

ATTI DELL' 11a EDIZIONE DELLE GIORNATE DI STUDIO RICERCA E APPLICAZIONE DI METODOLOGIE ECOTOSSICOLOGICHE: IMPOSSIBILE FARNE A MENO. RAGIONI SCIENTIFICHE E DI GESTIONE OPERATIVA

26-28 novembre 2024

Camera di commercio, Piazza del Municipio, 48 Livorno

**ATTI DELL' 11a EDIZIONE
DELLE GIORNATE DI STUDIO
RICERCA E APPLICAZIONE
DI METODOLOGIE
ECOTOSSICOLOGICHE:
IMPOSSIBILE FARNE A MENO.
RAGIONI SCIENTIFICHE
E DI GESTIONE OPERATIVA**

26-28 novembre 2024

Camera di commercio

Piazza del Municipio, 48 Livorno

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 questa pubblicazione.

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

ISPRA, ATTI 2025
ISBN 978-88-448-1270-6

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

Grafica di copertina: Alessia Marinelli - ISPRA – Area Comunicazione Ufficio Grafica
ISPRA – Area Comunicazione

Coordinamento pubblicazione online:

Daria Mazzella
ISPRA – Area Comunicazione

GIUGNO 2025

A cura di

Cristian Mugnai

(ISPRA, Centro Nazionale per la Caratterizzazione Ambientale e la Protezione della Fascia Costiera e l'Oceanografia Operativa)

Veronica Piazza

(CNR - Istituto per lo Studio degli Impatti Antropici e Sostenibilità in ambiente marino, Genova)

L' XI edizione delle Giornate di Studio (Livorno, 26-28 novembre 2024) ha riscosso un notevole successo, registrando un'affluenza di oltre 150 partecipanti (con un'ampia rappresentanza di giovani) e con la presentazione di 25 comunicazioni scientifiche e 18 poster. Le otto sessioni hanno affrontato il ruolo dell'ecotossicologia rispetto a temi quali: i cambiamenti globali ed i contaminanti emergenti; le applicazioni nell'ambito dei DM 173/2016 e DM 86/2023; la gestione di sedimenti, suoli, acque interne e di falda; il ruolo e la collaborazione tra laboratori pubblici e privati ed il loro sviluppo negli ultimi anni; infine, le proposte innovative in campo ambientale.

Di seguito si riportano i contributi tecnico-scientifici i cui autori hanno autorizzato la pubblicazione.

Ringraziamenti

Si ringraziano per il prezioso supporto tutti gli autori degli atti

Un particolare ringraziamento a David Pellegrini (ISPRA), Marta Ulte (Ecotox) e Stefano Ceriati (Ecotox) per aver contribuito in prima persona alla buona riuscita di questa XI Edizione delle Giornate di Studio.

Sommario

1 Sviluppo di una strategia integrata per la valutazione ecotossicologica degli ecosistemi acquatici urbani soggetti a cambiamenti climatici	7
1.1 Introduzione	7
1.2 Materiali e metodi	8
1.2.1 Monitoraggio	8
1.2.2 Metodi	8
1.2.3 Analisi dei dati	8
1.3 Risultati pregressi e Sviluppi Futuri	8
1.4 Conclusioni	9
1.5 Bibliografia	9
2 Applicazione di un approccio multilivello per la caratterizzazione dei sedimenti fluviali del Sito di Interesse Nazionale di Bussi sul Tirino	11
2.1 Introduzione	11
2.2 Materiali e metodi	11
2.3 Risultati indagine chimica	12
2.4 Risultati indagini ecotossicologiche	12
2.5 Discussione e conclusioni	13
2.6 Bibliografia	13
3 Effetto dello stress salino in <i>Chenopodium quinoa</i>: valutazione di parametri citogenetici, di crescita e del contenuto di sostanze antiossidanti in prese.nza di biostimolanti microalgali	15
3.1 Introduzione	15
3.2 Materiali & Metodi	15
3.2.1 Materiale vegetale e trattamenti	15
3.2.2 Analisi citogenetiche	16
3.2.3 Determinazioni spettrofotometriche e fluorimetriche	16
3.3 Risultati e Discussione	16
3.4 Conclusioni	17
3.5 Bibliografia	17
4 Un approccio multi-biomarker evidenzia le diverse risposte fisiologiche del gheppio comune (<i>Falco tinnunculus</i>) ad ambienti caratterizzati da un diverso impatto antropico	19
4.1 Introduzione	19
4.2 Materiali e metodi	20
4.3 Risultati	20
4.4 Conclusioni	21
4.5 Bibliografia	21
5 Ecotossicità di terre e rocce da scavo condizionate con agenti schiumogeni: prodotti commerciali di vecchia e nuova generazione	22
5.1 Compatibilità ambientale di terre e rocce da scavo	22

5.2	Biodegradazione degli agenti schiumogeni	23
5.3	Composti di "vecchia" e "nuova" generazione	24
5.4	Conclusioni	24
5.5	Bibliografia	25
6	Esposizione al bismuto di specie modello dell'ambiente dulcaquicolo: valutazione di effetti tossici a livello morfo-fisiologico e genetico	27
6.1	Introduzione	27
6.2	Materiali & Metodi	28
6.2.1	Lemna minor – Crescita e trattamento sperimentale	28
6.2.2	Echinogammarus veneris – Crescita e trattamento sperimentale	28
6.2.3	Analisi chimica del contenuto di bismuto	28
6.3	Risultati	28
6.4	Discussione	29
6.5	Conclusioni	30
6.6	Bibliografia	30
7	L'ecotossicologia nel controllo delle acque di un impianto di acquaponica salata	31
7.1	Introduzione	31
7.2	Materiali e metodi	31
7.3	Risultati	32
7.3.1	Saggio di fecondazione con riccio di mare <i>Paracentrotus lividus</i>	32
7.3.2	Saggio con <i>Isocrysis galbana</i>	32
7.4	Discussione e Conclusioni	33
7.5	Ringraziamenti	33
7.6	Bibliografia	34
8	Valutazione dello stato di salute di <i>Apis mellifera</i> in relazione all'utilizzo di fitofarmaci in viticoltura tramite un approccio multi-biomarker	35
8.1	Introduzione	35
8.2	Materiali e metodi	36
8.3	Risultati e discussioni	36
8.4	Conclusioni	38
8.5	Bibliografia	38
9	Test ecotossicologici su sedimenti d'acqua dolce: training sugli invasi lombardi	39
9.1	Introduzione	39
9.2	Approcci e risultati	40
9.3	Conclusioni	41
9.4	Bibliografia	41
10	Percorso verso la definizione di soglie nazionali per la valutazione degli effetti dei contaminanti sulla specie ittica <i>Mullus barbatus</i>	42
10.1	Introduzione	42

10.2	Materiali e metodi	43
10.3	Risultati	43
10.4	Discussione e Conclusioni	43
10.5	Bibliografia	44
11	Ammonio come fattore d'interferenza nei saggi biologici: dal quaderno ISPRA a casi di studio e nuove prospettive	45
11.1	Introduzione	45
11.2	Materiali e Metodi	45
11.3	Risultati e Discussione	47
11.4	Conclusioni	47
11.5	Bibliografia	47
12	Testare nuovi strumenti per la valutazione della qualità ambientale nei Porti Euro-mediterranei: approccio WOE nel Progetto TREASURE	48
12.1	Introduzione	48
12.2	Materiali e Metodi	49
12.3	Risultati e Discussione	49
12.4	Conclusioni	49
12.5	Bibliografia	50
13	Nuovi End Point e sistemi di tipo Early Warning per il monitoraggio ambientale	51
13.1	Introduzione	51
13.2	Materiali e metodi	52
13.2.1	Sistema per il rilevamento del movimento dello stadio adulto del crostaceo <i>A. amphitrite</i>	52
13.2.2	Sistema automatizzato per la registrazione del nuoto di larve di invertebrati acquatici	52
13.3	Risultati	52
13.3.1	Sistema per il rilevamento del movimento dello stadio adulto del crostaceo <i>A. amphitrite</i>	52
13.3.2	Sistema automatizzato per la registrazione del nuoto di larve di invertebrati acquatici	53
13.4	Discussione e conclusioni	53
13.5	Bibliografia	54
14	L'approccio ecotossicologico nella proposta di linee guida per la definizione delle terre da coltivo ottenute dal risanamento biologico di rifiuti terrosi	55
14.1	La nuova prassi di riferimento UNI (PdR)	55
14.1.1	Obiettivi	55
14.1.2	Criteri di qualità ambientale: i criteri di qualità ecotossicologica	55
14.2	Analisi preliminari: Saggi ecotossicologici con <i>Eisenia fetida/andrei</i> e <i>Folsomia candida</i> (test di evitamento)	56
14.2.1	Dataset e Metodi	56
14.3	Risultati	56
14.4	Prospettive future	57
14.5	Bibliografia	57

15 Saggio di tossicità con <i>Phaeodactylum tricornutum</i> su tossico cieco secondo il protocollo standard ISO 10253:2016 – Prima prova valutativa interlaboratorio	58
15.1 Introduzione	58
15.2 Materiali e Metodi	58
15.2.1 Materiali di prova	58
15.2.2 Valori Assegnati	59
15.2.3 Elaborazione statistica e criteri di valutazione dell'accettabilità dei risultati	59
15.3 Risultati	59
15.3.1 Partecipazione	59
15.3.2 Valori Assegnati	59
15.3.3 Analisi dei risultati	59
15.3.4 Valutazione preliminare delle varianti metodologiche impiegate	60
15.4 Discussione	61
15.5 Conclusioni	61
15.6 Bibliografia	61
16 Ecotossicologia della matrice aria: a che punto siamo?	62
16.1 Introduzione	62
16.2 Lo stato dell'arte della letteratura scientifica	63
16.2.1 Modelli biologici	63
16.2.2 Scala e ambito di studio	63
16.3 Allestimento sperimentale	63
16.3.1 VOC	63
16.3.2 Durata e endpoint	64
16.4 Conclusioni e prospettive future	64
16.5 Bibliografia	65

1 Sviluppo di una strategia integrata per la valutazione ecotossicologica degli ecosistemi acquatici urbani soggetti a cambiamenti climatici

M. Barra ^{a,b}, M. Carere ^a, I. Lacchetti ^a, L. Mancini ^a

a ISS- Italian National Institute of Health, *Department of Environment and Health*, EcoHealth Unit, IT-00161 Rome - melissa.barra@iss.it

b Università degli Studi di Roma "La Sapienza", *Dipartimento di Sanita' Pubblica e Malattie Infettive*, IT-00161 Rome - melissa.barra@uniroma1.it

Abstract -. L'intensificazione dell'urbanizzazione e dei cambiamenti climatici contribuisce in modo sinergico all'inquinamento chimico, con impatti significativi sulla salute e sulla biodiversità nelle aree urbane. Gli eventi meteorologici estremi, come inondazioni e siccità, amplificano la dispersione di contaminanti emergenti, tra cui farmaci, pesticidi e PFAS, nei corpi idrici urbani. I recenti episodi di morie di pesci nel fiume Tevere dopo intense precipitazioni evidenziano l'urgenza di una strategia di gestione integrata che affronti sia l'inquinamento chimico sia gli impatti climatici.

La strategia proposta prevede un monitoraggio ecotossicologico nel bacino idrografico del Tevere, con particolare attenzione al tratto urbano, attraverso un'analisi dettagliata dei contaminanti e dei loro effetti su diversi livelli trofici. Il progetto include il campionamento in condizioni climatiche differenti, analisi chimiche avanzate e test ecotossicologici su specie modello.

1.1 Introduzione

I cambiamenti climatici e gli eventi meteorologici estremi che ne derivano, stanno evidenziando la vulnerabilità delle aree urbane sempre più esposte a questi impatti, facendone emergere le fragilità sia dal punto di vista socio-economico che ambientale. Il cambiamento climatico amplifica i rischi per la salute umana e gli ecosistemi, intensificando eventi estremi come alluvioni, ondate di calore e siccità (Mancini et al., 2017; IPCC report 2023).

L'ecosistema urbano presenta caratteristiche peculiari come superfici asfaltate o cementificate, le emissioni del traffico veicolare, degli impianti industriali e dei sistemi di condizionamento, che determinano il noto fenomeno di "isola di calore", condizioni che portano a rilevare temperature mediamente superiori tra gli 0,5°C e i 3 °C.

Le improvvise e intense precipitazioni alternate a lunghi periodi di siccità, amplificano, inoltre, la dispersione dei contaminanti nei corpi idrici nei tratti urbani, attraverso il deflusso di acque reflue e piovane, contenenti sostanze spesso non monitorate (Erickson et al., 2019). La deposizione atmosferica di contaminanti chimici derivanti ad esempio dai gas di scarico delle autovetture, dalle caldaie dei grandi condomini, o dai fumi delle attività commerciali (ristorazione, copisterie, etc..) o industriali, giocano un ruolo rilevante, con effetti critici su ecosistemi già soggetti a molteplici pressioni ambientali (Alshamsi et al., 2023). L'importanza di gestire tali emergenze in maniera integrata e sostenibile è anche sottolineata dagli stati membri nella Agenda dello sviluppo sostenibile 2030 (2015) con un focus di attenzione all'uso sostenibile delle risorse idriche urbane. L'Unione Europea, con la Direttiva 2000/60/CE (WFD), mira a garantire un buono stato chimico ed ecologico delle acque superficiali e sotterranee, anche in aree urbane (European Union, 2000). Tuttavia, gli effetti sinergici tra contaminanti restano difficili da prevedere (Ginebreda et al., 2014). Nuove metodologie innovative, come gli "effect-based methods", possono migliorare il rilevamento di questi effetti (Brack et al., 2018).

È quindi fondamentale sviluppare strategie per la gestione degli ecosistemi urbani, gli effetti dei cambiamenti climatici sulla possibile contaminazione e alterazione della qualità delle acque superficiali.

1.2 Materiali e metodi

Per valutare l'inquinamento chimico ed ecosistemico urbano e le variazioni dovute a eventi climatici estremi, sarà adottata una strategia di monitoraggio integrato chimico-ecotossicologico sul tratto urbano del fiume Tevere a Roma e del suo bacino idrografico (Fig.1) che prevedrà una serie di azioni:

1.2.1 Monitoraggio

Il monitoraggio sarà condotto in punti strategici del Tevere, dell'Aniene e di altri ecosistemi urbani, selezionati in base alla loro rilevanza ecologica e all'impatto degli eventi meteorologici estremi. Le campagne di campionamento verranno effettuate sia in condizioni di siccità sia durante eventi di precipitazione intensa, includendo anche il prelievo di campioni da serbatoi di raccolta delle acque piovane per confronto con altri corpi idrici. Il monitoraggio sarà svolto con una frequenza regolare, tenendo conto delle condizioni stagionali e delle variazioni delle precipitazioni registrate negli anni precedenti, in un'ottica di analisi degli effetti dei cambiamenti climatici. Inoltre, saranno analizzati tratti urbani con differenti livelli di impatto antropico per valutare la variabilità della contaminazione. Lo studio comprenderà anche un'analisi dettagliata della rete fognaria della città, poiché eventi di piena possono favorire il trasporto di sostanze chimiche nei corsi d'acqua, influenzandone la qualità e la distribuzione degli inquinanti.

1.2.2 Metodi

I campioni d'acqua saranno sottoposti ad analisi chimiche per rilevare inquinanti emergenti. Test ecotossicologici su specie di diversi livelli trofici (alghe, crostacei, embrioni di pesci) saranno effettuati per valutare una serie di endpoints: embrio-tossicità, genotossicità, neurotossicità e teratogenicità. I test di coiling e di attività locomotoria su *Danio rerio* permetteranno di valutare gli effetti subletali e cronici degli inquinanti, fornendo risposte immediate su possibili effetti sinergici o sulla presenza di sostanze emergenti con effetti ancora sconosciuti. Ulteriori studi saranno effettuati sull'accumulo e la diluizione degli inquinanti prima e dopo gli eventi di pioggia, prevedendone la distribuzione in base alle condizioni climatiche. Inoltre saranno anche svolte analisi delle comunità ittiche per valutare gli effetti di fenomeni climatici estremi sulla biodiversità fluviale.

1.2.3 Analisi dei dati

Nell'ambito del progetto è previsto lo sviluppo di modelli matematici per prevedere la distribuzione degli inquinanti in scenari climatici diversi, individuando aree a rischio e supportando interventi di gestione ambientale. Questi modelli saranno elaborati integrando dati chimici, idrologici e meteorologici per ottenere previsioni più accurate sull'andamento degli inquinanti in relazione a eventi climatici estremi come siccità e precipitazioni intense. L'analisi sarà supportata dall'uso di strumenti computazionali avanzati e algoritmi, che consentiranno di affinare le previsioni identificando pattern di dispersione e accumulo delle sostanze chimiche.

1.3 Risultati pregressi e Sviluppi Futuri

Durante eventi di moria di pesci avvenuti nel tratto urbano del Tevere nel 2020 e 2021, erano stati rilevati diversi contaminanti, anche se a basse concentrazioni, tra cui insetticidi (es. cipermetrina) farmaci (es. carbamazepina) e PFAS (Carere et al., 2023). Nell'ambito dello studio i test ecotossicologici condotti su zebrafish avevano evidenziato tassi di mortalità del 35-40%, con effetti subletali quali depigmentazione, deformazioni della colonna vertebrale ed edema cardiaco. Per ampliare la valutazione dell'impatto ecosistemico, verranno utilizzate altre specie modello, tra cui crostacei e alghe. L'obiettivo è quello di comprendere meglio gli effetti combinati derivanti dall'interazione tra contaminanti emergenti e condizioni climatiche sempre più estreme.

Campionamenti più estesi nelle zone del Tevere e dell'Aniene consentiranno di caratterizzare la distribuzione degli inquinanti in un ambiente urbano complesso come quello della città di Roma.

Durante il progetto, verrà sviluppata una strategia integrata per supportare i decisori politici a livello locale e nazionale. Il progetto porterà alla definizione di linee guida basate sui risultati della ricerca, favorendo una gestione sostenibile degli ecosistemi urbani e approfondendo l'impatto dei contaminanti emergenti, come i prodotti farmaceutici, anche a basse dosi e in miscele complesse.

1.4 Conclusioni

I risultati consentiranno di definire linee guida per la gestione degli inquinanti chimici in contesti urbani, contribuendo alla riduzione dell'inquinamento e all'adozione di misure di emergenza in caso di eventi estremi. Lo studio inoltre permetterà di comprendere meglio i meccanismi di diffusione e rilascio dei contaminanti in seguito a eventi meteorologici estremi. A livello normativo, sarà possibile individuare strategie efficaci per la gestione dell'inquinamento urbano, identificando punti critici di accumulo delle sostanze chimiche. Tale studio consentirà di incentivare l'adozione di sistemi di trattamento avanzati nelle reti fognarie urbane, al fine di ridurre il carico di inquinanti prima del loro rilascio nei corpi idrici.

