana a partire dalla Legge Merli (L. 319/1976) che stabiliva le concentrazioni limite di alcune classi di composti (metalli, solventi, pesticidi) che non dovevano essere superate nelle acque di scarico. Tuttavia, ai progressi straordinari delle conoscenze ottenute in campo ecotossicologico negli anni '70, sia sul piano della sperimentazione di laboratorio sia in quello della modellistica previsionale, non è seguita un'adeguata applicazione alle normative in materia di protezione del patrimonio idrico. Sebbene il Testo Unico sulle Acque (D.Lgs. 152/1999), che riprende la Legge Merli in materia di acque di scarico, includa anche i microinquinanti per attribuire un giudizio di qualità ai corpi idrici, le categorie considerate sono poche e obsolete e prive di soglie di accettabilità.

La Direttiva europea Quadro sulle Acque (Direttiva 60/2000/CE) prevede un elenco di 33 sostanze o gruppi di sostanze per la protezione della vita acquatica che non sono le stesse elencate nel nostro decreto nazionale.

Le concentrazioni accettabili per la protezione della vita acquatica sono dette “*Water Quality Criteria*” (WQC - “Criteri di qualità per le acque”) negli Stati Uniti (STEPHAN *et al.*, 1985), mentre la legislazione europea ha usato il termine “*Water Quality Objective*” (WQO - “Obiettivi di qualità per le acque”) (GALASSI e MARCHETTI, 1992) fino alla più recente Direttiva 60/2000 in cui si fa riferimento a “standard di qualità” per le acque superficiali.

In questa Direttiva, inglobata nel provvedimento del Luglio 2006, denominato Testo Unico Ambientale (D.Lgs. 152/2006), vengono specificate anche le procedure per la fissazione degli standard di qualità, ottenuti mediante l'applicazione di fattori di sicurezza ai valori di tossicità reperibili in letteratura.

Questa procedura non corrisponde a quanto emerge dallo "stato dell'arte" delle conoscenze in campo ecotossicologico e, sebbene offra il vantaggio di una estrema semplicità, ha non poche controindicazioni, soprattutto per i composti a lento accumulo.

Grazie al grande sforzo intrapreso dalle agenzie ambientali di molti Paesi e da gruppi di ricerca pubblica e privata negli ultimi trent'anni, per i metalli in traccia, i pesticidi e altri contaminanti prioritari sono stati definiti valori di WQC e/o obiettivi di qualità molto più attendibili di quelli che possono essere ottenuti con la procedura semplificata della Direttiva 60/2000.

Solo per i composti prioritari individuati in anni più recenti (Decisione 2455/2001/EEC) si dovrebbe far ricorso a procedure di questo tipo fino a che non si renda disponibile un maggior numero di informazioni.

Nel caso del Testo Unico Ambientale del 2006 gli standard di qualità per le sostanze pericolose, non del tutto corrispondenti a quelli della Direttiva 60/2000, sono i medesimi adottati per le acque destinate al consumo umano. Nel caso di sostanze bioaccumulabili, come DDT e composti omologhi, i modelli ecotossicologici e i dati sperimentali dimostrano che questi standard non sono sufficientemente protettivi né per la vita dei pesci né per il consumo umano dei pesci stessi.

Il modello bioenergetico proposto da CONNOLLY e PEDERSEN (1988) consente di calcolare il livello di contaminazione che viene raggiunto nei pesci in condizioni di equilibrio con l'ambiente in cui vivono, considerando sia la bioconcentrazione dalla sola acqua sia la biomagnificazione dovuta all'assunzione del tossico col cibo. In accordo con il modello, il fattore di bioaccumulo ( $BAF_L$ ) espresso su base lipidica aumenta lungo la catena trofica in relazione al coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ( $K_{ow}$ ) del composto e del livello trofico occupato dall'organismo.

Per il pp'DDT, che ha un  $K_{ow}$  di  $1,5 \times 10^6$ , la concentrazione che verrebbe raggiunta nel coregone, pesce zooplanctofago con un contenuto di grassi piuttosto basso, esposto a pp'DDT alla concentrazione corrispondente allo standard di qualità di  $0,1 \mu\text{g/L}$  (Allegato 1 della Parte Terza del, Testo Unico Ambientale 2006), si può calcolare in base alla seguente equazione (BETTINETTI *et al.*, 2006):

$$\begin{aligned} C_{\text{ILDDT coregone}} &= 1548816 \cdot 0,1 \mu\text{g/L} \cdot 5,42 \\ &= 839,4 \text{ mg/kg lipidi} \end{aligned}$$

Questo valore, riportato al peso fresco, come richiesto dalla normativa in vigore in Italia (O.M. 18/7/1990), risulta pari a  $28,5 \text{ mg/kg}$  per la specie considerata, ben 570 volte superiore al limite per il consumo umano che, per i pesci con un contenuto di grassi al di sotto del 5%, è pari a  $0,05 \text{ mg/kg}$  di peso fresco.

Questo esempio potrebbe essere applicato anche ad altri composti bioaccumulabili per i quali gli standard di qualità sinora proposti non sono sufficientemente protettivi. Ma anche qualora gli standard venissero aggiornati, sussiste il problema della complessità della contaminazione chimica e dell'impossibilità di valutare il rischio reale per la vita acquatica e per la salute umana utilizzando rigide liste di priorità e considerando gli individui chimici singolarmente.

Rendere esecutivi i controlli su questi elenchi di sostanze implica costi proibitivi e non garantisce una copertura completa rispetto a sostanze che potrebbero derivare da un uso e da una produzione locale. Gli inquinanti, infatti, possono esercitare effetti additivi o addirittura sinergici se presenti contemporaneamente in un corpo idrico.

Per questi motivi molte organizzazioni internazionali e nazionali per la protezione dell'ambiente propongono un approccio di tipo ecotossicologico per l'individuazione dei composti pericolosi presenti nelle acque, approccio che è stato timidamente recepito nella Legge 152/99 e ignorato nella successiva Direttiva Europea 60 del 2000 come pure nel nuovo Testo Unico Ambientale del 2006.

### TEST DI TOSSICITÀ – METODI DIRETTI PER INDIVIDUARE GLI XENOBIOTICI

Per superare la difficoltà di valutare il rischio dovuto alle miscele complesse di soluti naturali e antropici nell'acqua, si possono utilizzare test biologici che forniscono una misura diretta degli effetti negativi sull'ambiente acquatico.

Questo approccio è stato ampiamente applicato alle acque di scarico (BETOWSKI *et al.*, 1996) per determinare il rapporto di diluizione a cui un rifiuto tossico può essere rilasciato in un corpo d'acqua ricevente.

Indagini ecotossicologiche sono state anche ampiamente utilizzate nel caso di acque superficiali o di falda sia per esposizione diretta degli organismi acquatici a campioni d'acqua filtrati (GALASSI *et al.*, 1992) sia eseguendo test su estratti di campioni d'acqua (SLOOF e VAN KEIJL, 1982; DE ZWART e FOLKERTS, 1990; GALASSI *et al.*, 1993; REINEKE *et al.*, 2002; GALASSI *et al.*, 2004).

Nel primo caso deve essere utilizzato un test di tipo cronico perché la maggior parte degli ambienti acquatici non mostra tossicità acuta. Nel secondo caso si possono invece utilizzare test di breve durata analizzando le risposte di tipo acuto dal momento che i tossici estratti sono sottoposti ai test a concentrazioni più alte rispetto ai campioni originali.

Un ulteriore vantaggio dei saggi biologici su campioni preconcentrati è quello di permettere di identificare le sostanze responsabili degli effetti tossici osser-

vati, affiancando i biotest alle determinazioni analitiche, come mostrato in figura 1 (GALASSI e BENFENATI, 2000).

Anche se fino ad ora non si sono riusciti a giustificare gli effetti tossici misurati con i test di tipo ecotossicologico sugli estratti delle acque superficiali con le determinazioni di tipo analitico, come invece è stato fatto per le acque di scarico, uno *screening* ecotossicologico, che consente di ottenere in poco tempo e a basso costo una valutazione del potenziale rischio chimico, potrebbe consentire di indirizzare il monitoraggio di tipo analitico ai campioni d'acqua più pericolosi, dando anche valide indicazioni del tipo di procedura analitica da adottare (Fig. 1).