Fig 1 – Approccio metodologico per monitorare l'inquinamento urbano e gli impatti climatici sugli ecosistemi acquatici, includendo campionamento ambientale, analisi ecotossicologiche, modelli predittivi e supporto legislativo



1.5 Bibliografia

- Alshamsi, A. M. O., Tatan, B. M., Ashoobi, N. M. S., & Mortula, M. M. (2022). Emerging Pollutants of Water Supplies and the Effect of Climate Change. *Environmental Reviews*. <https://doi.org/10.1139/er-2021-0097>.
- Brack, W., Escher, B. I., Muller, E., Schmitt-Jansen, M., Schulze, T., Slobodnik, J., & Hollert, H. (2018). Towards a holistic and solution-oriented monitoring of chemical status of European water bodies: How to support the EU strategy for a non-toxic environment? *Environmental Sciences Europe* 31,30–33. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0161-1>.
- Carere, M., Lacchetti, I., di Domenico, K., Cristiano, W., Mancini, L., De Felip, E., Ingelido, A. M., Massei, R., & Tancioni, L. (2023). Fish-Kills in the Urban Stretch of the Tiber River After a Flash-Storm: Investigative Monitoring with Effect-Based Methods, Targeted Chemical Analyses, and Fish Assemblage Examinations. *Water, Air, & Soil Pollution*, 234(3). <https://doi.org/10.1007/s11270-023-06102-4>.
- Erickson, T. B., Brooks, J., Nilles, E. J., Pham, P. N., & Vinck, P. (2019). Environmental health effects attributed to toxic and infectious agents following hurricanes, cyclones, flash floods and major hydrometeorological events. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 22(5-6), 157–171. <https://doi.org/10.1080/10937404.2019.1654422>.
- European Union. (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council (10/ 23/ 2000). 2000, Official Journal (OJ L 327). Available from: <http://data.europa.eu/eli/dir/2000/60/oj>.
- Ginebreda, A., Kuzmanovic, M., Guasch, H., de Alda, M. L., López-Doval, J. C., Muñoz, I., Ricart, M., Romani, A. M., Sabater, S., & Barceló, D. (2014). Assessment of multi-chemical pollution in aquatic ecosystems

using toxic units: Compound prioritization, mixture characterization and relationships with biological descriptors. *Science of The Total Environment*, 468-469, 715–723. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.086>.

IPCC, 2023: Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, pp. 1-34, doi: 10.59327/IPCC/AR6-9789291691647.001.

Mancini, L., Marcheggiani, S., Puccinelli, C., Lacchetti, I., Carere, M., & Bouley, T., (2017). Global environmental changes and the impact on human health and ecosystems. "Energia, Ambiente e Innovazione", July-September 2017. <https://doi.org/10.12910/EAI2017-057>.

2 Applicazione di un approccio multilivello per la caratterizzazione dei sedimenti fluviali del Sito di Interesse Nazionale di Bussi sul Tirino

A. Diligenti ^a, G. Marinelli ^a, A. Arizzi Novelli ^b

a Arpa Abruzzo Distretto Provinciale di Chieti - a.diligenti@artaabruzzo.it, g.marinelli@artaabruzzo.it

b Arpa Abruzzo Distretto Provinciale di Pescara- a.arizzi@artaabruzzo.it

Abstract - Il SIN di Bussi sul Tirino comprende quattro macroaree discontinue, poste lungo la vallata del Fiume Pescara, interessando 11 comuni tra le provincie di Pescara e Chieti. In ragione del possibile impatto dei contaminanti sui corsi d'acqua, nel piano della caratterizzazione delle aree pubbliche, elaborato ed attuato dal Distretto di Chieti dell'Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale, è stata prevista, in 26 transetti, anche la caratterizzazione dei sedimenti fluviali, delle acque superficiali e delle specie arboree disponibili (phytoscreening). Le analisi sono state eseguite sul sedimento tal quale con il crostaceo *Heterocypris incongruens* e sulla matrice acquosa elutriato con l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, e con il crostaceo *Daphnia magna*. Nel fiume Tirino sono state rinvenute concentrazioni di mercurio nei sedimenti, fino ad un massimo di 7 g/kg, oltre alla presenza di rifiuti in alveo fino alla massima profondità raggiunta dalle perforazioni (4.5 m), nel tratto a valle del polo chimico. Inoltre, sono state ottenute evidenze di stress correlato alla presenza di contaminanti in base agli esiti della batteria dei saggi ecotossicologici applicata. La presenza di elevate concentrazioni di contaminanti nei sedimenti oltre ai rifiuti in alveo, rendono necessaria l'adozione di adeguate misure di prevenzione. In aggiunta, al fine di indirizzare le scelte progettuali di intervento in termini di bonifica e di gestione della contaminazione, è fondamentale ampliare il dibattito sulla gestione delle problematiche riscontrate, contemplando la contaminazione anche in termini di impatto complessivo sull'ecosistema fluviale.

2.1 Introduzione

Il SIN di Bussi sul Tirino è stato formalmente istituito nel 2008 a seguito dell'individuazione di un esteso impatto sulle matrici ambientali, legato alla presenza di diverse discariche abusive, che ha interessato le aree ricadenti nel bacino fluviale dell'Aterno-Pescara. Nel 2014, ARTA Abruzzo è stata incaricata, attraverso la sottoscrizione di un accordo di programma con la Regione Abruzzo e il Ministero dell'Ambiente, per la redazione del Piano di Caratterizzazione e della successiva realizzazione delle indagini ambientali delle aree pubbliche ricadenti nel perimetro del SIN. Il perimetro del SIN comprende quattro macroaree discontinue, poste lungo la vallata del fiume Pescara, per un'estensione complessiva di 235 ettari su una lunghezza di 9 Km, interessando 11 comuni tra le provincie di Pescara e Chieti. La prima include lo stabilimento chimico, le aree della discarica abusiva in località Tremonti di Bussi sul Tirino in sponda sinistra del fiume Pescara e le aree di discarica situate nella vallata del fiume Tirino. Tale settore, oltre alla problematica dei rifiuti, residui delle produzioni industriali storiche, è interessato principalmente da contaminanti volatili (tra cui mercurio e solventi clorurati). Le ulteriori macroaree comprendono lo stabilimento chimico dismesso ex Montecatini sito a Bolognano (PE) e le aree di presa e rilascio delle captazioni idroelettriche realizzate più a valle lungo il corso del fiume Pescara (possibili aree di sedimentazione). La gestione degli scarti di produzione e l'abbandono irregolare di rifiuti industriali in questa parte del SIN, ha causato la contaminazione dei terreni e delle acque sotterranee da metalli pesanti. Le restanti due macro aree sono siti di presa e rilascio delle acque fluviali per la produzione di energia elettrica. In particolare, il Distretto di Chieti ha redatto il piano e eseguito le indagini ambientali mentre il Distretto di Pescara (polo laboratoristico) ha eseguito le analisi chimiche e ecotossicologiche dei campioni raccolti nel corso delle attività di caratterizzazione.

2.2 Materiali e metodi

La caratterizzazione dei sedimenti dei fiumi Tirino, Pescara e Orta, è stata eseguita attraverso la realizzazione di 51 sondaggi geognostici in corrispondenza di 25 transetti fluviali attestati ad una profondità massima di 1.7 m, nei quali sono stati prelevati 3 campioni a tre profondità diverse (0 - 0.3 m,

0.3 - 0.7 m, 1.3 - 1.7 m). In totale sono state effettuate 137 analisi granulometriche su altrettanti campioni mentre 148 sono stati i campioni sottoposti ad analisi chimiche per oltre 13000 determinazioni analitiche. I sedimenti sono stati sottoposti ad analisi ecotossicologiche applicando una batteria di saggi su oltre 75 campioni. La batteria ha previsto l'utilizzo di saggi con il crostaceo cladocero *Daphnia magna* (test acuto con esposizione per 24 h con riferimento alla norma UNI EN ISO 6341:2013) e con l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (test acuto con esposizione per 72 h con riferimento alla norma UNI EN ISO 8692:2012) applicati all'elutriato (matrice acquosa) e del saggio con il crostaceo ostracode *Heterocypris incongruens* applicato al sedimento tal quale (test cronico con esposizione al sedimento per 6 giorni con riferimento alla norma ISO 14371:2012). La scelta ha tenuto conto di organismi appartenenti a diversi livelli trofici, della rappresentatività e della valenza ecologica in funzione dell'ambiente e delle matrici da indagare, ma anche della disponibilità di metodologie standardizzate (Manuale ISPRA 88/2013).

2.3 Risultati indagine chimica

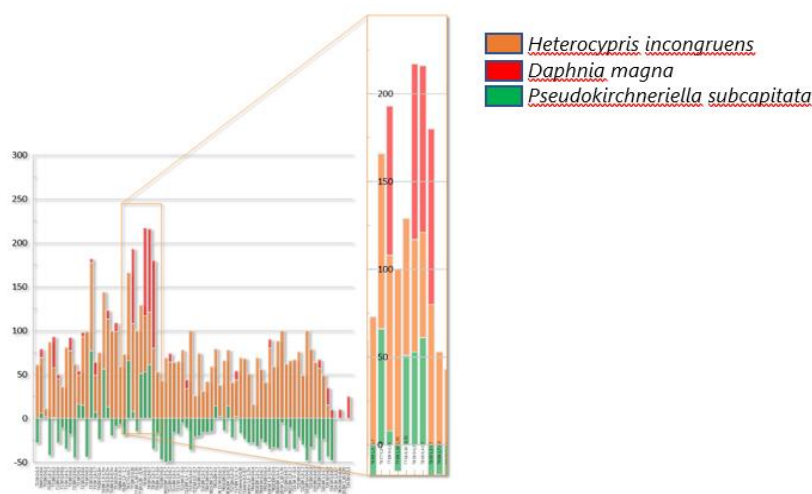
Ai fini della valutazione dello stato chimico dei sedimenti, le concentrazioni rilevate dei metalli e metalloidi sono state confrontate con i limiti chimici di riferimento, per i quali ISPRA li ha elaborati nel documento riferito all'ex SIN "Saline Alento" (ISPRA, 2009). Per i restanti elementi per i quali non sono disponibili questi livelli, si è preferito effettuare una valutazione relativa in termini percentuali. In tale ottica, i metalli maggiormente presenti nel settore a monte della confluenza dei fiumi Tirino-Pescara, sono piombo, vanadio, zinco e sporadicamente si registra la presenza di mercurio. Nel settore delle aree di discariche e abbandono indifferenziato, il mercurio è il parametro più abbondante, mentre verso valle il piombo è percentualmente il parametro più frequente. All'interno del perimetro del polo chimico e in prossimità della confluenza Tirino-Pescara il piombo presenta le concentrazioni massime. Si segnala come già il transetto T0, posto a monte delle aree di abbandono indifferenziato, sia già impattato dal piombo. I sedimenti del fiume Pescara, nel settore a valle della confluenza Tirino-Pescara e a partire dalla discarica Tremonti, in 55 campioni analizzati il piombo mostra 29 superamenti dei livelli chimici di riferimento mentre il mercurio ne mostra ben 35. In questo tratto del Pescara i risultati mostrano un incremento delle concentrazioni di piombo a partire dal transetto T15 posizionato giusto a valle della suddetta discarica. Il piombo mostra valori massimi fino a 1249 mg/kg (T15) mentre la concentrazione massima di mercurio registrata è pari a 7.56 mg/kg. Nel tratto posto più a valle, compreso tra l'invaso della diga di Alanno e il rilascio "IV salto" Enel, i risultati analitici evidenziano ancora la presenza di mercurio che sta ad indicare come la contaminazione abbia raggiunto un'estensione tale da interessare anche le porzioni finali del SIN, fino al transetto T23 (almeno un campione superficiale del transetto T24 ha mostrato la presenza di mercurio) attraversando persino la barriera artificiale costituita dalla diga di Alanno. In analogia con gli esiti analitici relativi ai metalli e metalloidi, i solventi clorurati mostrano un andamento delle concentrazioni direttamente connesso con la posizione relativa dei transetti rispetto ai cosiddetti "centri di pericolo". In particolare, la presenza di composti chimici marker della contaminazione del SIN, quali tetracloroetilene, tricloroetilene e esacloroetano, dimostra chiaramente come la sorgente principale degli apporti di tali sostanze sia appunto l'area storica del polo chimico che ad oggi è ancora attivo, anche se con diversificazioni impiantistiche e produttive accorse negli anni. A valle del polo chimico nella porzione esterna al perimetro produttivo si continuano a registrare concentrazioni totali dei tre composti. La seconda area nella quale i dati chimici evidenziano un forte impatto è quella prossima alle aree di discariche abusive e di abbandoni di rifiuto. I transetti che hanno investigato tale area, posta a monte del polo chimico, sono i transetti T3, T4 e T5. Infine, lungo tutta l'asta del fiume Pescara fino all'ultima macro area, nelle zone indagate dai transetti, continuano a registrarsi positività delle sommatorie dei tre composti di interesse con l'esacoloroetano che si conferma ubiquitario fino ai margini estremi del perimetro del SIN, confermando un impatto sulla matrice sedimento.

2.4 Risultati indagini ecotossicologiche

La valutazione della pericolosità del SIN da un punto di vista ecotossicologico è stata effettuata applicando una batteria già sperimentata per i sedimenti fluviali dell'ex SIN "Saline Alento" (Arizzi Novelli et al., 2016). Con il test algale sono stati riscontrati effetti tossici significativi dei transetti T3, T4, T7 e T8 (sia nei campioni più superficiali che in quelli profondi); si sono inoltre osservati importanti fenomeni di

biostimolazione, per la quasi totalità dei campioni, da ritenere tuttavia non rilevanti biologicamente in quanto difficilmente interpretabili, confermando la minore sensibilità dell'alga ai contaminanti. Il saggio con *D. magna*, non ha mostrato un effetto di tossicità statisticamente significativo in quanto l'immobilizzazione è stata nulla o estremamente ridotta in tutte le repliche dei campioni analizzati rispetto al controllo ($p > 0,05$ al 95% del livello di significatività statistica). Fanno eccezione per questo organismo, i transetti T7 e T8. Con il test cronico effettuato con l'ostracode applicato al sedimento tal quale, è stata osservata una percentuale di mortalità > 50 % per circa il 20 % dei sedimenti analizzati. La stima della percentuale di inibizione della crescita, ha evidenziato che circa il 69 % dei sedimenti mostra un decremento significativo > 50 % con punte del 100 % di effetto, nei transetti T3, T6, T8, Tr15, T22, T24. Gli effetti subletali misurati, sono ritenuti piuttosto importanti anche dove la contaminazione chimica presenta concentrazioni basse, a conferma della maggiore sensibilità dell'organismo (Fig. 1).

Fig. 1 – Stacked plot degli esiti delle analisi ecotossicologiche con evidenziato il tratto compreso tra i transetti T6-T9.



2.5 Discussione e conclusioni

I risultati ottenuti con la batteria di saggi biologici hanno mostrato la diversa sensibilità degli organismi utilizzati, confermando la necessità di un approccio multispecie. La terna di organismi utilizzati ha mostrato risposte concordanti dove l'impatto è causato direttamente dalla presenza di rifiuti industriali e da livelli più elevati di concentrazioni di contaminanti che risultano biodisponibili. Per i restanti campioni di sedimento, il tasso di crescita dell'alga e l'immobilizzazione della *Daphnia* non hanno mostrato variazioni significative, mentre l'inibizione della crescita dell'ostracode, da considerare probabilmente la componente biologica più sensibile della batteria di saggi impiegata, ha evidenziato effetti importanti su buona parte dei campioni analizzati. I risultati sin qui esposti consentono di poter delineare una linea programmatica per le attività future come ad esempio la definizione dei livelli critici di background, sia per il comparto chimico che biologico, l'utilizzo di ulteriori proxies biologici per le valutazioni ecotossicologiche, la costruzione di una solida correlazione di dettaglio tra dati chimici e biologici per l'elaborazione di un modello di esposizione anche sito specifico ai fini dell'applicazione dei concetti di analisi di rischio ecologica con l'obiettivo di valutare eventuali azioni future di rimedio.

2.6 Bibliografia

Arizzi Novelli A., Melchiorri M., Scamosci E., Marcelli T., Calace N., Onorati F. (2016). Applicazione di una batteria di test ecotossicologici per la valutazione di sedimenti fluviali del SIR Saline Alento. ISPRA, Atti 2016 ISBN 978-88-448-0821-1.

ISO 14371:2012. Water Quality - Determination of fresh water sediment chronic toxicity to *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda).

ISO 8692:2012. Water quality- Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae.

ISPRA, 2009. Proposta per la valutazione dello stato qualitativo dei sedimenti fluviali nel sito di interesse nazionale Fiumi Saline ed Alento.

ISPRA, 2013. Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti e acque interne. Manuali e Linee Guida 88/2013.

UNI EN ISO 6341:2012. Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità di *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Prova di tossicità acuta.

3 Effetto dello stress salino in *Chenopodium quinoa*: valutazione di parametri citogenetici, di crescita e del contenuto di sostanze antiossidanti in prese.nza di biostimolanti microalgali

S. Fiorentino ^a, A. Souid ^a, M G. Caruso ^a, L. Bellani ^{a,b}, L. Giorgetti ^a

a Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria (IBBA), CNR, Pisa, 56124 - sofia.fiorentino@ibba.cnr.it

soud.ayman@gmail.com; mariagrazia.caruso@ibba.cnr.it; lucia.giorgetti@ibba.cnr.it

b Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Siena, Siena 53100 - lorenza.bellani@unisi.it

Abstract - La quinoa, *Chenopodium quinoa* Willd., è una pianta originaria del sud America con notevoli proprietà nutrizionali e nutraceutiche che si è diffusa negli ultimi decenni in molte zone della terra per la sua grande adattabilità e resistenza a condizioni di stress dovute anche ai cambiamenti climatici. In questo lavoro sono state considerate diverse varietà di quinoa sottoposte a stress salino ed è stato valutato l'effetto tossico di NaCl a livello degli apici radicali attraverso saggio di cito-genotossicità. Inoltre, è stato analizzato l'effetto di biostimolanti microalgali nella protezione dallo stress salino, analizzando i germogli di quinoa per parametri fisiologici, contenuto di molecole antiossidanti (polifenoli e flavonoidi) e specie reattive dell'ossigeno (ROS). I trattamenti con le microalghe, in combinazioni appropriate con i trattamenti salini, hanno indotto un ulteriore aumento delle molecole antiossidanti e dell'attività antiradicalica e una riduzione dei ROS nei germogli di quinoa a indicare il ruolo protettivo delle microalghe alle condizioni di stress.

3.1 Introduzione

La salinizzazione del suolo è un fenomeno che, soprattutto negli ultimi anni, sta minacciando l'agricoltura mondiale; ad oggi circa il 20% dei terreni destinati all'agricoltura è interessato da questo fenomeno a causa dei cambiamenti climatici e delle attività antropiche. La salinizzazione del suolo influisce negativamente sulla germinazione dei semi, sulla crescita delle piante e sulla loro produttività a causa della riduzione della disponibilità di acqua e dell'effetto tossico causato dall'accumulo nelle piante di Na⁺ e Cl⁻ che porta a stress primari come lo stress osmotico e ionico. Di contro, la crescente domanda di cibo, causata dall'aumento della popolazione mondiale, spinge gli agricoltori a utilizzare aree marginali e saline e, di conseguenza, ad impiegare piante che siano tolleranti a elevate concentrazioni di sale (Zhou et al., 2023). *Chenopodium quinoa* Willd. è una pianta alofita di origine sudamericana particolarmente apprezzata per le sue proprietà nutrizionali e nutraceutiche che può crescere in terreni marginali e salini in funzione dell'adattabilità varietale.

Le nostre ricerche hanno considerato gli effetti della salinità (NaCl 100, 200, 300mM) sulla germinazione del seme e i possibili effetti genotossici sui meristemi della radice primaria in diverse varietà di quinoa (var. Faro, Tunkahuan, Regalona, Quipu). Inoltre è stato considerato l'uso di biostimolanti microalgali (*Ettlia pseudoalveolaris* e *Chlorella vulgaris*) allo scopo di ottenere una maggiore resistenza allo stress salino e migliorare la qualità dei germogli e delle piante.