Recentemente è stata proposta una procedura di valutazione del rischio per i microinquinanti presenti nelle acque superficiali basata sui rapporti di concentrazione necessari per determinare la mortalità di *Daphnia magna* o l'inibizione della bioluminescenza di *Vibrio fischeri* (GALASSI *et al.*, 2004).

Alla luce di questo si può quindi dire che i test ecotossicologici, oltre ad essere utilizzati per indagini ad ampio raggio per rendere più facili le determinazioni analitiche, potrebbero venire utilizzati direttamente come mezzi per valutare la qualità delle acque.

Alcuni microinquinanti, comunque, possono creare problemi alla vita acquatica e alla salute umana anche a concentrazioni al di sotto dei limiti di rilevabilità e non essere intercettati neppure con i saggi ecotossicologi-

ci.

Per il loro potenziale bioaccumulo, i policlorodifenili, le diossine, gli idrocarburi poliaromatici e altre sostanze chimiche altamente persistenti potrebbero essere pericolosi, soprattutto per l'uomo e per i predatori terminali, anche a concentrazioni particolarmente basse.

Si possono utilizzare i sedimenti e gli organismi bioaccumulatori per il monitoraggio sfruttando anche in questo caso la capacità degli organismi di rispondere in modo olistico e sul lungo periodo all'insieme di tossici.

Il monitoraggio dei sedimenti con metodi biologici è molto importante sia perché essi sono il sito di accumulo principale dei contaminanti persistenti rilasciati nell'ambiente acquatico, sia perché possono essere considerati una potenziale fonte secondaria di contaminazione quando vengano risospesi e trasportati in altri luoghi e/o la sostanza organica in essi contenuta venga degradata.

I test ecotossicologici sui sedimenti rappresentano anche in questo caso un efficace mezzo di indagine per la valutazione della pericolosità dell'insieme dei tossici presenti, dal momento che tengono conto della frazione biodisponibile dei contaminanti e dei loro effetti additivi, meno che additivi o sinergici.

I test sui sedimenti maggiormente standardizzati sono quelli che utilizzano gli oligocheti bentonici *Tubifex tubifex* (BETTINETTI e PROVINI, 2002; BETTINETTI *et*

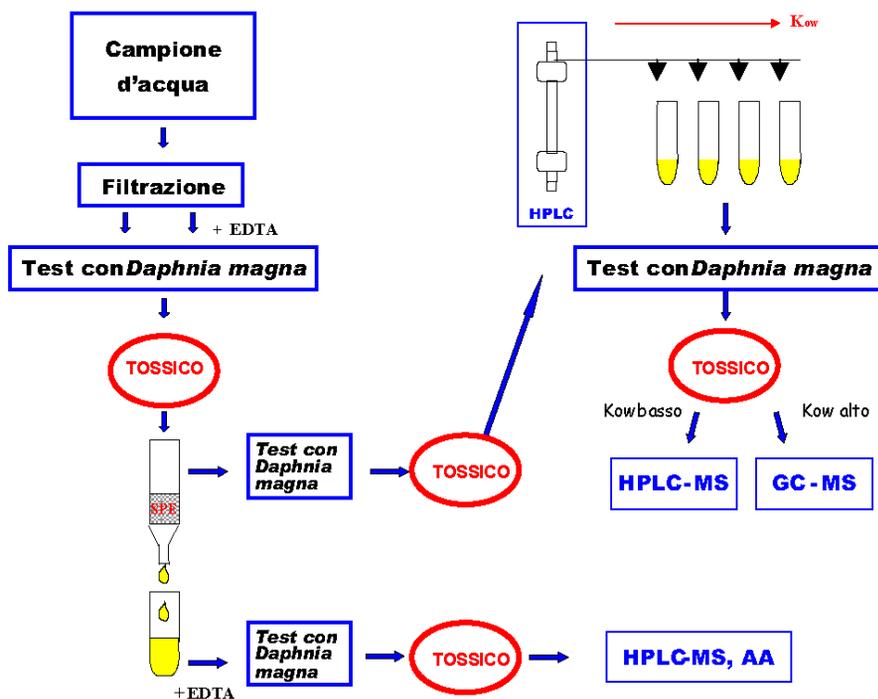


Fig. 1. Schema di un'indagine ecotossicologica per campioni d'acqua.