3.2 Materiali & Metodi

3.2.1 Materiale vegetale e trattamenti

Semi di quinoa, *Chenopodium quinoa* Willd. di diverse varietà (var. Tunkahuan, Red Faro, Regalona, Quipu) sono stati germinati in piastre Petri da 9 mm su carta da filtro con le seguenti soluzioni: acqua, soluzioni saline con NaCl a concentrazioni di 100 mM, 200 mM, 300 mM; soluzioni con estratto acquoso allo 0,05% (estratto per 4 ore a temperatura ambiente) sia di microalga *Chlorella* sp liofilizzata commerciale che di microalga *Ettlia pseudoalveolaris* liofilizzata; soluzioni con NaCl alle diverse concentrazioni con aggiunta degli estratti di *Chlorella* o *Ettlia*. Un periodo di buio di 3 giorni è stato seguito da 4 giorni di esposizione

alla luce in camere di germinazione a 24 °C (fotoperiodo di 12 ore). I germogli sono stati analizzati a 7 giorni per la percentuale di germinazione e la lunghezza della plantula.

3.2.2 Analisi citogenetiche

Le radici primarie sono state fissate e processate al 3° giorno per le analisi di cito-genotossicità come determinazione dell'indice mitotico e delle anomalie citologiche (Souid et al., 2023)

3.2.3 Determinazioni spettrofotometriche e fluorimetriche

I germogli sono stati estratti alla concentrazione del 10% in etanolo 80% per la determinazione dei polifenoli totali (Singleton et al., 1999), dei flavonoidi totali (Heimler et al. 2006), dell'attività antiradicalica totale tramite saggio DPPH (Boudjou et al. (2013) e della capacità antiossidante misurando la riduzione degli ioni ferrici (Fe³⁺) in ioni ferrosi (Fe²⁺) tramite saggio FRAP (Benzie e Strain 1999). Inoltre, sono state effettuate analisi fluorimetriche degli estratti per la determinazione del contenuto di ROS (Bellani et al., 2012).

3.3 Risultati e Discussione

I germogli delle diverse varietà di quinoa, a 7 giorni dalla germinazione, sono stati valutati per parametri fisiologici come germinazione e lunghezza del germoglio, indicando che il trattamento con Chlorella può incrementare la crescita del germoglio, mentre concentrazioni elevate di sale la inibiscono. L'analisi citogenetica effettuata sulle radici della var Red Faro sottoposti a stress salino ha evidenziato una diminuzione dell'indice mitotico e un aumento delle anomalie citogenetiche (c metafasi per danni al fuso mitotico e ponti cromosomici, cromosomi lagging e sticky per danni e rotture cromosomiche) all'aumentare delle concentrazioni saline (Tab 1), dimostrando l'effetto citotossico e genotossico indotto dalla salinità.

Tab 1.1: Analisi citologica dei meristemi radicali di *Chenopodium quinoa* trattati con 100, 200 e 300 mM NaCl. Valori medi dell'indice mitotico; % delle anomalie citologiche totali (metafasi anomale + ana/telofasi anomale). I dati sono la media di tre esperimenti separati \pm DS. Nelle colonne, lettere diverse indicano differenze significative tra controllo e trattamenti mediante ANOVA seguita dal test di Tukey ($p \leq 0.05$).

	Indice mitotico %	Anomalie cromosomiche %
Controllo	5 \pm 0.8 a	5.89 \pm 1.07 b
NaCl 100mM	3.57 \pm 0.21 b	16.73 \pm 4.37 ab
NaCl 200mM	3.06 \pm 0.21 b	32.54 \pm 8.01 a
NaCl 300mM	3.06 \pm 0.5 b	30.39 \pm 10.5 a

L'analisi spettrofotometrica e fluorimetrica ha valutato il contenuto di molecole antiossidanti (polifenoli totali, flavonoidi), la capacità antiossidante totale (saggio DPPH e FRAP) e la presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle varie condizioni sperimentali. I risultati (Tab 2) hanno evidenziato un aumento di molecole antiossidanti (polifenoli e flavonoidi) e di capacità antiossidante totale in presenza di sale e di microalghe. Tale effetto dipendeva anche dalla varietà di quinoa considerata, in accordo con quanto osservato da Souid et al., 2023.

Tab 1.2: Analisi del contenuto totale di Polifenoli, Flavonoidi, capacità antiossidante totale (DPPH e FRAP) e contenuto di ROS. Nelle righe lettere diverse indicano differenze significative tra i trattamenti per ciascuna varietà di quinoa analizzate statisticamente mediante ANOVA a due vie seguita dal test di Tukey ($p < 0.05$).

Testo		Quinoa var. Tunkahuan				Quinoa var. Regalona			
		H ₂ O	NaCl 100mM	NaCl 200mM	NaCl 300mM	H ₂ O	NaCl 100mM	NaCl 200mM	NaCl 300mM
Polifenoli totali mgGAE/gFW	Controllo	1.62±0.4 cde	2.4±0.5 abc	2.2±0.2abcde	2.33±0.1abcd	1.3±0.1 cde	1.71±0 c	1.50±0.2 cde	1.04±0 e
	Chlorella	1.34±0.2 ef	1.86±0.3bcde	2.59±0.2 ab	1.91±0.2bcde	1.8±0.2 e	3.348±0.2 a	1.638±0.3 cd	1.14±0 de
	Ettlia	1.49±0.1 def	2.68±0.4 ab	2.78±0.3 a	0.68±0.4 f	1.61±0.1 cd	2.69±0.3 b	2.6±0.1 b	1.32±0.1 cde
Flavonoidi totali mgQe/gFW	Controllo	1.22±0.2 f	1.46±0.1 ef	2.02±0.1 cd	2.26±0.1 bc	1.16±0.1 e	1.87±0.2 bc	1.87±0.2 bc	2.02±0.2 b
	Chlorella	0.62±0.1 g	1.28±0.1 f	1.69±0.2 de	2.16±0.2 bc	0.62±0.1 f	1.44±0.2 cde	1.83±0.2 bc	2.15±0 b
	Ettlia	0.61±0.1 g	2.23±0.1 bc	2.49±0.1 b	2.95±0.2 a	1.31±0.1 de	2.16±0.0 b	2.72±0.3 a	1.78±0.1 bcd
DPPH ARA%	Controllo	5±0.5 f	9.22±1 cde	7.13±0.9 def	11.9±1.5 bc	4.81±0.2 e	10.9±1.1 d	10.4±0.4 d	13.07±1 d
	Chlorella	5.56±0.1 f	6.01±0.9 ef	7.09±1 def	12.72±1.5 ab	5.15±0.8 e	6.27±0.4 e	41.25±1.2 c	46.86±0.2 a
	Ettlia	4.58±0.3 f	10.19±1.5bcd	12.72±0.5 ab	15.74±2.1 a	42.14±1.2 bc	41.34±3.1 bc	47.97±0.7 a	44.97±1.6 ab
FRAP μ M FeSO ₄ e/g FW	Controllo	167±6.6 e	191.16±5.2 e	252.8±19.4 d	386.2±10.1 c	229.5±5 f	404.5±31.2 c	331±14.2de	481.2±10.1b
	Chlorella	157±11.5 ef	183.7±11.8 e	237±4.3 d	463.7±20.4 b	172.83±2.9 g	241±13.7 f	382±6.1 c	565.3±13.8 a
	Ettlia	131.2±3.8 ef	433.7±11.6 b	440.33±8 b	586±12.3 a	300±12.5e	365±6.3 cd	378±11.7 c	468 ±16.1 b
ROS A.U./g FW	Controllo	8.21±0.4 ab	8.67±0.8 a	5.8±0.6 cd	1.9±0.3 ef	0.88±0.31 de	2.67±0.6 bc	0.38±0.2 e	0.3±0.3 e
	Chlorella	8.54±0.6 ab	7±0.8 abc	6.26±0.7 bcd	1.05±0.3 f	7.22±0.99 a	1.39±0.1 cde	0.74±0.2 e	0.16±0.1 e
	Ettlia	4.23±1.7 de	4.35±0.1 d	1.88±0.4 ef	0.39±0.1 f	4±0.33 b	2.87±0.7 bc	2.38±0.8 cd	0.67±0.5 e

3.4 Conclusioni

I trattamenti con le microalghe effettuati su germogli di quinoa sottoposti a stress salino, in combinazioni appropriate, hanno indotto un aumento delle molecole antiossidanti e dell'attività antiradicalica e una riduzione dei ROS. Questo approccio sperimentale può essere preso in considerazione per aumentare la resistenza della pianta a condizioni ambientali avverse e inoltre ottenere alimenti vegetali con elevato valore nutraceutico da sfruttare come integratori e alimenti fortificati.

3.5 Bibliografia

Soud A., Bellani L., Tassi E.L., Ben Hamed K., Longo V., Giorgetti L. Early Physiological, Cytological and Antioxidative Responses of the Edible Halophyte *Chenopodium quinoa* Exposed to Salt Stress. *Antioxidants* 2023, 12, 1060

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 1999, 299, 152–178.

Heimler D., Vignolini P., Dini M.G., Romani A. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53, 3053-3056.

Boudjou S., Oomah B.D., Zaidi F., Hosseinian F. Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. Food Chemistry 2013, 138, 1543–1550.

Benzie I.F., Strain J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology 1999, 299, 15-27.

Bellani L.M., Salvini L., Dell'Aquila A, Scialabba A. Reactive oxygen species release, vitamin E, Fatty acid and phytosterol contents of artificially aged radish (*Raphanus sativus* L.) seeds during germination. Acta Physiologiae Plantarum 2012, 34, 1789-1799.

4 Un approccio multi-biomarker evidenzia le diverse risposte fisiologiche del gheppio comune (*Falco tinnunculus*) ad ambienti caratterizzati da un diverso impatto antropico

L. Giovanetti ^a, I. Caliani ^a, G. Damiani ^{b,c}, G. Dell'Omo ^b, D. Costantini ^{c,d}, S. Casini ^a

a Dipartimento di Scienze fisiche, della Terra e dell'ambiente, Università di Siena, via Pier Andrea Mattioli 4, 53100 Siena, Italia - laura.giovanetti@unisi.it; caliani4@unisi.it; silvia.casini@unisi.it

b Ornithologia, Piazza Crati 15, 00199, Roma, Italia - gianluca.damiani@unitus.it; giacomo.dellomo@gmail.com

c Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche, Università degli Studi della Tuscia, Largo Dell'Università s.n.c., 01100, Viterbo, Italia - david.costantini@unitus.it

d Unité Physiologie Moléculaire et Adaptation, UMR7221 CNRS-Muséum National d'Histoire Naturelle, 75005, Parigi, Francia

Abstract - Le attività umane, in particolare l'agricoltura e l'urbanizzazione, stanno causando una significativa modifica degli ambienti naturali. Di conseguenza, gli animali adattano la loro fisiologia a questi nuovi contesti per sfruttarli a scopo di foraggiamento e riproduzione. Questo studio si propone di confrontare lo stato fisiologico di puli di gheppio (*Falco tinnunculus*) prelevati da nidi artificiali installati in aree naturali, rurali e urbane nei dintorni di Roma, Italia. È stato utilizzato un approccio *multi-biomarker* per valutare le risposte fisiologiche a più livelli, valutando: lo stato ossidativo, le funzioni immunitarie, effetti di genotossicità e neurotossicità. Abbiamo trovato un'alterazione dello stato ossidativo (GSH e rapporto GSH:GSSG) e un'attivazione della risposta immunitaria (monociti) nei gheppi urbani rispetto a quelli naturali e rurali. Inoltre, abbiamo riscontrato maggiori danni al DNA nei gheppi rurali rispetto a quelli delle altre aree e un'inibizione dell'attività esterasica (BChE) negli uccelli delle aree urbana e naturale rispetto a quelli dell'area rurale. Abbiamo anche registrato che molti dei nostri biomarcatori (sistema del complemento, *respiratory burst*, bacterial killing assay e la capacità antiossidante non enzimatica) erano piuttosto simili tra le tre aree di studio. Questi risultati mostrano che gli ambienti urbani non determinano necessariamente alterazioni fisiologiche nei gheppi rispetto a quelli provenienti da altri habitat, ma evidenziano anche che l'approccio *multi-biomarker* consente di rilevare le specifiche risposte degli organismi alle diverse pressioni ambientali che caratterizzano differenti habitat. Sono necessari ulteriori studi per identificare i fattori che inducono le differenze fisiologiche tra gli uccelli di ambienti urbani, rurali e naturali e per determinare se queste differenze siano consistenti nel tempo e nello spazio.

4.1 Introduzione

L'espansione delle aree urbane e agricole, dovuta all'aumento della popolazione globale, sta alterando in modo significativo gli ambienti naturali, creando nuove sfide per la fauna selvatica (Moreau et al., 2022). La vita in contesti urbani espone gli animali a specifici *stressors*, come l'inquinamento chimico, luminoso e la presenza umana. Conseguentemente, gli animali, adattano la loro fisiologia e comportamento, determinando differenze tra le popolazioni urbane e rurali (Costantini et al., 2014). Anche le attività agricole agiscono negativamente sulla fauna selvatica, provocando frammentazione, perdita di habitat e influenzando la qualità del cibo (Stanton et al., 2018). Il contesto urbano è considerato un ambiente subottimale per il gheppio, probabilmente a causa della scarsità di prede preferite o della contaminazione chimica (Grande et al., 2018; Kettel et al., 2018). Questa specie affronta importanti minacce anche in ambienti al di fuori delle città, come la semplificazione dei paesaggi, data dall'intensificazione dell'agricoltura (Butet et al., 2022), l'esposizione a parassiti (Wemer et al., 2021) e a pesticidi (Roos et al., 2021). Per studiare come i cambiamenti ambientali, indotti dalle attività umane, influenzino la fisiologia dei gheppi, i *biomarker* fisiologici rappresentano un valido strumento. Essi consentono di rilevare eventuali segnali di allarme precoce e di effetti a lungo termine sulla popolazione, nonché di valutare la sensibilità o resilienza dei gheppi all'urbanizzazione. Questo studio utilizza un approccio *multi-biomarker*

per confrontare lo stato fisiologico di popolazioni di gheppi di habitat urbani, rurali e naturali, con l'obiettivo anche di comprendere le sfide specifiche che questi animali affrontano in diversi ambienti.

4.2 Materiali e metodi

Abbiamo condotto questo studio in tre aree nella zona di Roma caratterizzate da un uso a mosaico del territorio e da un diverso sfruttamento da parte dell'uomo. Queste aree sono state classificate come sito naturale (Castel di Guido, NAT), rurale (Decima Malafede, RUR) e urbano (Parco dell'Aniene, URB).

Abbiamo raccolto campioni di sangue da un totale di 64 pulli, appartenenti a 19 nidi, nei mesi di maggio e giugno del 2020 e 2021. Applicando un approccio *multi-biomarker* nel sangue, abbiamo misurato le risposte fisiologiche dei gheppi ai diversi ambienti, valutando: lo stato ossidativo (glutazione totale – tGSH, glutazione ridotto e ossidato – GSH e GSSG, il rapporto GSH:GSSG), la capacità antiossidante non enzimatica (Total Antioxidant Status – TAS), la funzione immunologica (*respiratory burst*, conta differenziale dei leucociti – WBCs, rapporto tra eterofili e linfociti – H/L, attività del sistema del complemento e bacterial killing assay), la genotossicità (comet assay e anomalie nucleari eritrocitarie – ENA assay) e la neurotossicità (attività della butirilcolinesterasi e della carboxilesterasi – BChE e CaE).

4.3 Risultati

Fig 1 – Livelli di glutazione ridotto (GSH) e rapporto glutazione ridotto e ossidato (GSH:GSSG). (A) Concentrazione GSH e (B) rapporto GSH:GSSG, misurati nel plasma di pulli di gheppio campionati in aree NAT =naturale, RUR =rurale, and URB =urbana. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$). I risultati sono presentati come medie marginali stimate \pm ES (valori trasformati in log10).

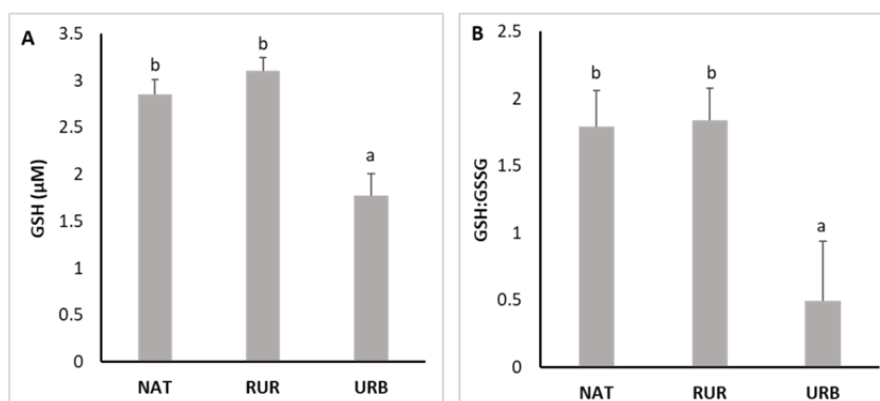
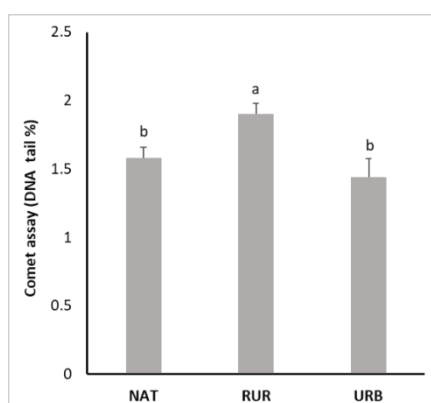


Fig 2 – Risultati del comet assay. Il test è stato applicato nei pulli di gheppio prelevati in zone NAT = naturali, RUR = rurali e URB = urbane. Diverse lettere indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$). I risultati sono presentati come medie marginali stimate \pm ES (valori sqrt-root trasformati).



Abbiamo riscontrato concentrazioni più basse di glutatione e valori di GSH:GSSG (Figura 1), nonché un numero maggiore di monociti negli uccelli urbani rispetto alle altre aree. Inoltre, abbiamo osservato un maggiore danno al DNA nei gheppi rurali rispetto a quelli urbani e naturali (Figura 2), e un'inibizione dell'attività della butirilcolinesterasi negli uccelli delle aree urbana e naturale rispetto a quelli dell'area rurale. Infine, abbiamo trovato valori simili tra le aree di studio per il respiratory burst, il sistema complemento, la capacità battericida e capacità antiossidante non enzimatica.

4.4 Conclusioni

In conclusione, il nostro approccio multi-biomarker suggerisce che i gheppi probabilmente si confrontano con stressori ambientali che differiscono in tipologia o intensità tra ambienti contrastanti, quindi concludere che le aree urbane non siano habitat adeguati per i gheppi potrebbe essere prematuro. Per gli studi futuri sarà necessario determinare meglio i principali fattori alla base della differenziazione fisiologica tra popolazioni conspecifiche che nidificano in habitat diversi. Queste informazioni sono di fondamentale importanza per orientare l'uso del territorio e la pianificazione urbana in un modo che favorisca la salute della fauna selvatica.

4.5 Bibliografia

- Butet, A., Rantier, Y., Bergerot, B., 2022. Land use changes and raptor population trends: a twelve-year monitoring of two common species in agricultural landscapes of Western France. *Global Ecol. Conservation* 34, e02027.
- Costantini, D., Dell'Omo, G., La Fata, I., Casagrande, S., 2014. Reproductive performance of Eurasian Kestrel *Falco tinnunculus* in an agricultural landscape with a mosaic of land uses. *Ibis* 156, 768–776.
- Grande, J.M., Negro, J.J., Sarasola, J.H. (Eds.), 2018, *Birds of Prey: Biology and Conservation in the XXI Century*, first ed., vol. 2018. Springer International Publishing, Imprint.
- Kettel, E.F., Gentle, L.K., Quinn, J.L., Yarnell, R.W., 2018. The breeding performance of raptors in urban landscapes: a review and meta-analysis. *J. Ornithol.* 159, 1–18.
- Moreau, J., Rabdeau, J., Badenhauer, I., Giraudeau, M., Sepp, T., Crépin, M., Gaffard, A., Bretagnolle, V., Monceau, K., 2022. Pesticide impacts on avian species with special reference to farmland birds: a review. *Environ. Monit. Assess.* 194, 790.
- Roos, S., Campbell, S.T., Hartley, G., Shore, R.F., Walker, L.A., Wilson, J.D., 2021. Annual abundance of common Kestrels (*Falco tinnunculus*) is negatively associated with second generation anticoagulant rodenticides. *Ecotoxicology* 30, 560–574.
- Stanton, R.L., Morrissey, C.A., Clark, R.G., 2018. Analysis of trends and agricultural drivers of farmland bird declines in North America: a review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 254, 244–254.

5 Ecotossicità di terre e rocce da scavo condizionate con agenti schiumogeni: prodotti commerciali di vecchia e nuova generazione

P. Grenni ^a, L. Mariani ^b, L. Rolando ^c, A. Barra Caracciolo ^d

a Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Ricerca sulle Acque – paola.grenni@cnr.it

b Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Ricerca sulle Acque – livia.mariani@irsa.cnr.it

c Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Ricerca sulle Acque – ludovica.rolando@irsa.cnr.it

d Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Ricerca sulle Acque – anna.barracaracciolo@cnr.it

Abstract - Per il riutilizzo delle terre e rocce da scavo (T&R) come sottoprodotto è indispensabile che esse soddisfino i requisiti per la compatibilità ambientale. Nello scavo meccanizzato, le T&R possono essere condizionate con agenti schiumogeni, la maggior parte dei quali contengono il tensioattivo anionico sodio lauriletere solfato (SLES, in % variabili) come sostanza principale e, in alcuni casi, anche altre sostanze minoritarie. Per la qualificazione delle terre condizionate come sottoprodotto, un approccio efficace è quello di valutarne l'ecotossicità, che può dipendere dalle concentrazioni residuali di SLES. Per la qualificazione delle T&R condizionate come sottoprodotto, i fattori principalmente da considerare sono l'ecotossicità intrinseca dei prodotti schiumogeni (tal quali), e la loro biodegradabilità nelle T&R (sito-specifica). Le T&R condizionate contengono concentrazioni residuali di SLES variabili, in funzione delle caratteristiche pedologiche e del prodotto scelto. In alcuni casi le T&R condizionate possono risultare immediatamente ecocompatibili (e quindi utilizzabili come sottoprodotto), in altri necessitano un tempo (più o meno lungo) di deposito in aree di stoccaggio temporaneo affinché il tensioattivo SLES biodegradi. Le tempistiche di riutilizzo delle terre influenzano notevolmente la pianificazione e la gestione dei cantieri per lo scavo di gallerie. L'industria degli agenti schiumogeni ha recentemente messo sul mercato prodotti di "nuova generazione" con minore ecotossicità intrinseca poiché contengono ridotte quantità di SLES (1-5%) di origine vegetale.

5.1 Compatibilità ambientale di terre e rocce da scavo

Attualmente si producono in tutto il mondo grandi quantità di materiale (terre e rocce da scavo o smarino) provenienti dalla realizzazione di gallerie. La gestione dello smarino è regolata in Italia ad oggi dal DPR 120/2017, sebbene vi siano attualmente ancora cantieri che operano nell'ambito del vecchio DM 161/2012. Per il possibile riutilizzo dello smarino come sottoprodotto (con notevoli vantaggi sia in termini economici che ambientali), è indispensabile che essi soddisfino i criteri di compatibilità ambientale, in linea con le norme vigenti e nell'ambito di un'economia circolare.

Lo scavo meccanizzato di gallerie utilizzando la TBM-EPBS (*Tunnel Boring Machine- Earth Pressure Balanced Shields*, Figura 1) prevede l'impiego di agenti schiumogeni per il condizionamento delle terre durante lo scavo.

Fig 1 –Testa di una TBM-EPB in azione mentre inietta il prodotto schiumogeno.



I tensioattivi anionici, e in particolare il sodio lauriletere solfato (SLES), sono le principali sostanze chimiche contenute nei prodotti schiumogeni. La loro % varia in base al prodotto e la loro concentrazione residuale nel terreno scavato condizionato con tali prodotti è differente a seconda delle quantità di schiumogeno utilizzato (definito mediante il *Treatment ratio*, TR, intervallo: 0,1-3 L/m³). Il TR viene calcolato mediante prove geotecniche effettuate in laboratori specializzati e dipende dalla litologia del terreno e dalle caratteristiche del prodotto commerciale. Valutare la quantità di prodotto schiumogeno e l'eventuale ecotossicità dei terreni condizionati è fondamentale per il possibile utilizzo dello smarino come sottoprodotto.

5.2 Biodegradazione degli agenti schiumogeni

I prodotti schiumogeni sono soluzioni acquose di tensioattivi in concentrazioni variabili dall'1 al 50%. Essi sono generalmente considerati biodegradabili e non intrinsecamente ecotossici (Barra Caracciolo et al., 2017).

Dal 2014 il CNR-IRSA è impegnato in diverse ricerche nell'ambito della realizzazione di infrastrutture (gallerie ferroviarie o di autostradali) al fine di promuovere il riutilizzo delle terre scavate mettendo a punto protocolli operativi in fase di scavo (specifici per ciascun sito) per determinare la compatibilità ambientale delle terre e rocce da scavo. In tale ambito, è stata testata l'ecotossicità intrinseca di una vasta gamma di prodotti schiumogeni e determinata la loro degradabilità/biodegradabilità. Quest'ultima è stata valutata (considerando i tempi di attenuazione naturale dello SLES) in sperimentazioni in laboratorio (microcosmi) ed *in situ* (mesocosmi) a diversi tempi dal condizionamento (Figura 2), nonché in campioni reali di scavo (Grenni et al., 2018, 2019; Mariani et al., 2020a; Patrolecco et al., 2020; Barra Caracciolo et al., 2018, 2021).

Fig 2 – Approccio ecologico applicato nei diversi studi del CNR-IRSA.



Lo smarino può essere depositato temporaneamente in aree specifiche di stoccaggio fino al raggiungimento delle caratteristiche di riutilizzo, sia in termini di compatibilità ambientale, che geotecniche (es. raggiungimento di un'idonea compattazione e perdita di acqua). Infatti, poiché lo SLES è una sostanza biodegradabile, si prevede che la sua concentrazione possa diminuire una volta che i terreni scavati vengano lasciati a maturare nei siti di stoccaggio.

La biodegradabilità dello SLES nelle terre e rocce da scavo è stata stimata in termini di emivita 50 (DT₅₀) in circa 7 giorni (Barra Caracciolo et al., 2019). Tuttavia, questo valore può variare in base alla concentrazione di SLES nel prodotto schiumogeno, alla quantità di prodotto utilizzata durante lo scavo (TR) e a fattori sito-specifici (caratteristiche litologiche e mineralogiche della matrice scavata; temperatura ambientale; contenuto d'acqua dello smarino; abbondanza microbica; Barra Caracciolo et al., 2019; Finizio et al., 2020). È da sottolineare che le condizioni sito-specifiche possono essere più o meno favorevoli alla

biodegradazione dello SLES, influenzando il tempo di permanenza delle terre nei depositi temporanei affinché esse raggiungano i requisiti di compatibilità ambientale.

Per la messa a punto dei protocolli operativi di scavo sono stati condotti dall'IRSA-CNR diversi test ecotossicologici sia sul terreno condizionato (es. test di germinazione con *Lepidium sativum*, linea guida OECD n. 208, 2006; test acuto e subcronico con *Heterocypris incongruens*, ISO 14371:2012), sia su estratti acquosi (elutriati; es. test di tossicità acuta con *Aliivibrio fischeri*, UNI EN ISO 113483:2019), (Mariani et al., 2020b, Firouzei et al., 2020; Mariani et al., 2022). I saggi ecotossicologici più idonei al rilevamento delle concentrazioni residuali di SLES sono stati poi suggeriti nei protocolli sito-specifici per la definizione dello smarino come sottoprodotto (Galli et al., 2019; Mariani et al., 2020b; Mariani et al., 2022). In detti protocolli vengono quindi suggerite metodologie (chimiche ed ecotossicologiche) nonché i tempi di maturazione del terreno scavato nei depositi temporanei per il raggiungimento della compatibilità ambientale.

5.3 Composti di “vecchia” e “nuova” generazione

Per quanto riguarda l'ecotossicità intrinseca dei prodotti schiumogeni (cioè tal quale, non miscelato con il terreno), essa dipende dalle percentuali relative di SLES (se è l'unica sostanza indicata nella scheda di sicurezza del prodotto).

In Italia l'applicazione dell'“approccio ecologico” (Figura 2), che prende in considerazione le relazioni tra le quantità di prodotti schiumogeni utilizzate per lo scavo di gallerie e gli aspetti ambientali, ha orientato l'industria verso la produzione di schiumogeni più “ecologici”, contenenti quantità minori di tensioattivi anionici e di origine vegetale. Infatti, i prodotti schiumogeni più recentemente introdotti sul mercato ed utilizzati in Italia sono risultati più ecocompatibili rispetto a quelli utilizzati in precedenza, rendendo lo smarino facilmente utilizzabile nella maggior parte dei casi. Ciò è dovuto non solo alla diminuzione delle percentuali relative di SLES nei prodotti (Tabella 1) ma anche a un generale miglioramento della loro formulazione. Infatti, nei precedenti schiumogeni lo SLES era prodotto a partire da idrocarburi (cioè da oli o grassi naturali o da idrocarburi come petrolio o gas), mentre nei nuovi prodotti lo SLES è di origine vegetale. Questo ha ridotto notevolmente la loro ecotossicità e, conseguentemente, ha migliorato la ecocompatibilità delle T&R condizionate. A titolo esemplificativo viene riportato in Tabella 1 un confronto di ecotossicità intrinseca di due prodotti, il primo di “vecchia” generazione contenente circa 10% di SLES ed il secondo di “nuova” generazione contenente 2,5% di SLES.

Tab 1 – Confronto tra prodotti di vecchia e nuova generazione prodotti dalla stessa casa-madre. L'ecotossicità intrinseca (EC₅₀ e EC₂₀) è stata valutata mediante il test con *Allivibrio fischeri*.

Prodotto	SLES (% nel prodotto)	CAS	Sostanza	EC ₂₀ (30 min) mg/L	EC ₅₀ (30 min) mg/L
1	≥10%	68891-38-3	Miscela di alcool C12-C14, etoss, solfato, sale sodico	6,3±1,1	17,86±1,7
2	2,5%	68891-38-3	Miscela di alcool C12-C14, etoss, solfato, sale sodico	59,94±2,7	167,20±1,4

Come si può notare, l'ecotossicità intrinseca del prodotto 2 (2,5% di SLES) è di circa 10 volte inferiore rispetto al prodotto 1 (circa 10% di SLES), molto inferiore considerando la sola concentrazione di SLES. Ciò è dovuto alla diversa origine del tensioattivo anionico che, nel caso del prodotto 1 è sintetizzato a partire da idrocarburi, mentre nel prodotto 2 di nuova generazione è di origine vegetale. In recenti sperimentazioni svolte dal CNR-IRSA è stato verificato che i nuovi prodotti sono “rispettosi” dell'ambiente anche subito dopo il condizionamento del terreno. Infatti, sono necessarie quantità inferiori (TR) di prodotto, e la concentrazione risultante di SLES nel terreno (e nell'estratto acquoso), è tale da non evidenziare effetti ecotossicologici già al momento del condizionamento.

5.4 Conclusioni

L'“approccio ecologico”, applicato a T&R condizionate con agenti schiumogeni, ha consentito di mettere a punto protocolli sito-specifici per la definizione della loro compatibilità ambientale. La valutazione delle T&R come sottoprodotto si basa anche sulla loro ecotossicità, in funzione delle concentrazioni residuali

del tensioattivo anionico SLES nell'estratto acquoso delle terre stesse. Il raggiungimento della compatibilità ambientale può richiedere dei tempi di maturazione delle terre, necessari affinché lo SLES venga biodegradato naturalmente durante il deposito temporaneo delle terre. I numerosi studi effettuati in tale ambito hanno orientato l'industria verso la produzione di prodotti schiumogeni di nuova generazione che, in virtù delle minori percentuali di tensioattivi anionici presenti, nonché della loro origine vegetale, permettono in molti casi una rapida qualificazione delle terre condizionate come sottoprodotto, riducendo di fatto i tempi per raggiungere l'ecocompatibilità ambientale. Rimane oggi la preoccupazione per altri Paesi, dove l'attenzione verso l'ambiente non è considerata una priorità, che potrebbero continuare a utilizzare prodotti di "vecchia" generazione con caratteristiche intrinseche di maggiore ecotossicità.

5.5 Bibliografia

Barra Caracciolo A, Cardoni M, Pescatore T, Patrolecco L, 2017. Characteristics and environmental fate of the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate (SLES) used as the main component in foaming agents for mechanized tunnelling, *Environmental Pollution* 226: 94-103

Barra Caracciolo A, Ademollo N, Cardoni M, Grenni P, Pescatore T, Rauseo J, Patrolecco L 2019, Assessment of biodegradation of the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate used in two foaming agents for mechanized tunnelling excavation, *Journal of Hazardous Materials*, 365, 538-545

Barra Caracciolo A, Grenni P, Mariani L, Rauseo J, Di Lenola, Muzzini V, Donati E, Lacchetti I, Gucci PMB, Finizio A, Beccaloni E, Patrolecco L, 2021. Mesocosm Experiments at a Tunnelling Construction Site for Assessing Re-Use of Spoil Material as a By-Product, *Water*, 13 (2): 161

Finizio A, Patrolecco L, Grenni P, Galli E, Muzzini VG, Rauseo J, Rizzi C, Barra Caracciolo A, 2020, Environmental risk assessment of the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate in site-specific conditions arising from mechanized tunnelling, *Journal of Hazardous Materials* 383: 121116.

Firouzei Y, Grenni P, Barra Caracciolo A, Patrolecco L, Todaro C, Martinelli D, Carigi A, Hajipour G, Hassanpour J, Peila D. 2020. The most common laboratory procedures for the evaluation of EPB TBMs excavated material ecotoxicity in Italy: A review. *Geingegneria Ambientale e Mineraria* 160: 44-56.

Galli E, Muzzini VG, Finizio A, Fumagalli P, Grenni P, Barra Caracciolo A, Rauseo J, Patrolecco L, 2019. Ecotoxicity of foaming agent conditioned soils tested on two terrestrial organisms, *Environmental Engineering and Management Journal*, 18 (8):1703-1710,

Grenni P, Barra Caracciolo A, Patrolecco L, Ademollo N, Rauseo J, Saccà ML, Mingazzini M, Palumbo MT, Galli E, Muzzini V, Polcaro CM, Donati E, Lacchetti I, Di Giulio A, Gucci P, Beccaloni E, Mininni G, 2018. A bioassay battery for the ecotoxicity assessment of soils conditioned with two different commercial foaming products, *Ecotoxicology & Environmental Safety* 148: 1067–1077.

Grenni P, Barra Caracciolo A, Patrolecco L, 2019. Site-specific protocols for evaluating environmental compatibility of spoil materials produced by EPB-TBMs. In *Tunnels and Underground Cities: Engineering and Innovation Meet Archaeology, Architecture and Art* (pp. 360-366). CRC Press.

Mariani L, Barra Caracciolo A, Grenni P, 2020a. Saggio con l'ostracode *Heterocypris incongruens*: applicazione per la valutazione ecotossicologica di terre e rocce da scavo trattate con agenti schiumogeni. *Notiziario dei Metodi Analitici & IRSA News* 1/2020:3-13. ISSN: 2465-017X. <http://www.irsacnr.it/index.php/ita/prodotti-della-ricerca/notiziario>

Mariani L, Grenni P, Barra Caracciolo A, Donati E, Rauseo J, Rolando L, Patrolecco L, 2020b, Toxic response of the bacterium *Vibrio fischeri* to sodium lauryl ether sulphate residues in excavated soils, *Ecotoxicology* 29:815–824.

Mariani L, Grenni P, Barra Caracciolo A, Pescatore T, Spataro F, Rauseo J, Narciso A, Rolando L, Patrolecco L, 2022. Use of the *Heterocypris incongruens* bioassay for assessing ecotoxicity of soils containing the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate (SLES). *Ecological Indicators* 145: 109597 doi: 10.1016/j.ecolind.2022.109597

Patrolecco L, Pescatore T, Mariani L, Rolando L, Grenni P, Finizio A, Spataro F, Rauseo J, Ademollo N, Muzzini VG, Donati E, Lacchetti I, Padulosi S, Barra Caracciolo A, 2020. Environmental Fate and Effects of Foaming Agents Containing Sodium Lauryl Ether Sulphate in Soil Debris from Mechanized Tunneling. *Water* 12(8), 2074.

6 Esposizione al bismuto di specie modello dell'ambiente dulcaquicolo: valutazione di effetti tossici a livello morfo-fisiologico e genetico

V. Iannilli ^a, F. Pietrini ^b, L. Passatore ^b, S. Carloni ^b, L. Massimi ^c, C. Giusto ^d, M. Zacchini ^b

^a ENEA, Dip. Sostenibilità, circolarità e adattamento al cambiamento climatico dei Sistemi Produttivi e Territoriali, Roma - valentina.iannilli@enea.it

^b Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri (IRET)- CNR, Monterotondo (RM) - massimo.zacchini@cnr.it

^c Dipartimento di Biologia Ambientale, Sapienza Università di Roma, Roma - l.massimi@uniroma1.it

^d Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche, Università della Tuscia, Viterbo - chiara.giusto@unitus.it

Abstract - Il bismuto (Bi) è un metallo pesante con limitata presenza nella crosta terrestre. A causa del crescente interesse per usi medici e industriali, la presenza di Bi nelle matrici ambientali, oggi trascurabile, è destinata ad aumentare e con essa le interazioni con il biota, su cui le informazioni in letteratura sono frammentarie. In particolare, la tossicità del Bi nei confronti di organismi modello dell'ambiente dulcaquicolo ad oggi non risulta studiata. In questo studio, sono stati valutati gli effetti dell'esposizione al Bi su due bioindicatori quali la pianta *Lemna minor* L. (Lemnoideae) e l'anfipode *Echinogammarus veneris* (Heller, 1865) (Amphipoda, Gammaridae) a livello morfo-fisiologico (endpoint biometrici e fotosintetici) e genetico (saggio comet), rispettivamente. In particolare, un test di 7 giorni è stato condotto su fronde di *L. minor* in presenza di 0 (controllo), 30, 60, 121, 242 mg L⁻¹ Bi nitrato, mentre individui di *E. veneris* sono stati esposti per 24 h a concentrazioni crescenti di nitrato di Bi (7.5, 15, 30, 60, 121, 242 mg L⁻¹) in condizioni controllate. I risultati hanno evidenziato un modesto effetto tossico del Bi a livello morfo-fisiologico in fronde di *L. minor*, mentre un'elevata attività genotossica è stata osservata negli individui di *E. veneris* già alle più basse concentrazioni. In entrambe le specie è stata rilevata una considerevole quantità di Bi nei tessuti, evidenziando elevata tolleranza in *L. minor* e maggiore sensibilità in *E. veneris* nei confronti del metallo.