**Tab. I.** Protocolli dei test per la valutazione della qualità dei sedimenti.

Gruppo tassonomico	Specie	End-point trofico	Livello	Durata	Riferimento bibliografico
Anellida	<i>Tubifex tubifex</i>	Sopravvivenza/riproduzione	Detritivoro	Acuto / subcronico	REYNOLDSON <i>et al.</i> , 1991; OECD, 1998
	<i>Lumbriculus variegatus</i>	Sopravvivenza/riproduzione /crescita	Detritivoro	Acuto / Subcronico	USEPA, 2000
	<i>Pristina leiדי</i>	Sopravvivenza	Detritivoro	Acuto	OECD, 1998
Mollusca	<i>Anodonta imbecillis</i>	Sopravvivenza	Erbivoro	Acuto	OECD, 1998
	<i>Hyalella azteca</i>	Sopravvivenza/riproduzione /crescita	Detritivoro	Acuto / subcronico	OECD, 1998; USEPA, 2000
Insecta	<i>Chironomus riparius</i>	Sopravvivenza/riproduzione /sfarfallamento	Detritivoro	Acuto / subchronic	OECD, 1998; OECD, 2001
	<i>Chironomus tentans</i>	Sopravvivenza/riproduzione /sfarfallamento	Detritivoro	Acuto / subchronic	USEPA, 2000
	<i>Hexagenia limbata</i>	Sopravvivenza	Detritivoro	Acuto	OECD, 1998

*al.*, 2003; CHAPMAN *et al.*, 1998; CHAPMAN, 2001; FISHER *et al.*, 1999; INGERSOLL *et al.*, 2002; LUCAN-BOUCHE *et al.*, 1997, 2003; MARTINEZ-MADRID *et al.*, 1999a; PASTERIS *et al.*, 2003; REYNOLDSON *et al.*, 1991; SIBLEY *et al.*, 1998; VECCHI *et al.*, 1999; WEINSTEIN *et al.*, 2003) e *Lumbriculus variegatus* (INGERSOLL *et al.*, 2003; LEPPANEN e KUKKONEN, 1998, 2000; MAENPAA *et al.*, 2003; EGELER e JUNKER, 2003) e il dittefo *Chironomus riparius* (BETTINETTI *et al.*, 2002; DAY *et al.*, 1994; DE HAAS *et al.*, 2004; HALPERN *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 1999; MAENPAA *et al.*, 2003; MEREGALLI e OLLEVIER, 2001; MEREGALLI *et al.*, 2002; OECD, 2001; WATTS e PASCOE, 2000; WATTS *et al.*, 2003), organismi che hanno un ruolo fondamentale in molti ecosistemi acquatici essendo estremamente diffusi e distribuiti negli ecosistemi d'acqua dolce europei. L'attuale stato dell'arte dei protocolli per svolgere i test ecotossicologici con gli organismi bentonici è riportato in tabella I.

La contaminazione dei sedimenti può essere anche valutata saggiando la tossicità dell'acqua interstiziale e degli elutriati, utilizzando i tradizionali test ecotossicologici normalmente impiegati per i campioni d'acqua. Gli organismi di solito usati a questo scopo sono i crostacei del genere *Daphnia*, specie algali come *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*), i pesci o i batteri (*Vibrio fischeri* utilizzato nel test Microtox) (COTE *et al.*, 1998; MARTINEZ-MADRID *et al.*, 1999b; HYOTYLAINEN e OIKARI, 1999).

I saggi ecotossicologici possono essere considerati affidabili come le determinazioni analitiche quando si seguano le procedure standard e venga testata la sensibilità degli organismi prima di utilizzarli in campagne di monitoraggio. Le procedure per preconcentrare i cam-

pioni d'acqua e per ottenere gli elutriati e gli estratti dei sedimenti richiedono, invece, una fase di intercalibrazione per ottenere una riproducibilità soddisfacente ed assicurare la loro applicabilità alla maggior parte degli ecosistemi acquatici europei. A tal fine sono stati proposti protocolli per la preconcentrazione di acqua e per il trattamento di sedimento (APAT, 2002) da applicare nei programmi di monitoraggio che erano previsti dalla legge corrente in Italia (D.Lgs. 152/99), che include i saggi ecotossicologici come controlli supplementari.