6.1 Introduzione

L'inquinamento da metalli pesanti rilasciati nell'ambiente dalle attività antropiche è da tempo riconosciuto come una delle principali preoccupazioni per la salute umana e la sopravvivenza degli ecosistemi. Una gestione più sostenibile dei processi industriali si rende quindi necessaria, ad esempio con la sostituzione di composti chimici altamente tossici con altri più sicuri. In questo contesto, il bismuto (Bi) è stato proposto come alternativa non tossica al piombo in molte applicazioni industriali. Il Bi è un metallo minore, poiché la sua presenza naturale sulla Terra è stimata in 0,025 mg Kg⁻¹. Noto da tempo per le sue proprietà farmacologiche, recentemente è stato utilizzato come inibitore del coronavirus nella sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV) (Wang et al., 2019). Dato il crescente interesse per l'utilizzo del Bi in diversi processi industriali e applicazioni mediche, è ragionevole aspettarsi un aumento della presenza di questo metallo nei comparti ambientali a seguito del rilascio nel suolo e nelle acque reflue. L'attività mineraria è una potenziale fonte di arricchimento di Bi nel suolo, con valori osservati fino a 1.672 mg kg⁻¹ (Wei et al., 2011). Il Bi viene rilasciato nell'ambiente anche attraverso le polveri provenienti da attività industriali e di trasporto, i residui di munizioni e il particolato generato dai fuochi d'artificio (Zacchini, 2024). In letteratura sono presenti scarse informazioni sulla tossicità del Bi sul biota, soprattutto per l'ecosistema acquatico (Huang et al., 2022; Zacchini, 2024). In particolare, non sono riportati studi su specie animali e vegetali attualmente utilizzate come bioindicatori dell'ecosistema d'acqua dolce, come lenticchie d'acqua e anfipodi. Pertanto, in questo studio, sono state eseguite prove sperimentali per valutare gli effetti dell'esposizione al Bi su fronde di *Lemna minor* (Lemnoideae) e su individui di *Echinogammarus veneris* (Heller, 1865) (Amphipoda, Gammaridae), utilizzando biomarcatori di esposizione ed effetto. La valutazione degli effetti dell'esposizione al Bi su queste specie rappresenta un passo fondamentale per valutare la potenziale tossicità di questo metallo sull'ecosistema d'acqua dolce,

considerato il ruolo basilare di questi organismi nella catena trofica, come produttori primari e detritivori, rispettivamente.

6.2 Materiali & Metodi

6.2.1 Lemna minor – Crescita e trattamento sperimentale

Fronde di *L. minor*, cresciute in condizioni controllate (Pietrini et al., 2019), sono state esposte per 7 giorni a 0 (controllo), 30, 60, 121, 242 mg L⁻¹ Bi nitrato in soluzione Hoagland in camera di crescita (temperatura 25°C, fotoperiodo 16/8 luce/buio, irradiazione 60 µmol m⁻²s⁻¹). Al termine del saggio, endpoint biometrici e fisiologici sono stati analizzati direttamente su piastre coperte utilizzando l'Eco-Tox Photo system Tool (ETPT), un dispositivo sperimentale allestito nel laboratorio IRET-CNR (Pietrini e Zacchini, 2020).

6.2.2 Echinogammarus veneris – Crescita e trattamento sperimentale

Esemplari di *E. veneris*, prelevati in natura, e adattati per due settimane alle condizioni di laboratorio (temperatura 15°C, fotoperiodo 12/12 luce/buio), sono stati esposti per 24 h a varie concentrazioni di nitrato di Bi (7.5, 15, 30, 60, 121, 242 mg L⁻¹). Al termine del trattamento, è stato eseguito un Comet assay sugli emociti circolanti come descritto in Cosentino et al. (2022) e la genotossicità valutata attraverso il calcolo del Tail Moment.

6.2.3 Analisi chimica del contenuto di bismuto

Su entrambe le specie in trattamento la valutazione del contenuto di Bi assorbito è stata effettuata mediante Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS) (Passatore et al. (2022).

6.3 Risultati

L'esposizione al Bi per 7 giorni non ha influenzato la crescita delle fronde di *L. minor* mentre si è osservato una leggera ma significativa riduzione del contenuto di clorofilla totale (tab.1). Un accumulo di Bi in funzione della concentrazione del metallo in soluzione è stato rilevato nelle fronde di *L. minor* (Fig.1).

Tab 1 – Parametri biometrici e contenuto di clorofilla totale in fronde di *L. minor* esposte per 7 giorni a crescenti concentrazioni di nitrato di bismuto in soluzione Hoagland (n=8 ± e.s.; Tukey test, P ≤ 0.05)

Concentrazione Bi nitrato (mg L ⁻¹)	Parametri biometrici e contenuto di clorofilla totale			
	TFA (mm ²)	MFA (mm ²)	FN	Clorofilla totale (g m ⁻²)
0	89.1±3.6 a	6.5±0.2 a	13.7±0.4 a	0.382±0.010 a
30	95.3±5.9 a	6.6±0.4 a	14.4±0.5 a	0.372±0.010 ab
60	88.8±3.5 a	6.7±0.2 a	13.2±0.4 a	0.334±0.011 bc
121	91.3±3.2 a	6.9±0.2 a	13.2±0.3 a	0.327±0.008 c
242	96.6±2.6 a	7.0±0.2 a	13.7±0.4 a	0.314±0.008 c

TFA – Total frond area; MFA – Mean frond area; FN –Total frond number.

Un'elevata attività genotossica del Bi su *E. veneris* è stata osservata già alle più basse concentrazioni del metallo in soluzione (Fig. 2), in parallelo ad un elevato bioaccumulo di Bi nel gammaride (Fig.3).

Fig 1. Contenuto di Bi nelle fronde *L. minor* esposte per 7 giorni a crescenti concentrazioni di nitrato di bismuto in soluzione Hoagland ($n=8 \pm$ e.s.; Tukey test, $P \leq 0.05$)

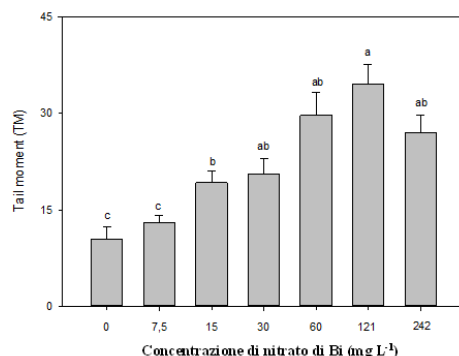
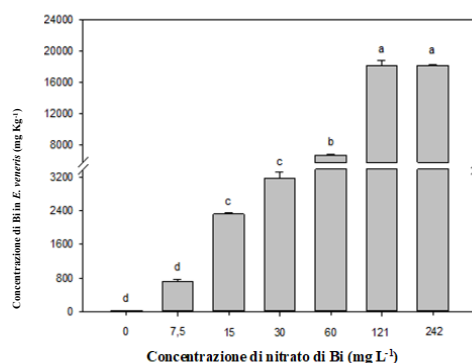


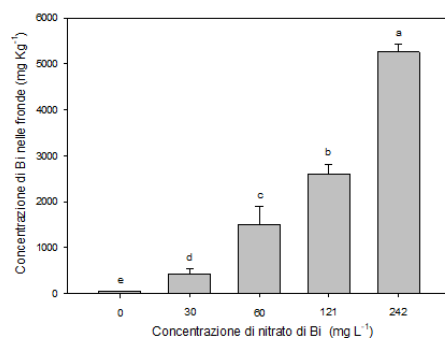
Fig 2. Effetto genotossico, espresso come Tail Moment (TM), negli emociti di *E. veneris* esposti per 24h a concentrazioni crescenti di nitrato di bismuto in soluzione acquosa (media \pm e.s.; Kruskal-Wallis test, $P \leq 0.05$)



6.4 Discussione

Le fronde di *L. minor* hanno mostrato una discreta tolleranza alla presenza del Bi mentre i pochi studi su piante terrestri evidenziano effetti tossici del metallo a livello morfo-fisiologico (Passatore et al., 2022). L'effetto genotossico del Bi su *E. veneris* anche a basse concentrazioni conferma il ruolo del gammaride quale bioindicatore per l'ambiente acquatico (Ronci et al., 2016). L'elevato bioaccumulo di Bi in entrambe le specie evidenzia la maggiore sensibilità di *E. veneris* alla presenza del metallo.

Fig 3. Contenuto di Bi negli individui di *E. veneris* esposti per 24h a concentrazioni crescenti di nitrato di bismuto in soluzione acquosa (media \pm e.s.; Kruskal-Wallis test, $P \leq 0.05$)



6.5 Conclusioni

Gli effetti del Bi osservati nei due organismi acquatici rappresentano la prima prova di un'azione tossica specie-specifica di questo metallo nell'ecosistema di acqua dolce. Il notevole accumulo di Bi negli organismi studiati pone una certa preoccupazione, dato il loro ruolo alla base della catena trofica dulcaquicola.

6.6 Bibliografia

- Cosentino S., Aureli F., Iannilli V., 2022. Bisphenols A and its analogues induce genotoxic damage in marine and freshwater amphipods. *Environmental Advances* 7, 100183.
- Passatore L., Pietrini F., Carloni S., Massimi L., Giusto C., Zacchini M., Iannilli,V., 2022. Morpho-physiological and molecular responses of *Lepidium sativum* L. seeds induced by bismuth exposure. *Science of the Total Environment* 831,15489
- Pietrini F., Passatore L., Fischetti E., Carloni S., Ferrario C., Polesello S., Zacchini,M., 2019. Evaluation of morpho-physiological traits and contaminant accumulation ability in *Lemna minor* L. treated with increasing perfluorooctanoic acid (PFOA) concentrations under laboratory conditions. *Science of The Total Environment* 695, 133828
- Pietrini F., Zacchini M., 2020. A New Ecotoxicity Assay for Aquatic Plants: Eco-Tox Photosystem Tool (ETPT). *Trends Plant Science* 25, 1266–1267.
- Ronci L., Iannilli V., De Matthaeis E., Di Donato G., Setini A., 2015. Evaluation of Genotoxic Potential of Waters from Two Italian Rivers in *Gammarus elvirae* (Amphipoda). *Water Environment Research* 87, 2008–2017.
- Wang R., Li H., Sun H., 2019. Bismuth: Environmental Pollution and Health Effects. *Encyclopedia of Environmental Health* 415–423.
- Wei C., Deng Q., Wu F., Fu Z., Xu L., 2011. Arsenic, antimony, and bismuth uptake and accumulation by plants in an old antimony mine, China. *Biol Trace Elem Res* 144, 1150–1158
- Zacchini, M., 2024. Bismuth interaction with plants: Uptake and transport, toxic effects, tolerance mechanisms - A review. *Chemosphere* 360, 142414

7 L'ecotossicologia nel controllo delle acque di un impianto di acquaponica salata

M. Maglitto ^{a1}, M. Francese ^{a2}, G. Bordin ^{a3}

a) Shoreline Soc. Coop. E3, Località Padriciano, 99, 34149 Area di Ricerca TS–

a1) matteo.maglitto@shoreline.it, ^{a2}) marco.francese@shoreline.it, ^{a3}) gabrielebordin96@gmail.com.

Abstract -. Questo studio presenta un piano di monitoraggio innovativo per le acque di processo a ricircolo (RAS) in un impianto di acquaponica salata, che integra idroponica e itticultura. Il piano combina il monitoraggio in continuo dei principali parametri chimico-fisici dell'acqua (toolbox automatizzata) con alcuni saggi biologici selezionati e interpretati secondo una nuova chiave di lettura. Si è proposta dunque l'esecuzione dei seguenti test ecotossicologici: saggio di fecondazione con *Paracentrotus lividus* e saggio con biomarker fotosintetici utilizzando l'alga unicellulare *Isochrysis galbana*, entrambi come segnali di allerta precoce di eutrofizzazione. La sperimentazione è stata condotta presso un impianto pilota previsto dal progetto BEBLUE (Interreg V-A Italia-Slovenia 2021-2027), con l'obiettivo di implementare un sistema di gestione diretto ed efficiente per il monitoraggio dell'acqua.

Keywords: ecotossicologia, acquaponica salata, *Paracentrotus lividus*, *Isochrysis galbana*, eutrofizzazione

7.1 Introduzione

BeBlue (Beyond Bluegrass) è un progetto di capitalizzazione biennale nel programma Interreg Italia-Slovenia, cofinanziato dall'UE, per rafforzare l'agroalimentare sostenibile attraverso l'acquaponica. Il progetto risponde alla sfida globale della sicurezza alimentare, che richiederà un aumento della produzione del 70-100% entro il 2050 (Fronte et al., 2016). L'acquacoltura europea, che fornisce circa il 25% dei prodotti ittici (di cui il 10% da produzione UE) (www.europarl.europa.eu), rappresenta un settore in crescita ma con significativi impatti agli ecosistemi acquatici, già compromessi da inquinamento, eutrofizzazione e alterazione degli habitat (Spradlin et al., 2022). I moderni sistemi RAS hanno migliorato l'efficienza idrica, portando allo sviluppo dell'acquaponica, che integra produzione ittica e vegetale attraverso processi di nitrificazione batterica: del mangime somministrato, il 95% viene metabolizzato dai pesci, con il 30-40% convertito in biomassa e la parte restante disponibile come nutrienti per le piante (Fronte et al., 2016). L'acquaponica marina in sistemi terrestri, utilizzando piante alofite e alghe, realizza un modello produttivo a zero scarti che contribuisce agli Obiettivi di Sviluppo Sostenibile dell'ONU, in particolare SDG2 (Fame Zero) e SDG14 (Vita sott'acqua) (Verma et al., 2023). Per il monitoraggio dell'impianto di acquaponica marina presso il Campus di Mestre dell'Università Ca' Foscari Venezia, sono stati utilizzati test ecotossicologici con due organismi bioindicatori: il riccio di mare *Paracentrotus lividus* e l'alga unicellulare *Isochrysis galbana*. Questi test si propongono come un possibile sistema di allarme precoce per potenziali criticità, con particolare attenzione al fenomeno dell'eutrofizzazione causato dall'eccesso di nutrienti.

7.2 Materiali e metodi

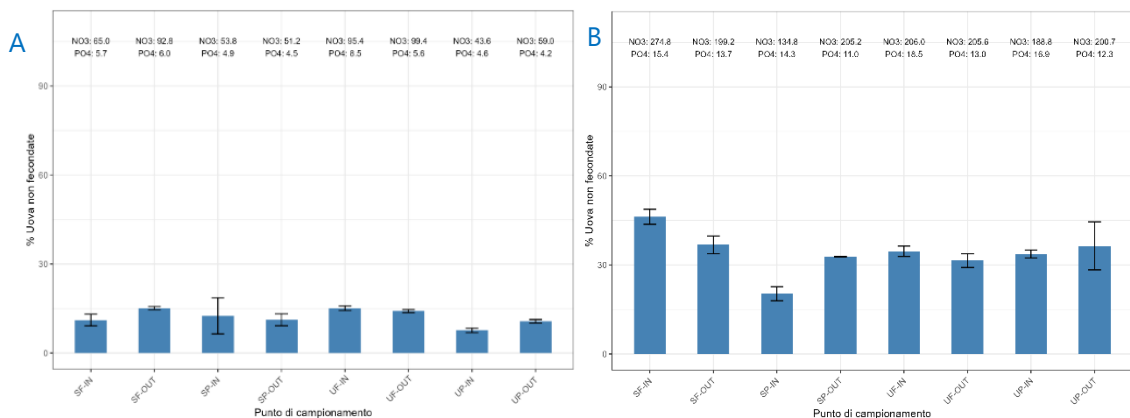
Lo studio sull'impianto di acquaponica è stato condotto attraverso quattro campionamenti tra maggio e ottobre 2024. L'impianto, inizialmente costituito da due linee produttive (*Salicornia europaea* e *Ulva lactuca*), è stato modificato a settembre 2024 sostituendo la linea dell'*Ulva* con una dedicata alla *Sarcocornia perennis*. In tutte le fasi sono stati allevati esemplari di orata (*Sparus aurata*). Per ogni linea, sono stati prelevati campioni d'acqua in quattro punti strategici: ingresso e uscita dalle vasche dei pesci (SF_IN, SF_OUT per *Salicornia* e UF_IN, UF_OUT per *Ulva*), ingresso e uscita dalla sezione di coltivazione (SP_IN, SP_OUT e UP_IN, UP_OUT). La valutazione dell'impatto dei nutrienti è stata condotta mediante: (a) Saggio di fecondazione con *Paracentrotus lividus*: seguendo il protocollo ISPRA (Quaderni Ricerca Marina 11/2017), valutando come end-point la percentuale di uova non fecondate. (b) Saggio con l'alga unicellulare *Isochrysis galbana*: seguendo il metodo APAT-IRSA/CNR (Manuali e Linee Guida 29/2003), è stata valutata l'inibizione della sintesi dei pigmenti fotosintetici (clorofilla a, c e carotenoidi totali) rispetto al controllo negativo, mediante analisi spettrofotometrica.

7.3 Risultati

7.3.1 Saggio di fecondazione con riccio di mare *Paracentrotus lividus*

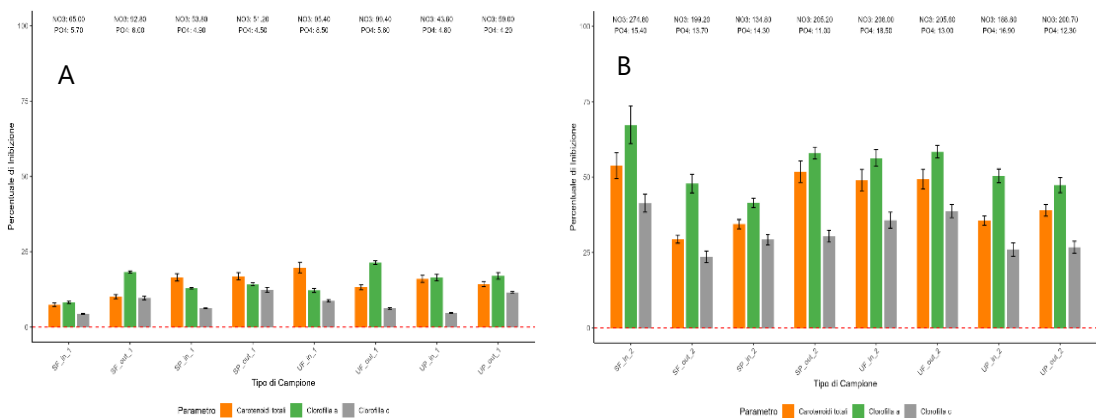
I test di fecondazione con riccio di mare hanno mostrato un'evoluzione significativa della qualità dell'acqua dell'impianto acquaponico tra maggio e giugno 2024. Nei campioni di maggio, gli effetti sulla fecondazione erano minimi, con EC20 ed EC50 superiori al 100% e percentuali contenute di uova non fecondate (5-15%), con valori leggermente più elevati nei punti UF-IN e UF-OUT (circa 15%), corrispondenti alle concentrazioni più alte di nutrienti (NO_3 : 95-99 mg/L; PO_4 : 5.6-8.5 mg/L). I campioni di giugno hanno evidenziato un deterioramento della qualità dell'acqua, con EC20 inferiori al 90% in alcuni punti e un aumento significativo della percentuale di uova non fecondate, raggiungendo circa il 45% nel punto SF-IN, corrispondente alle massime concentrazioni di nutrienti (NO_3 : 274.8 mg/L, PO_4 : 15.4 mg/L). Si è osservato un gradiente lungo la linea *Salicornia*, con riduzione dell'inibizione fino al 20% in SP-IN, mentre la linea *Ulva* ha mostrato un pattern più uniforme (30-35% di uova non fecondate), in presenza di concentrazioni di nitrati relativamente costanti (188-206 mg/L) (Fig. 1). L'analisi di regressione ha rivelato una forte correlazione tra nitrati e inibizione della fecondazione ($r = 0.978$, $p < 0.01$), dimostrando una chiara relazione dose-dipendente: concentrazioni superiori a 200 mg/L inducono a più del 35% di uova non fecondate, mentre valori inferiori a 50 mg/L hanno causato effetti minimi ($< 10\%$).

Figura 1 – Percentuale di uova non fecondate di *P. lividus* in relazione alle concentrazioni di nitrati (NO_3) e fosfato (PO_4) nei diversi punti di campionamento, (A) maggio 2024, (B) giugno 2024.



7.3.2 Saggio con *Isocrysis galbana*

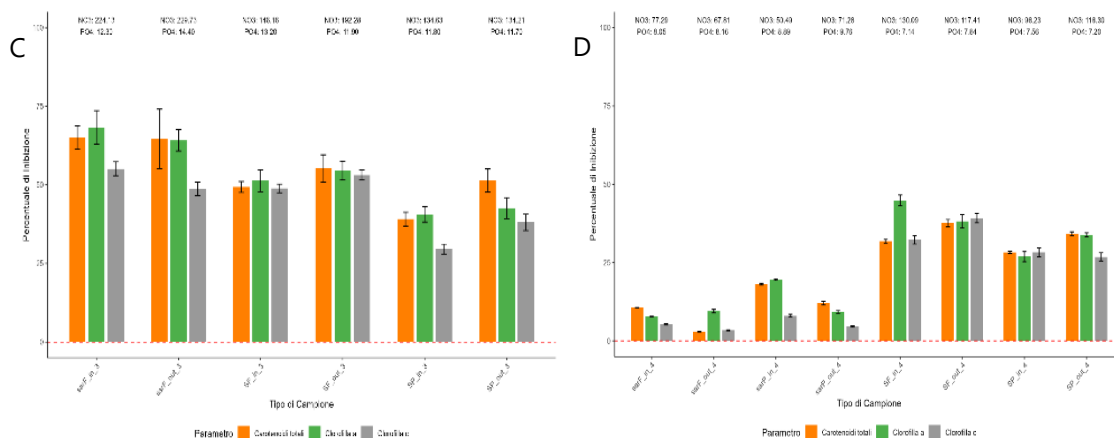
Figura 2 – Percentuale di inibizione dei pigmenti (carotenoidi totali, clorofilla a e clorofilla c) in *I. galbana* esposta ai campioni di acqua prelevati in diversi punti dell'impianto, (A) maggio 2024, (B) giugno 2024



I test sulla risposta fisiologica di *Isochrysis galbana*, effettuati sui campioni prelevati da maggio a ottobre 2024, hanno evidenziato un'evoluzione significativa nell'impianto acquaponico. I campioni di acqua prelevati a maggio, con moderate concentrazioni di nutrienti (NO₃: 43-99 mg/L, PO₄: 4-8.5 mg/L), hanno determinato un'inibizione contenuta (<25%) nella sintesi dei pigmenti fotosintetici dell'alga. I campioni di giugno hanno invece provocato un marcato stress fisiologico nell'alga, con picchi di inibizione fino al 65% per la clorofilla a, evidenziando un accumulo significativo di nutrienti nel sistema (NO₃: fino a 275 mg/L, PO₄: fino a 15.4 mg/L) (Fig. 2).

I campioni di settembre 2024 hanno evidenziato una elevata inibizione dei pigmenti fotosintetici (fino al 70%) nella linea della *Sarcocornia*, mentre la linea *Salicornia* presentava livelli più moderati (~50%). I campioni di ottobre hanno rivelato un significativo miglioramento della qualità dell'acqua, con riduzione degli effetti, ovvero con bassa inibizione per la *Sarcocornia* (5-20%) e con media inibizione nella linea *Salicornia* (30-45%), corrispondenti a concentrazioni di nutrienti più stabili (Fig. 3). Le analisi di regressione hanno confermato delle correlazioni negative statisticamente significative ($p < 0.01$) tra nitrati e i diversi pigmenti fotosintetici: clorofilla a ($r = 0.94$), clorofilla c ($r = 0.89$) e carotenoidi totali ($r = 0.88$) mostrano una marcata inibizione della sintesi per concentrazioni di nitrati superiori a 200 mg/L.

Figura 3 – Percentuale di inibizione dei pigmenti (carotenoidi totali, clorofilla a e clorofilla c) in *I. galbana* esposta ai campioni di acqua prelevati in diversi punti dell'impianto, (C) settembre 2024, (D) ottobre 2024.



7.4 Discussione e Conclusioni

L'approccio multi-organismo con il riccio *Paracentrotus lividus* e l'alga *Isochrysis galbana* ha dimostrato di essere efficace nel monitoraggio dell'acqua in un impianto d'acquaponica. I test con il riccio hanno evidenziato una forte correlazione dose-dipendente tra la concentrazione di nutrienti (in particolarmente i nitrati) e l'inibizione della fecondazione, ma sempre sotto la soglia di tossicità acuta ($EC_{50} > 100\%$). L'alga ha mostrato alterazioni significative dei pigmenti fotosintetici in correlazione alle concentrazioni di nutrienti, evidenziando il cambio nella qualità delle acque nell'impianto. Il protocollo sviluppato offre vantaggi di rapidità, riproducibilità, sostenibilità economica e facilità di implementazione, rendendolo accessibile anche per piccole realtà produttive. La sensibilità di questi organismi a variazioni sub-letali delle condizioni ambientali li qualifica come saggi biologici efficaci nell'early warning, permettendo di identificare potenziali criticità prima che compromettano la funzionalità dell'impianto e fornendo indicazioni utili all'ottimizzazione gestionale per la produzione in acquaponica.

7.5 Ringraziamenti

Si ringraziano i partner di progetto per la collaborazione: Università Ca' Foscari Venezia, Università di Ljubljana, KZ Agraria Koper, KGZ Slovenije, Legacoop Veneto, Università IUAV di Venezia.

7.6 Bibliografia

APAT-IRSA/CNR (Manuali e Linee Guida 29/2003)

A. Spradlin, S. Saha, Saline aquaponics: A review of challenges, opportunities, components, and system design,, Aquaculture, 2022

B. Fronte, G. Galliano, C. Bibbiani, From freshwater to marine aquaponic: new opportunities for marine fish species production, Conference VIVUS, 2016

<https://www.europarl.europa.eu/factsheets/it/sheet/122/il-settore-europeo-della-pesca-in-cifre>

ISPRA, Quaderni Ricerca Marina 11/2017

K. Verma, M.H. Chandrakant, V. C. John, R. M. Peter, I. E. John, *Aquaponics as an integrated agri-aquaculture system (IAAS): Emerging trends and future prospects*, Technological Forecasting and Social Change, 2023

8 Valutazione dello stato di salute di *Apis mellifera* in relazione all'utilizzo di fitofarmaci in viticoltura tramite un approccio multi-biomarker

G. Manieri ^a, S. Casini ^a, I. Caliani ^a, A. Di Noi ^b, T. Campani ^a

^a Dipartimento di Scienze Fisiche, della Terra e dell'Ambiente, Università di Siena, Via Mattioli, 4, 53100, Siena,

Italia - silvia.casini@unisi.it ; campani@unisi.it ; caliani4@unisi.it ; ginevra.manieri@student.unisi.it

^b Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Siena, Via Mattioli, 4, 53100, Siena, Italia –

agata.dinoi2@unisi.it

Abstract - Negli ultimi anni stiamo assistendo ad un declino delle popolazioni di impollinatori, con conseguente declino della loro attività di impollinazione. Tra le minacce per la specie sono rilevanti l'agricoltura intensiva, la massiccia presenza di monoculture e l'elevato uso di fitofarmaci; nel loro complesso queste pressioni antropiche sono in grado di causare gravi danni in queste popolazioni, sia nel breve che nel lungo termine, sia in maniera individuale che collettiva, causando squilibri dell'intero ecosistema. Al fine di contrastare queste problematiche, sono state messe in atto varie direttive a livello europeo che prevedono l'adozione, all'interno degli agroecosistemi, di misure di mitigazione, oltre che di una forte riduzione dell'uso di fitofarmaci. L'efficacia di queste misure deve essere valutata attraverso analisi appropriate al fine di avere una visione più ampia di quali siano i rischi a cui sono sottoposti gli insetti impollinatori. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare gli effetti dei fitofarmaci usati in viticoltura, una delle colture più importanti nel territorio toscano, sulla salute di *Apis mellifera*, l'ape da miele, attraverso un approccio multi-biomarker.

8.1 Introduzione

Un servizio ecosistemico è definito come un qualsiasi processo ecologico attraverso il quale gli umani traggono un giovamento (Fisher et al., 2009). L'impollinazione da parte di insetti rientra tra i servizi ecosistemici. Purtroppo, negli ultimi anni si sta assistendo ad un progressivo declino nella biodiversità numerica e specifica degli insetti impollinatori e di conseguenza del loro importante ruolo all'interno degli ecosistemi. Tra gli insetti impollinatori più importanti troviamo le api appartenenti alla specie *Apis mellifera* (Pires and Maués, 2020). Non fanno eccezione le api gestite da apicoltori, in quanto anch'esse svolgono un'importante attività di impollinazione su un elevato numero di piante sia selvatiche che coltivate (Hristov et al., 2020). Alcune delle cause di questa condizione sono: i cambiamenti climatici, l'agricoltura intensiva, l'elevato uso di pesticidi, la perdita di habitat, i parassiti, introduzione di specie aliene. L'eccessiva applicazione di pesticidi (insetticidi, erbicidi, fungicidi) in agricoltura, soprattutto in quella intensiva, è, tra tutte le cause, quella di maggiore impatto per gli impollinatori ed in grado di colpire, producendo effetti dannosi sulla salute, organismi target e non-target (Dar et al., 2021). L'Unione Europea per cercare di fermare il declino degli impollinatori ha studiato ed emesso delle direttive fra cui la più importante è la EU Pollinators Initiative facente parte della EU Biodiversity Strategy (https://environment.ec.europa.eu/topics/nature-and-biodiversity/pollinators_en). Tra tutti gli impollinatori, le api appartenenti alla specie *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) sono da anni al centro dell'attenzione quando si parla di impollinazione e di perdita di questo importante servizio ecosistemico. Le loro caratteristiche ecologiche e biologiche hanno fatto sì che queste diventassero una specie modello negli studi che trattano temi riguardanti gli impollinatori e la loro diminuzione (Halvorson et al., 2021) (Barmaz et al., 2010). Di rilevante importanza tra questi lavori, sono quelli che valutano gli effetti dei pesticidi sulla salute di *Apis mellifera* attraverso l'analisi di biomarker (Caliani et al., 2021).

8.2 Materiali e metodi

Le api, oggetto dello studio, provenivano da arnie situate all'interno di due aziende viticole a diverso impatto ambientale (biodinamico e convenzionale in conversione al biologico), nei periodi precedenti, contemporanei e successivi all'uso dei fitofarmaci per i trattamenti. Un'ampia batteria di biomarker, che comprendeva endpoint di neurotossicità (acetilcolinesterasi-AChE; carbossilesterasi-CaE), marcatori del sistema di detossificazione della fase II (glutazione-S-transferasi-GST), biomarker di alterazione metabolica (fosfatasi alcalina-ALP) e del sistema immunitario (Lisozima, Profenolossidasi-proPO, Fenolossidasi-PO) sono stati valutati su tutti gli animali.

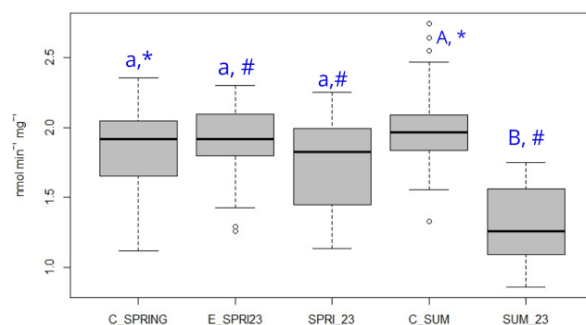
Tab 1.1 Tabella riassuntiva dei campionamenti. Le × indicano i prelievi effettuati, le sigle tra parentesi indicano come sono stati rinominati i campionamenti

Periodo di campionamento	Siti di campionamento	
	Az. agricola biologica biodinamica	Az. agricola in conversione dal convenzionale al biologico
Aprile 2023	× (C_SPRING)	× (E_SPRING23)
Giugno 2023		× (SPRING_23)
Luglio 2023	× (C_SUM)	× (SUM_23)

8.3 Risultati e discussioni

Dai risultati ottenuti, è stato evidenziato che lo stato di salute tossicologico delle api risulta maggiormente alterato negli esemplari campionati nell'azienda convenzionale in conversione al biologico. L'AChE mostra una diminuzione nell'attività principalmente nel periodo successivo a tutti i trattamenti. È stata evidenziata un'induzione dell'attività della CaE a seguito dei trattamenti, indice dell'attivazione del processo di detossificazione. Anche l'analisi della GST, enzima di detossificazione della fase II, mostra un'induzione elevata in questo stesso campionamento. L'analisi dell'attività di ALP mostra un danno a carico del metabolismo sia nella primavera che nell'estate. Per quanto riguarda il sistema immunitario, sono state misurate le attività di Lys, PO e proPO. Le attività del Lisozima mostrano una diminuzione solo tra il controllo spring ed il controllo summer, calo che viene motivato con il debellamento di un'infezione batterica tra i due periodi nel sito di controllo. Per quanto riguarda le attività di PO e proPO vediamo un'elevata attivazione di entrambi gli enzimi principalmente nel sito SUM_23, ciò si traduce in una maggiore attività del sistema immunitario che comprende PO e proPO, probabilmente nel tentativo di debellare un'agente patogeno. L'aumento dell'attività di proPO e PO tra campionamenti spring e summer dell'azienda agricola in conversione, potrebbe suggerire che la proliferazione sia stata favorita dai trattamenti stessi, che abbassano le difese immunitarie. Questa diffusione del parassita provoca l'aumento della risposta necessaria al debellamento. Inoltre, dai dati ottenuti, è possibile vedere come, nonostante l'attività degli enzimi proPO e PO sia più indotta nel campionamento SUM_23, l'efficienza della trasformazione tra fase inattiva proPO e fase attiva PO dello stesso sito e periodo di campionamento sia la più deludente. Questo potrebbe significare che i trattamenti con fitofarmaci effettuati sulle vigne possono indebolire il generale funzionamento del sistema immunitario e con questo l'efficienza del sistema proPO-PO.

Figura 1. Attività di AChE misurata in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ di tessuto nei vari siti di campionamento. I box rappresentano i dati estrapolati da ogni analisi, la linea interna ad ognuno di questi rappresenta la mediana, i segmenti esterni al box indicano il valore più alto (segmento superiore) ed il valore più basso (segmento inferiore). I valori anomali sono rappresentati attraverso dei punti che si trovano sopra o sotto ai segmenti superiore e inferiore. Lettere differenti minuscole indicano differenze statisticamente significative rispetto al controllo SPRING ($p < 0.05$), lettere differenti maiuscole rispetto al controllo SUM ($p < 0.05$). Simboli uguali indicano differenze statisticamente



significative tra i singoli gruppi ($p < 0.05$).

Figura 2. Attività di GST in campioni di *Apis mellifera*, misurata in $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ proteine. I box rappresentano i dati estrapolati dalle analisi di ogni campionamento, la linea interna ad ognuno di questi rappresenta la mediana, i segmenti esterni al box indicano il valore più alto (segmento superiore) ed il valore più basso (segmento inferiore). I valori anomali sono rappresentati attraverso dei punti che si trovano sopra o sotto ai segmenti superiore e inferiore. Lettere differenti minuscole indicano differenze statisticamente significative rispetto al controllo SPRING ($p < 0.05$), lettere differenti maiuscole rispetto al controllo SUM ($p < 0.05$). Simboli e numeri uguali indicano differenze statisticamente significative tra i singoli gruppi ($p < 0.05$).

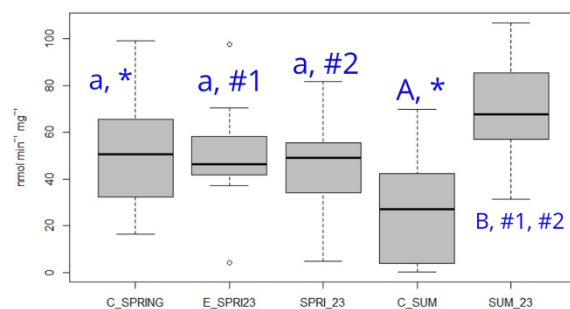
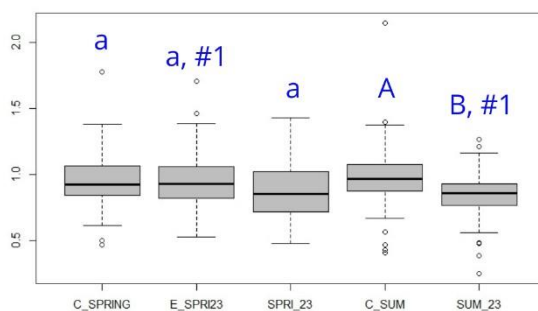


Figura 3. Rapporto tra le attività di PO e proPO nei campioni di *Apis mellifera* analizzati. I box rappresentano i dati estrapolati dalle analisi di ogni campionamento, la linea interna ad ognuno di questi rappresenta la mediana, i segmenti esterni al box indicano il valore più alto (segmento superiore) ed il valore più basso (segmento inferiore). I valori anomali sono rappresentati attraverso dei punti che si trovano sopra o sotto ai segmenti superiore e inferiore. Lettere differenti minuscole indicano differenze statisticamente significative rispetto al controllo SPRING ($p < 0.05$), lettere differenti maiuscole rispetto al controllo SUM ($p < 0.05$). Simboli e numeri uguali indicano differenze statisticamente significative tra i singoli gruppi ($p < 0.05$).



8.4 Conclusioni

Questo studio mostra che in linea generale lo stato di salute di *Apis mellifera* risulta maggiormente alterato negli esemplari campionati nell'azienda agricola in conversione e conferma la necessità di investigare gli effetti subletali di queste sostanze. Infine si vuole evidenziare che, anche se dare una definizione assoluta di quali siano i precisi rischi e danni correlati per ogni singola azienda viticola non risulta possibile date le infinite variabili esistenti, costituite da condizioni climatiche, vicinanza ad altre aziende, attività antropiche e inquinamento, la metodologia basata sull'analisi dei biomarker che è stata applicata mostra una grande validità per la valutazione dello stato di salute di *Apis mellifera* in relazione all'utilizzo dei fitofarmaci in viticoltura.