## CONCLUSIONI

La questione principale che si è voluta affrontare con questo contributo è lo scollamento che si è avuto in questi ultimi anni tra le conoscenze scientifiche in materia di rischio chimico –o, più in generale, tra i progressi dell'ecotossicologia– e la normativa ambientale per la tutela e il recupero dei corpi idrici.

Se da un lato si può affermare che le informazioni attualmente disponibili per valutare il rischio chimico sono troppo scarse per consentire una ragionevole valutazione delle soglie di sicurezza, si deve purtroppo constatare che anche le conoscenze disponibili non vengono sfruttate al meglio sotto il profilo legislativo.

C'è poi un aspetto metodologico di fondo: il rischio chimico non può più essere affrontato in modo analitico ma in modo olistico, come solo i metodi ecologici ed ecotossicologici consentono. Anche se la normativa europea fa espressamente riferimento allo "stato ecologico" delle acque, i metodi adottati per la sua definizione si rifanno ancora ad un metodo analitico, del tutto inadeguato nel caso dei contaminanti chimici xenobiotici.

## BIBLIOGRAFIA

- APAT (Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici), 2002. Rapporti, n. 25/2002, 53 pp.
- BETOWSKI L.D., KENDALL D.S., PACE C.M., DONNELT J.R., 1996. Characterization of groundwater samples from superfund sites by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*, **30**: 3558-3564.
- BETTINETTI R., PROVINI A., 2002. Toxicity of 4-nonylphenol to Tubifex tubifex and Chironomus riparius in 28-day whole-sediment tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **53** (1): 113-121.
- BETTINETTI R., CUCCATO D., GALASSI S., PROVINI A., 2002. Toxicity of 4-nonylphenol in spiked sediment to three populations of Chironomus riparius. *Chemosphere*, **46** (2): 201-207.
- BETTINETTI R., GIAREI C., PROVINI A., 2003. Chemical analysis and sediment toxicity bioassays to assess the contamination of the River Lambro (Northern Italy). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **45** (1): 72-78.
- BETTINETTI R., CROCE V., GALASSI S., VOLTA P., 2006. pp'DDT and pp'DDE accumulation in a food chain of Lake Maggiore (Northern Italy): testing steady-state condition. *Environmental Science and Pollution Research*, **13** (1): 59-66.
- CHAPMAN P.M., 2001. Utility and relevance of aquatic oligochaetes in Ecological Risk Assessment. *Hydrobiologia*, **463**: 149-169.
- CHAPMAN P.M., WANG F.Y., JANSSEN C., PERSOONE G., ALLEN H.E., 1998. Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **55** (10): 2221-2243.
- CONNOLLY J.P., PEDERSEN C.J., 1988. A thermodynamic based evaluation of organic chemical accumulation in aquatic organisms. *Environmental Science and Technology*, **22** (1): 99-103.
- COTE C., BLAISE C., MICHAUD J.R., MENARD L., TROTTIER S., GAGNE F., LIFSHTZ R., 1998. Comparisons between micro-scale and whole-sediment assays for freshwater sediment toxicity assessment. *Environmental Toxicity and Water Quality*, **13** (1): 93-110.
- DAY K.E., KIRBY R.S., REYNOLDS T.B., 1994. Sexual dimorphism in *Chironomus riparius* (Meigen): impact on interpretation of growth in whole sediment toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**: 35-39.