8.5 Bibliografia

- Fisher, B., Turner, R.K., Morling, P., 2009. Defining and classifying ecosystem services for decision making. *Ecol. Econ.* 68, 6433653.
- Pires, C., Maués, M., 2020. Insect pollinators, major threats and mitigation measures. *Neotrop. Entomol.* 49, 4693471.
- Hristov, P., Shumkova, R., Palova, N., Neov, B., 2020. Factors associated with honey bee colony losses: A mini- review. *Vet. Sci.* 7, 166.
- Dar, S.A., Ansari, M.J., Al Nagggar, Y., Hassan, S., Nighat, S., Zehra, S.B., Rashid, R., Hassan, M., Hussain, B., 2021. Causes and reasons of insect decline and the way forward.
- Halvorson, K., Baumung, R., Leroy, G., Chen, C., Boettcher, P., 2021. Protection of honeybees and other pollinators: one global study. *Apidologie* 52, 5353547. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00841-1>
- Barmaz, S., Potts, S.G., Vighi, M., 2010. A novel method for assessing risks to pollinators from plant protection products using honeybees as a model species. *Ecotoxicology* 19, 1347–1359. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0521-0>
- Caliani, I., Campani, T., Conti, B., Cosci, F., Bedini, S., D'Agostino, A., Ammendola, A., Di Noi, A., Gori, A., Casini, S., 2021. Multi-biomarker approach and IBR index to evaluate the effects of different contaminants on the ecotoxicological status of *Apis mellifera*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208, 111486. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111486>

9 Test ecotossicologi su sedimenti d'acqua dolce: training sugli invasi lombardi

L. Marziali ^a, L. Valsecchi ^a, L. Guzzella ^a, S. Tasselli ^a, C. Borlandelli ^b, E. Lorenzi ^b, C. Bravi ^c

a Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Ricerca Sulle Acque (CNR-IRSA), Via del Mulino 19, 20861 Brugherio (MB) - laura.marziali@irsa.cnr.it

b Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Lombardia (ARPA Lombardia), Dipartimento Regionale Prestazioni Analitiche, U.O. Laboratorio Regionale Area Ovest, Via R. Donatelli, 5, 20162 Milano - c.borlandelli@arpalombardia.it

c Regione Lombardia, Piazza Città di Lombardia, 1, 20124 Milano - clara.bravi@regione.lombardia.it

Abstract – In Lombardia, i sedimenti fini che tendono ad accumularsi negli invasi possono presentare concentrazioni rilevanti di sostanze tossiche (es. metalli, IPA, PCB) e vengono generalmente fluitati, determinando il rischio di effetti ecotossicologici nel corpo idrico di valle. Il “Protocollo analitico per la caratterizzazione chimica ed ecotossicologica dei sedimenti degli invasi” (PrATo), sperimentato in Lombardia, prevede l'utilizzo di batterie di test su sedimento ed eluato: vengono illustrati alcuni risultati, che mostrano le opportunità offerte dall'integrazione di questo approccio con quello classico dell'analisi chimica, ma anche la necessità di una migliore conoscenza dei saggi e dell'ecosistema fluviale su cui vengono applicati, ai fini di una corretta esecuzione e interpretazione dei risultati.

9.1 Introduzione

Gli invasi sono sempre più strategici in ottica water-energy nexus, ma richiedono una costante gestione dei sedimenti che vi si accumulano. In Regione Lombardia, i sedimenti vengono generalmente rilasciati mediante fluitazione nel corpo idrico di valle: questo tipo di operazioni può determinare un impatto ecotossicologico nell'ecosistema fluviale, determinato dal rilascio di sostanze tossiche accumulate nei sedimenti (es. elementi in traccia, IPA, PCB). Da qui è sorta la necessità di mettere a punto un protocollo di analisi di rischio, da applicare ai sedimenti degli invasi utile per programmare le fluitazioni in modo da minimizzare i potenziali effetti tossici a valle e valutare l'esito delle operazioni mediante confronto con le condizioni pre-svaso (Marziali et al. 2017).

Il “Protocollo Analitico per la caratterizzazione chimica ed ecotossicologica dei sedimenti degli invasi” (acronimo: PrATo) è stato via via messo a punto e sperimentato nel corso degli ultimi 8 anni e comprende l'analisi chimica dei sedimenti e l'utilizzo di test ecotossicologici. L'applicazione di batterie di test su sedimento ed eluato mostra le opportunità offerte dall'integrazione di questo approccio con quello classico dell'analisi chimica, ma anche la necessità di una migliore conoscenza dei saggi e dell'ecosistema fluviale su cui vengono applicati, ai fini di una corretta esecuzione e interpretazione dei risultati (Marziali et al. 2025a). In particolare, il saggio di contatto su sedimenti con l'ostracode *Heterocypris incongruens* ha mostrato spesso esiti inaspettati, con falsi positivi, in particolare in presenza di sedimenti fini, che hanno portato a definire meglio le modalità di esecuzione del test (Marziali et al. 2025b). Al contrario, si è spesso osservata l'assenza di effetti tossici laddove l'analisi chimica mostrava estesi superamenti delle soglie di tossicità per alcuni analiti, mostrando come l'ecotossicologia, talvolta percepita con una certa diffidenza dai gestori, possa offrire un valido supporto in un'ottica gestionale (Heise et al. 2021).

Il protocollo è stato ad oggi sperimentato, in parte o totalmente, su circa 57 invasi lombardi. Vengono illustrati alcuni esempi significativi di applicazione.

9.2 Approcci e risultati

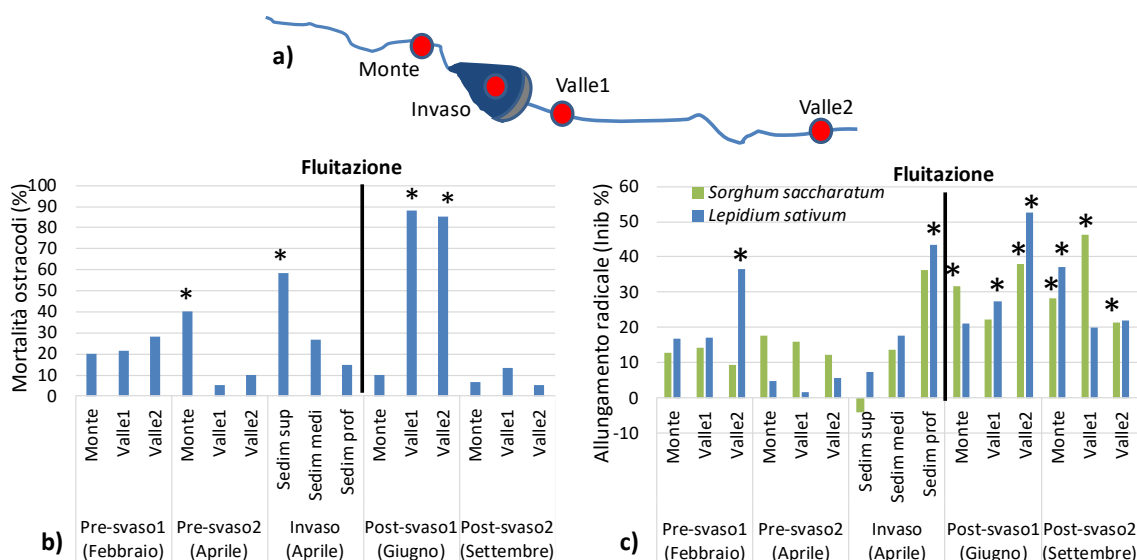
Il PrATo ha permesso di armonizzare il piano di campionamento, i metodi e gli approcci di analisi chimica ed ecotossicologica dei sedimenti, matrice ad oggi non normata. In particolare, negli invasi lombardi risultano spesso critici i valori di arsenico (Tab. 1), un elemento di natura geogenica, che determina valori nei sedimenti nettamente superiori alle soglie ritenute di effetto (es. ISPRA 2011). Tuttavia, i test ecotossicologici hanno dimostrato che la biodisponibilità di questo elemento è generalmente limitata: ad esempio, in un invaso caratterizzato da concentrazioni medie di arsenico nei sedimenti pari a 269 ± 132 mg kg⁻¹ p.s., il test di contatto a 6 giorni con *H. incongruens* ha mostrato mortalità media del $21,7 \pm 6,4$ % e inibizione della crescita del $15,3 \pm 17,2$ % (n=6), ossia percentuali di effetto al di sotto delle soglie considerate significative a livello ambientale.

Tab 1 – Concentrazioni di elementi in traccia, IPA e PCB nei sedimenti degli invasi Lombardi: mediana e range. Viene riportato il confronto con i Sediment Quality Guidelines (SQGs; MacDonald et al. 2000).

Parametro	Mediana	Minimo	Massimo	N. totale di dati	Casi di superamenti dei SQGs	SQGs
		mg kg ⁻¹ p.s.		n.	%	mg kg ⁻¹ p.s.
Arsenico	27	0,8	695	384	43 %	33
Cadmio	0,29	0,06	10,00	287	1 %	4,98
Cromo	22,0	3,0	146,3	368	1 %	111
Rame	24,1	1,0	127,8	378	0 %	149
Mercurio	0,06	0,01	1,2	290	2 %	1,06
Nichel	21,3	1,5	112,0	364	5 %	48,6
Piombo	18	1	247	369	2 %	128
Zinco	85	12	364	387	0 %	459
IPA	0,022	0,0006	3,353	286	1 %	1,610
PCB	0,003	0,0001	0,030	142	0 %	0,0598

Un aspetto emerso dalla sperimentazione è la necessità di approfondire la conoscenza dei singoli sistemi diga-fiume, mediante caratterizzazioni che permettano di identificare i potenziali affetti avversi determinati dalle operazioni, in ecosistemi caratterizzati dalla presenza di altri impatti antropici (Fig. 1).

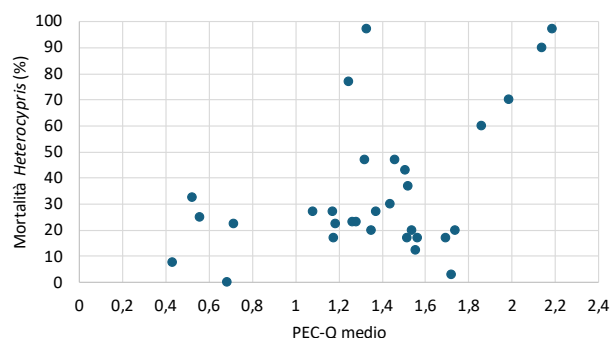
Fig 1 – Applicazione di test ecotossicologici ai sedimenti di un sistema fiume-invaso prima (pre-svaso) e dopo (post-svaso) le operazioni di fluitazione: a) schema dei punti di campionamento (in rosso) nel fiume (un punto a monte e due a valle dell'invaso) e nel bacino (sedimenti superficiali, intermedi e profondi, campionati mediante carotatore); b) risultati del test su sedimenti con ostracodi in due campagne pre-svaso, nell'invaso, e in due campagne post-svaso; c) risultati del test su sedimenti con piante superiori in due campagne pre-svaso, nell'invaso, e in due campagne post-svaso.



e in due campagne post-svaso. Gli asterischi rappresentano le differenze significative rispetto al controllo (ANOVA, post-hoc di Dunnett, $p < 0,05$).

Il piano sperimentale comprende quindi valutazioni pre-svaso e post-svaso in un sito a monte dell'invaso, considerato come "riferimento" e in almeno due siti a valle (Fig. 1).

Questo protocollo analitico, per la valutazione del rischio, viene applicato ad ogni operazione di svasso così da poter definire, anche nei casi in cui non sono noti i valori di background geogenici dei singoli bacini, dei valori di concentrazione sito-specifici ai quali non si rilevano effetti tossici sulle batterie di test. Ad esempio, in Figura 2 è riportato, per un invaso, il calcolo del PEC-Q medio (MacDonald et al. 2000) considerando come *Probable Effect Concentrations* (PEC) le mediane delle concentrazioni misurate nei



sedimenti che non hanno evidenziato tossicità sulle batterie di test applicate (test su sedimenti ed eluati).

Fig 2 – Relazione tra risultati del test su sedimento con l'ostracode *H. incongruens* e PEC-Q medio applicati ad un invaso.

9.3 Conclusioni

il PrATo, eseguito almeno in parte sugli invasi lombardi dal 2016, come previsto dalle “Direttive tecniche per la predisposizione, l'approvazione e l'attuazione dei progetti di gestione degli invasi”, emanate da Regione Lombardia (DGR 5736/2016), ha permesso ad oggi di raccogliere un vasto dataset di dati chimici ed ecotossicologici ottenuti con protocolli e disegni sperimentali armonizzati, che viene via via ampliato ad ogni nuova caratterizzazione, costituendo una base di conoscenza sempre più consolidata in ambito regionale e potenzialmente esportabile in altri contesti, anche alla luce del D.M. 205 del 12 ottobre 2022, in cui è stato a tutti gli effetti adottato l'approccio ecotossicologico nelle caratterizzazioni dei sedimenti degli invasi italiani.

9.4 Bibliografia

Heise S., Babut M., Casado-Martinez C., Feiler U., Ferrari B.J.D., Marziali L., 2020. Ecotoxicological Testing of Sediments – threat or opportunity? *Journal of Soil and Sediments* 20, 4218-4228. <http://dx.doi.org/10.1007/s11368-020-02798-7>

ISPRA, 201. Standard di qualità di sedimenti fluviali e lacuali. Criteri e proposta. Rapporto ISPRA n. 154/2011. <https://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/rapporti/standard-di-qualita-di-sedimenti-fluviali-e>

MacDonald D.D., Ingersoll C.G., Berger T.A., 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 20-31. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620190524>

Marziali L., Tartari G., Salerno F., Valsecchi L., Bravi C., Lorenzi E., Genoni P., Guzzella L., 2017. Climate Change Impacts on Sediment Quality of Subalpine Reservoirs: Implications on Management. *Water* 9, 680. <https://doi.org/10.3390/w9090680>

Marziali L., Valsecchi L., Bastante B., 2025a. Test ecotossicologico con piante superiori: applicazione ai sedimenti degli invasi. *Notiziario dei Metodi Analitici & IRSA News*, volume 1, 2025. <https://www.irsa.cnr.it>

Marziali L., Valsecchi L., Cappetta M., Palumbo M.T., 2025b. Test ecotossicologico con ostracodi *Heterocypris incongruens*: applicazione ai sedimenti degli invasi. *Notiziario dei Metodi Analitici & IRSA News*, volume 1, 2025. <https://www.irsa.cnr.it>

10 Percorso verso la definizione di soglie nazionali per la valutazione degli effetti dei contaminanti sulla specie ittica *Mullus barbatus*

G. Molledo, G. Martuccio, B. Catalano, L. Stellati, C. Sebbio, P. Guarracino, M.T. Berducci, A. Tornambè, C. Maggi

ISPRA (Ist. Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale), Via del Fosso di Fiorano 64, 00143 Roma, Italia - [GINEVRA.MOLLEDO@ISPRAMBIENTE.IT](mailto:ginevra.molledo@isprambiente.it); [GIACOMO.MARTUCCIO@ISPRAMBIENTE.IT](mailto:giacomo.martuccio@isprambiente.it); [BARBARA.CATALANO@ISPRAMBIENTE.IT](mailto:barbara.catalano@isprambiente.it); [LUCA.STELLATI@ISPRAMBIENTE.IT](mailto:luca.stellati@isprambiente.it); [CLAUDIA.SEBBIO@ISPRAMBIENTE.IT](mailto:claudia.sebbio@isprambiente.it); [PAOLA.GUARRACINO@ISPRAMBIENTE.IT](mailto:paola.guarracino@isprambiente.it); [MARIATERESA.BERDUCCI@ISPRAMBIENTE.IT](mailto:mariateresa.berducci@isprambiente.it); [ANDREA.TORNAMBE@ISPRAMBIENTE.IT](mailto:andrea.tornambe@isprambiente.it); [CHIARA.MAGGI@ISPRAMBIENTE.IT](mailto:chiara.maggi@isprambiente.it)

Abstract - Negli ultimi anni la necessità di definire criteri per la valutazione degli effetti dei contaminanti sugli organismi marini ha assunto sempre maggiore rilevanza a livello internazionale (Convenzione di Barcellona, 1976; Marine Strategy Framework Directive). A tal proposito ICES-OSPAR, nella Regione dell'Atlantico nord-orientale, ha stabilito, per alcuni biomarker e per alcune specie bioindicatrici, delle soglie denominate BAC (*background assessment criteria*) e EAC (*ecological assessment criteria*). In maniera analoga, nel Mar Mediterraneo, l'UNEP-MAP ha definito dei valori soglia per i biomarker previsti dai Programmi di Monitoraggio per i mitili (decisione IMAP IG 22/7 2016 e IG 23/6 2017), ma non per i pesci. Al fine di colmare tale gap conoscitivo, l'Italia ha recentemente inserito questa tipologia di indagine nel Programma di Monitoraggio Nazionale della Strategia Marina, coordinato da ISPRA, ed ha intrapreso un percorso per definire valori soglia a livello nazionale per la specie ittica *Mullus barbatus*. A tal fine, ISPRA ha analizzato una batteria di biomarker, in linea con le indicazioni dell'IMAP-UNEP, in circa 800 pesci adulti non in riproduzione, campionati tra il 2019 e il 2023 nelle 3 sottoregioni: Mare Adriatico (MAD), Mar Ionio e Mar Mediterraneo centrale (MIC), Mar Mediterraneo Occidentale (MWE). Le soglie sono state calcolate utilizzando siti di riferimento chimicamente in stato buono, seguendo i criteri stabiliti da UNEP e ICES-OSPAR.

10.1 Introduzione

La Direttiva Quadro sulla Strategia per l'Ambiente Marino (Dir. 2008/56/CE, MSFD) è uno «*Strumento di governance del sistema mare, che promuove l'adozione di Strategie complesse mirate alla salvaguardia dell'ecosistema marino per il raggiungimento del Buono Stato Ambientale (Good Environmental Status, GES)*». Essa si basa sulla valutazione di 11 Descrittori ambientali, tra i quali il Descrittore 8 (D8), definito ai fini della determinazione del GES come: «*Le concentrazioni dei contaminanti presentano livelli che non danno origine ad effetti inquinanti*». Il secondo Criterio previsto per questo Descrittore (D8C2) prevede che «*la salute delle specie e la condizione degli habitat [...] non subiscano effetti negativi [...] a causa di contaminanti*» e che «*gli Stati membri stabiliscono tali effetti negativi e i valori di soglia attraverso la cooperazione regionale o sottoregionale [...]*». Dal 2019 l'Italia, oltre alla concentrazione dei contaminanti nelle diverse matrici ambientali marine, sta monitorando gli effetti dei contaminanti sugli organismi, secondo quanto previsto nel Programma di Monitoraggio italiano, definito nel 2020 ai sensi del D.Lgs. 190/2010. Relativamente al D8C2, infatti, il programma di monitoraggio nazionale, sviluppato da ISPRA, tenendo in considerazione le raccomandazioni IMAP-UNEP (UNEP/MAP, 2017 QSR), prevede l'analisi di una batteria di biomarker nella triglia di fango, *Mullus barbatus*, composto da: 3 analisi «obbligatorie», quali frequenza di micronuclei, attività dell'acetilcolinesterasi, stabilità delle membrane lisosomiali, e 1 «facoltativa», quale attività del citocromo p450. Secondo la definizione di GES dell'art. 9 D.Lgs. 190/2010, ai fini della valutazione degli effetti dei contaminanti sul biota (D8C2), è necessario valutare le «*variazioni significative rispetto ai controlli e/o soglie*». Per soglia si intende la «*condizione biologica di base in organismi in buona salute*» (Davies and Vethaak, 2012). Ad oggi, valori soglia per i biomarker, validi in M. Mediterraneo, sono stati definiti solo per i mitili (decisione IMAP IG 22/7 2016 e IG 23/6 2017). Per i pesci, invece, UNEP suggerisce di fare riferimento ai valori soglia definiti in ambito ICES-OSPAR (Davies and Vethaak, 2012; ICES WGBEC Report, 2013). I valori ICES-OSPAR, tuttavia, sono stati definiti utilizzando dati fino al 2010, relativi ad Atlantico Nord-Orientale e Mediterraneo occidentale (Francia, Spagna). Tali valori, quindi, non sono rappresentativi delle condizioni specifiche delle acque italiane.

Al fine di colmare questo *gap* conoscitivo, sono state quindi calcolate nuove soglie per i biomarker, valide sul territorio nazionale, utilizzando dati ottenuti dalle analisi eseguite su esemplari di triglia di fango, raccolti durante il monitoraggio nazionale 2019-2023, eseguito nelle tre sottoregioni del M. Mediterraneo: MAD, MIC, MWE. Questi valori, ottenuti con protocolli metodologici armonizzati, sono poi utili per definire il buono stato degli animali ed effettuare una valutazione sul raggiungimento del GES per il D8 come richiesto dalla MSFD.