- DECRETO LEGISLATIVO 319 DEL 10 MAGGIO 1976. LEGGE MERLI. Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento coordinate con le modifiche ed integrazioni apportate dalla Legge 8/10/1976 n.690, dalla Legge 24/12/1979, n.650, dalla Legge 23/4/1981, n.153. G.U. n.48 del 21/2/1977. *Gazzetta Ufficiale* 29 maggio 1976 n. 141.
- DECRETO LEGISLATIVO 152 DELL'11 MAGGIO 1999. TESTO UNICO SULLE ACQUE. Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole.
- DECRETO MINISTERIALE 367 DEL 6 NOVEMBRE 2003. Regolamento concernente la fissazione di standard di qualità nell'ambiente acquatico per le sostanze pericolose, ai sensi dell'articolo 3, comma 4, del decreto legislativo 11 maggio 1999, n. 152. *GU n. 5 del 8/1/2004*.
- DIRETTIVA QUADRO 2000/60 CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO DEL 23 OTTOBRE 2000.
- DECRETO LEGISLATIVO 152 DEL 3 APRILE 2006. Testo Unico Ambientale.
- DE HAAS E.M., PAUMEN M.L., KOELMANS A.A., KRAAK M.H.S., 2004. Combined effects of copper and food on the midge *Chironomus riparius* in whole-sediment bioassays. *Environmental Pollution*, **127** (1): 99-107.
- DE ZWART D., FOLKERTS A., 1990. Monitoring the toxicity of organic compounds dissolved in Rhine water. *Hydrobiological Bulletin*, **24**: 5-12.
- Egeler P., Junker T., 2003. A study on the toxicity of pentachlorophenol to the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* in the ring test "Sediment-water *Lumbriculus toxicity test using spiked sediment*": 23 pp.
- FISHER S.W., CHORDAS S.W., LANDRUM P.F., 1999. Lethal and sublethal body residues for PCB intoxication in the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Aquatic Toxicology*, **45** (2-3): 115-126.
- GALASSI S., BENFENATI S., 2000. Fractionation and toxicity evaluation of waste waters. *Journal of Chromatography A*, **889**: 149-154.
- GALASSI S., GUZZELLA L., CROCE V., 2004. Screening organic micropollutants in surface waters by SPE extraction and ecotoxicological testing. *Chemosphere*, **54**: 1619-1624.
- GALASSI S., GUZZELLA L., MINGAZZINI M., VIGANÒ L., CAPRI S., 1992. Toxicological and chemical characterization of organic micropollutants in River Po waters (Italy). *Water Research*, **26**: 19-27.
- GALASSI S., MARCHETTI R., 1992. European emission standards and river water quality objectives. In: *River water quality. Ecological Assessment and Control*. ECC EUR 14606 EN-FR, Newman P.J., Piavaux M.A., Sweeting R.A., Eds. Luxembourg: 63-80.
- GALASSI S., MINGAZZINI M., BATTEGAZZORE M. 1993. The use of biological methods for pesticide monitoring. *Science of the Total Environment*, **132**: 399-414.
- HALPERN M., GASITH A., BROZA M., 2002. Does the tube of a benthic chironomid larva play a role in protecting its dweller against chemical toxicants? *Hydrobiologia*, **470** (1-3): 49-55.
- HYOTYLAINEN T., OIKARI A., 1999. The toxicity and concentrations of PAHs in creosote-contaminated lake sediment. *Chemosphere*, **38** (5): 1135-1144.
- INGERSOLL C.G., BRUNSON E.L., WANG N., DWYER E.J., ANKLEY G.T., MOUNT D.R., HUCKINS J., PETTY J., LANDRUM P.E., 2003. Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22** (4): 872-885.

- INGERSOLL C.G., MACDONALD D.D., BRUMBAUGH W.G., JOHNSON B.T., KEMBLE N.E., KUNZ J.L., MAY T.W., WANG N., SMITH J.R., SPARKS D.W., IRELAND D.S., 2002. Toxicity assessment of sediments from the Grand Calumet River and Indiana Harbor Canal in Northwestern Indiana, USA. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **43** (2): 156-167.
- LEPPANEN M.T., KUKKONEN J.V.K., 1998. Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Muller). *Hydrobiologia*, **377**: 183-194.
- LEPPANEN M.T., KUKKONEN J.V.K., 2000. Fate of sediment-associated pyrene and benzo-a-pyrene in the freshwater oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Muller). *Aquatic Toxicology*, **49** (3): 199-212.
- LUCAN-BOUCHE M.L., BIAGIANTI-RISBOURG S., HABETS F., VERNET G., 1997. Experimental study of the lethal effects induced by copper and lead on the Oligochaeta *Tubifex tubifex*. *Bulletin de la Société Zoologique Frances*, **122** (4): 389-392.
- LUCAN-BOUCHE M.L., ARNOULT F., VERNET G., 2003. Caudal regeneration in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) following copper exposure. *Invertebrate Biology*, **122** (1): 42-51.
- MAENPAA K.A., SORMUNEN A.J., KUKKONEN J.V.K., 2003. Bioaccumulation and toxicity of sediment associated herbicides (ioxynil, pendimethalin, and bentazone) in *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Insecta). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **56** (3): 398-410.
- MARTINEZ-MADRID M., RODRIGUEZ P., PEREZ-IGLESIAS J.I., 1999a. Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion River (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology*, **8** (2): 111-124.
- MARTINEZ-MADRID M., RODRIGUEZ P., PEREZ-IGLESIAS J.I., 1999b. Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion River (Northern Spain). 1. Three-brood sediment chronic bioassay of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology*, **8** (2): 97-109.
- MEREGALLI G., OLLEVIER F., 2001. Exposure of *Chironomus riparius* larvae to 17 alpha-ethynylestradiol: effects on survival and mouthpart deformities. *Science of the Total Environment*, **269** (1-3): 157-161.
- MEREGALLI G., BETTINETTI R., PLUYMERS L., VERMEULEN A.C., ROSSARO B., OLLEVIER F., 2002. Mouthpart deformities and nucleolus activity in field-collected *Chironomus riparius* larvae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **42** (4): 405-409.
- OECD, 1998. *Detailed Review Paper on Aquatic Testing Methods for Pesticides and Industrial Chemicals*. OECD Series on testing and assessment, Number 11, 260 pp.
- OECD, 2001. *Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment*. OECD guidelines for the testing of chemicals. Proposal for a new guideline 218.
- PASTERIS A., VECCHI M., REYNOLDS T.B., BONOMI G., 2003. Toxicity of copper-spiked sediments to *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae): a comparison of the 28-day reproductive bioassay with a 6-month cohort experiment. *Aquatic Toxicology*, **65** (3): 253-265.
- REINEKE N., BESTER K., HUHNERFUSS H., JASTORFF B., WEIGEL S., 2002. Bioassay-directed chemical analysis of River Elbe surface water including large volume extractions and high performance fractionation. *Chemosphere*, **47**: 717-723.
- REYNOLDS T.B., THOMPSON S.P., BAMSEY J.L., 1991. A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **10**: 1061-1072.
- RIBEIRO R., KELLY L.A., GONCALVES F., BURTON G.A., SOARES A.M.V.M., 1999. New artificial sediment for *Chironomus riparius* toxicity testing. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **63** (6): 691-697.
- SIBLEY P.K., DIXON D.G., BARTON D.R., 1998. Environmental assessment of benthic impacts associated with pulp mill discharges. II. Distribution of sediment EOX in relation to environmental factors. *Environmental Contamination and Toxicology*, **34** (2): 158-166.
- SLOOF W., VAN KEIJL C.F., 1982. 1. Monitoring the river Rhine and Meeuse in the Netherlands for mutagenic activity using the Ames test in combination with rat of fish liver homogenates. *Aquatic Toxicology*, **2**: 89-98.
- STEPHAN C.E., MOUNT D.I., HANSEN D.J., GENTILE J.H., CHAPMAN G.A., BRUNGS W.A., 1985. *Guidelines for deriving numerical national water quality criteria for the protection of aquatic organisms and their uses*. PB85-227049. US Environmental Protection Agency.
- THORNTON, J., 2000. *Pandora's Poison: Chlorine, Health, and New Environmental Strategy* (Cambridge, Mass: MIT Press) 10.
- USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 2000. *Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*. Second Edition: 192 pp.
- VECCHI M., REYNOLDS T.B., PASTERIS A., BONOMI G., 1999. Toxicity of copper-spiked sediments to *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae): comparison of the 28-day reproductive bioassay with an early-life-stage bioassay. *Environmental Toxicology Chemistry*, **18** (6): 1173-1179.
- WATTS M.M., PASCOE D. 2000. Comparison of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera: Chironomidae) for assessing the toxicity of sediments. *Environmental Toxicology Chemistry*, **19** (7): 1885-1892.
- WATTS M.M., PASCOE D., CARROLL K., 2003. Exposure to 17 alpha-ethynylestradiol and bisphenol A-effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **54** (2): 207-215.
- WEINSTEIN J.E., SANGER D.M., HOLLAND A.F., 2003. Bioaccumulation and toxicity of fluoranthene in the estuarine oligochaete *Monopylephorus rubroniveus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **55** (3): 278-286.