10.2 Materiali e metodi

Secondo le indicazioni di UNEP, i valori soglia per i biomarker devono essere calcolati utilizzando dati provenienti da organismi campionati in aree considerate di Riferimento (UNEP/MAP, 2016 IG.22/7). I Siti di Riferimento (SdR) per la valutazione dei biomarker sono stati selezionati sulla base del grado di contaminazione riscontrato nei campioni di matrice sedimento raccolti durante il monitoraggio nazionale eseguito tra il 2016 ed il 2021 per il D8 della MSFD. In particolare, come SdR per la valutazione degli effetti dei contaminanti, sono stati considerati quei siti con giudizio medio relativo alla chimica dei sedimenti corrispondente al "GOOD" secondo l'indice CQI-SED (Maggi et al., 2022).

Il monitoraggio dei biomarker in *M. barbatus* per il D8C2 è stato condotto dall'ISPRA dal 2019 al 2023, su esemplari catturati in 28 siti lungo i mari italiani. I campionamenti sono stati effettuati in autunno per evitare la fase riproduttiva. Sono stati selezionati 18 SdR basati su dati chimici dei sedimenti, analizzando oltre 100 individui per ciascun biomarker, ovvero la stabilità delle membrane lisosomiali (SML-ESO) misurata nel fegato secondo il metodo citochimico, la frequenza dei micronuclei (MN) misurata nel sangue, l'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE) misurata nel muscolo e nel cervello e l'attività del citocromo P450 misurata nel fegato mediante metodo EROD (UNEP-MAP WG509/43, Annex III, App.23-24; Stagg et al., ICES TIMES 57, 2016). Per il calcolo del valore soglia (BAC) per ciascun parametro, è stato utilizzato il metodo "cautelativo", indicato in ambito ICES-OSPAR (Davies and Vethaak, 2012), che consiste nel calcolare "il 90° percentile di valori medi misurati nei SdR (nel caso di parametri che tendono ad aumentare all'aumentare della contaminazione), oppure il 10° percentile (nel caso di parametri che tendono a diminuire all'aumentare della contaminazione)". Inoltre, in ciascun esemplare sono stati calcolati il fattore di condizione, l'indice gonadosomatico (GSI) ed epatosomatico, considerati parametri "supplementari" (UNEP-MAP WG509/43, Annex III, App. 22). Si specifica inoltre che, sono stati presi in considerazione solo i dati relativi a pesci adulti e non in riproduzione (taglia 12-18 cm; GSI \leq 1,3).

10.3 Risultati

Di seguito vengono riportate le soglie individuate a livello nazionale (tabella 1.3.2.1) da ISPRA per i biomarker in *M. barbatus* pescato nelle tre sottoregioni MAD, MIC, MWE (ISPRA, 2024). Le caratteristiche ambientali di questa area sono: T=14-21°C; salinità=38-39 psu; OD=73-124 $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$.

Tabella 1.3.1.1 Valori soglia (IT-BAC) e valori medi in SdR individuati da ISPRA per *M. barbatus*, in acque italiane C: cervello; M: muscolo; mic: microsomiale.

Biomarker	tessuto	u.m.	IT-BAC	ICES-OSPAR BAC	Valori medi in SdR
SML-ESO	fegato	min	22,61	20	28,62
MN	eritrociti	‰	0,79	0,4	0,42
AChE-C	cervello	nmoli/min/mg prot	67,40	118	105,16
AChE-M	muscolo	nmoli/min/mg prot	33,35	155	40,58
EROD-mic.	fegato	pmoli/min/mg prot	81,11	115 (Ott)	50,54

10.4 Discussione e Conclusioni

La necessità di colmare il *gap* conoscitivo in merito alle soglie da considerare valide in ambito italiano per i biomarker in *M. barbatus* ha permesso di identificare dei valori soglia "preliminari" per SML-ESO, AChE, MN, EROD. Dal confronto dei valori di IT-BAC identificati per i pesci in Italia con i valori soglia ICES-OSPAR BAC, identificati in ambito ICES-OSPAR per la stessa specie campionata nello stesso periodo e di taglia comparabile, emerge che per SML-ESO il valore è più o meno simile tra i due "assessment criteria", per

MN quello definito in ambito nazionale è leggermente più alto, mentre per ACHE-C/M e EROD i valori IT-BAC risultano più bassi rispetto ai valori soglia ICES-OSPAR. Tale discrepanza nei valori dei due diversi contesti conferma la necessità di definire soglie specifiche per l'Italia. Ad oggi in Italia gli studi su *M. barbatus* che abbiano dati confrontabili a livello di periodo di campionamento, protocolli metodologici e tessuti target sono pochi e non sufficientemente rappresentativi dell'area del M. Mediterraneo. Tuttavia, per i 3 biomarker considerati "obbligatori" per IMA-UNEP (MN, SML-ESO, AChE-M), i valori riscontrati in letteratura in siti considerati "di riferimento" (Viarengo et al., 2007; Bolognesi et al., 2006; Lionetto et al., 2004) risultano in linea con i valori medi riscontrati nei SdR individuati in questo studio (v. tab. 1.3.1.1). Infine, è necessario sottolineare che i valori soglia calcolati sono da considerarsi validi in specifiche condizioni ambientali (indicate nel paragrafo "Risultati") in cui sono stati individuati e sono da considerarsi "preliminari". Essi, infatti, saranno oggetto di futuro aggiornamento mediante l'utilizzo di nuovi dati, ottenuti dalle attività di monitoraggio dei prossimi anni.

10.5 Bibliografia

- Bolognesi C., Perrone E., Roggieri P., Pampanin D.M., Sciutto A., 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquat Toxicol* 78, S93–S98.
- Davies I.M. and Vethaak A.D., 2012. Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. ICES Cooperative Research Report, 315. ICES: Copenhagen. Pp. 277.
- D.Lgs 13 Ott. 190/2010. Attuazione della direttiva 2008/56/CE che istituisce un quadro per l'azione comunitaria nel campo della politica per l'ambiente marino (G.U. 18 novembre 2010, n. 270)
- Direttiva 2008/56/C., Marine Strategy Framework Directive MSFD.
- ICES, 2013. Report of the Working Group on the Biological Effects of Contaminants (WGBEC). 10-15 March 2013. San Pedro del Pinatar, Spain. ICES CM 2013/SSGHIE:04. Pp. 37.
- ISPRA, 2024. D.lgs. 190/2010 (Art. 8-9-10). Summary Report D8 – Contaminanti (MSFD). Pp. 68.
- Lionetto M.G, Caricato R., Giordano M.E., Schettino T., 2004. Biomarker application for the study of chemical contamination risk on marine organisms in the Taranto marine coastal area. *Chemistry in Ecology* 20, S333-S345.
- Maggi C., Berducci M.T., Di Lorenzo B., Lomiri, S. Venti F., 2022. Integrated Chemical Status of the Italian Marine Waters sensu Descriptor 8 of the Marine Strategy Framework Directive. *Front. Mar. Sci.*, 9.
- Stagg R., McIntosh A., Gubbins M.J., 2016. Determination of CYP1A-dependent mono-oxygenase activity in dab by fluorimetric measurement of EROD activity in S9 or microsomal liver fractions. *ICESTIMES*57.
- UNEP/MAP, 2016 Decision IG.22/7. Integrated Monitoring and Assessment Programme of the Mediterranean Sea and Coast and Related Assessment Criteria.
- UNEP/MAP, 2017. Decision IG.23/6. Mediterranean Quality Status Report.
- UNEP/MAP, 2021. UNEP/MED WG509/43. Report of the Meeting of the MED POL Focal Points, 27-28 May and 6-7 Oct. 2021. Annex III, App. 22-23-24. Pp. 2514.
- Viarengo A., Lowe D., Bolognesi, C., Fabbri E., Koehler A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Phys. C* 146, 281–300.

11 Ammonio come fattore d'interferenza nei saggi biologici: dal quaderno ISPRA a casi di studio e nuove prospettive

L. Morroni ^a, C. Mugnai ^a, D. Sartori ^a, M. E. Piccione ^a, S. Macchia ^a, G. d'Errico ^b, S. Anselmi ^c, M. Renzi ^d, F. Regoli ^b, D. Pellegrini ^a

a Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Via del Cedro 38, Livorno – lorenzo.morroni@isprambiente.it

b Università politecnica della Marche, Via brecce Bianche, Ancona – g.derrico.staff@univpm.it

c Bioscience Research Center (BsRC), Via Aurelia Vecchia n° 32, Fraz. Fonteblanda 58015 Orbetello (GR) - serena.anselmi@bsrc.it

d Università degli studi di Trieste (UNITS), Piazzale Europa, 1 – 34127, Trieste - mrenzi@units.it

Abstract – L'ammonio, naturalmente presente nei sedimenti delle aree marino costiere, rappresenta un potenziale fattore d'interferenza nella conduzione dei saggi ecotossicologici. La sua concentrazione, soprattutto in aree ricche di sostanza organica, può arrivare a valori tali da generare falsi positivi, mascherando gli effetti di altri contaminanti. Il presente lavoro, volendo portare un contributo sulla problematica senza il riferimento ai singoli dati di dettaglio, riassume alcuni casi di studio nell'ambito dell'applicazione dei saggi ecotossicologici previsti dal DM 173/16, evidenziando le implicazioni gestionali e le strategie per mitigare l'interferenza di questo composto nelle valutazioni ambientali a partire dalle indicazioni del Quaderno ISPRA n. 16/21. I casi di studio relativi alla Laguna di Orbetello e ai porti di Ancona e Pescara confermano la necessità di un approccio standardizzato nella valutazione della tossicità degli elutriati del sedimento, suggerendo soluzioni per migliorare l'interpretazione dei dati ecotossicologici ed il ruolo da attribuire a questo composto in ambienti antropizzati.

11.1 Introduzione

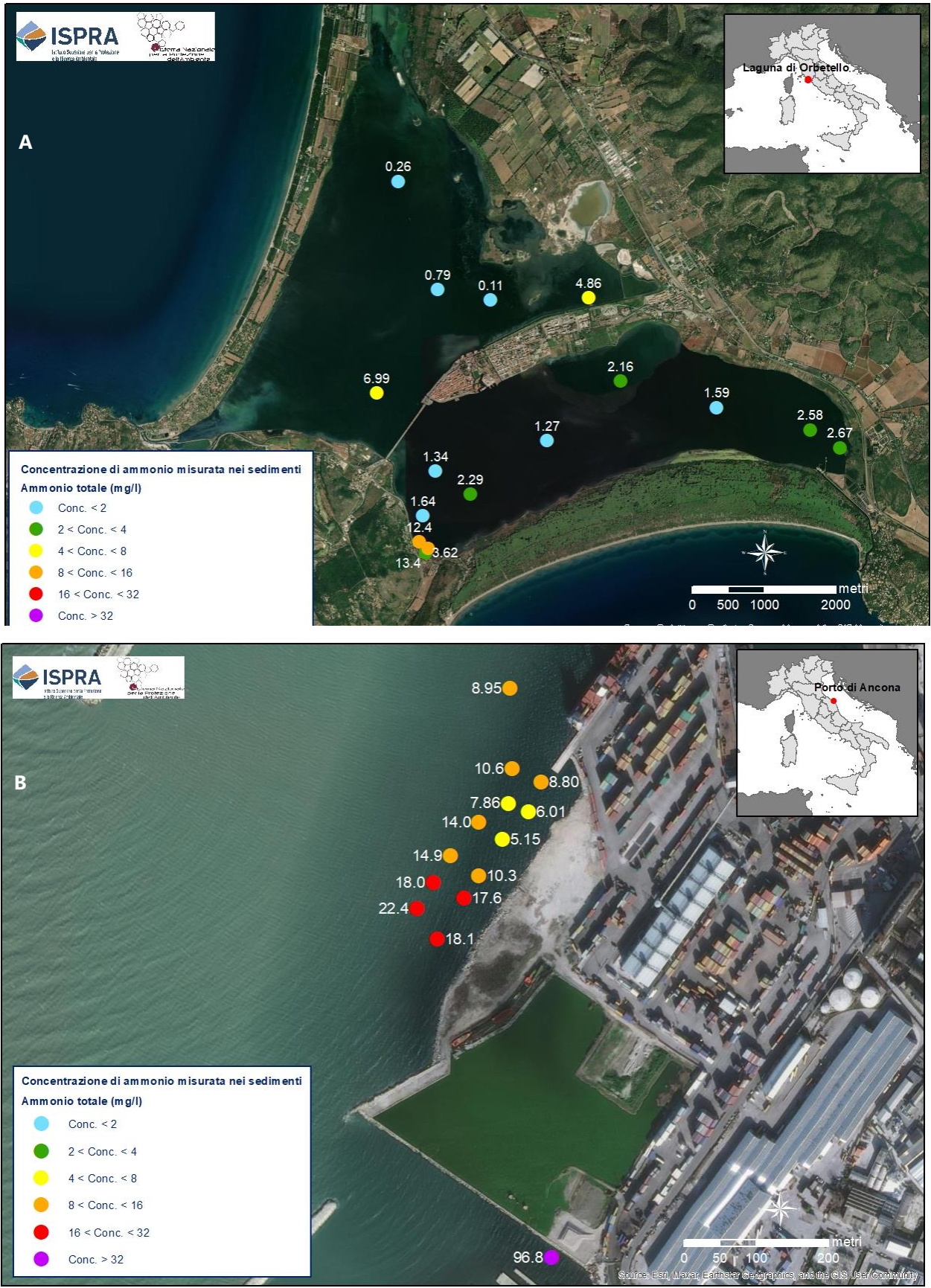
L'ammonio è un composto ubiquitario negli ambienti acquatici e può derivare sia da fonti naturali che antropiche. Nei sedimenti marini, l'accumulo di ammonio è spesso legato alla degradazione della materia organica, specialmente in ambienti salmastri e in aree costiere soggette all'apporto di acqua dolce. Il suo equilibrio chimico è fortemente influenzato da temperatura e pH, con un aumento di NH_3 in condizioni alcaline. In ambiente marino oltre il 90% dell'ammonio si trova nella forma ammoniacale NH_4^+ . Questo composto, presente nella colonna d'acqua, tende ad accumularsi e concentrarsi nei sedimenti, dove ad opera della degradazione batterica viene convertito in forme meno tossiche come i nitriti e successivamente i nitrati (Sartori et al. 2023). Essendo presente nei sedimenti l'ammonio può quindi essere ritrovato nell'acqua interstiziale e negli elutriati utilizzati per la valutazione della qualità ambientale mediante i saggi biologici. Di conseguenza la presenza di questo composto azotato può determinare risposte tossicologiche che non riflettono necessariamente la reale contaminazione da sostanze chimiche di interesse, rappresentando un potenziale fattore di confusione nell'interpretazione dei risultati (Losso et al. 2007). Lo scopo del seguente lavoro è quello di analizzare il ruolo dell'ammonio nei saggi ecotossicologici previsti dal DM 173/16 in diversi casi di studio, valutando possibili implicazioni gestionali e strategie future per tenere in considerazione la sua presenza nelle valutazioni della qualità ambientale di acque e sedimenti marino-costieri.

11.2 Materiali e Metodi

L'analisi è stata condotta su dati raccolti nell'ambito di diverse caratterizzazioni ambientali, con particolare riferimento ai saggi biologici previsti dal DM 173/16. I test ecotossicologici considerati includono saggi acuti e cronici, con elutriati preparati in diversi rapporti sedimento/acqua per saggi di seconda tipologia (1:4) e di sviluppo embrio/larvale (1:10), come indicato da ISPRA (2021). Le concentrazioni di ammonio negli elutriati sono state misurate e correlate con gli effetti biologici osservati. Sono stati esaminati tre

casi studio: Il porto di Ancona, la Laguna di Orbetello e il Porto canale di Pescara, in cui è stata valutata la relazione tra ammonio e risposta tossicologica negli organismi test.

Fig 1 – Concentrazione di ammonio negli elutriati dei sedimenti (mg/L) del porto di Ancona (A) e della Laguna di Orbetello (B).



11.3 Risultati e Discussione

I casi considerati evidenziano come l'ammonio, in diverse località italiane, possa facilmente superare i 2 mg/L e in diversi casi gli 8 mg/L negli elutriati, ovvero i valori soglia previsti da ISPRA (2021) per i saggi di terza tipologia inseriti nell'elenco dei possibili saggi indicati dal decreto (Allegato tecnico DM173/2016). Questo è il caso in particolare del porto di Ancona (Fig. 1A) e della Laguna di Orbetello (GR), dove gli elutriati 1:4 hanno mostrato concentrazioni di ammonio superiori ai limiti soglia (Fig. 1B), con una correlazione positiva tra tossicità riscontrata nei saggi e ammonio. Tuttavia, negli elutriati 1:10 riferiti ai medesimi campioni, la maggior parte dei valori risultava sotto il valore soglia, suggerendo un effetto dose-dipendente dell'ammonio sulla risposta biologica. Tali siti pilota hanno confermato la necessità di considerare l'ammonio come variabile chiave nell'interpretazione dei dati. Inoltre, nel Porto di Pescara si è evidenziato come nell'elutriato 1:10 scompaia la correlazione significativa tra ammonio e tossicità, rendendo invece evidente quella tra tossicità osservata e contaminanti ambientali, altrimenti mascherata dall'ammonio.

Questi risultati suggeriscono quindi che la presenza di ammonio debba essere sempre verificata prima di attribuire effetti tossici ad altri contaminanti. Le indicazioni del quaderno ISPRA (2021) trovano pertanto valide conferme e appaiono efficaci nel mitigare l'influenza dell'ammonio nei saggi biologici senza inficiare l'influenza degli altri contaminanti. Tuttavia, nei casi in cui il rapporto di elutrazione 1:10 (peso secco/volume) non è sufficiente a far scendere il valore dell'ammonio sotto i 2 mg/L, la valutazione del pericolo ecotossicologico, basato sulle batterie di sagge ecotossicologici oggi più utilizzate, continua a presentare elementi di criticità. In alcuni di questi casi, infatti, questo composto azotato, se di origine antropica, potrebbe rappresentare un vero e proprio contaminante, aggiuntivo a quelli tradizionali e persistenti, anziché solo un fattore di confusione. In prospettiva futura, una strada da meglio indagare potrebbe essere, pertanto, il suo inserimento in una lista di parametri aggiuntivi, legati anche agli specifici ambienti in esame, per i quali fornire uno "peso" in una valutazione ponderata ed integrata dei dati seguendo un approccio *Weight of Evidence* (WOE). Nei casi specifici in cui l'ammonio risulti con valori non compatibili con l'esecuzione dei saggi biologici e possa essere considerato un contaminante, il modello di elaborazione dei dati potrebbe prevedere una riduzione del peso dell'ecotossicologia, a favore dell'inserimento di tale composto tra i contaminanti chimici, tramite assegnazione di un peso specifico.

11.4 Conclusioni

L'ammonio rappresenta un importante fattore d'interferenza nei saggi ecotossicologici, con implicazioni significative per la gestione ambientale e la valutazione del rischio. I suoi effetti possono essere ridotti attraverso una corretta progettazione degli esperimenti, in particolare tramite l'uso di soglie di concentrazione nei criteri di interpretazione e, come possibilità futura da approfondire, con un suo inserimento come contaminante chimico aggiuntivo in un approccio WOE. L'applicazione di questo differente ruolo nelle caratterizzazioni dei sedimenti da movimentare e nei monitoraggi ambientali potrebbe consentire una migliore discriminazione tra effetti tossici complessivi e artefatti analitici, contribuendo a decisioni più affidabili e consapevoli nella gestione della qualità delle acque e dei sedimenti marino-costieri, soprattutto in ambienti a rischio di eutrofizzazione.

11.5 Bibliografia

ISPRA (2021). Quaderno ISPRA 16/2021. Linee guida per la valutazione ecotossicologica dei sedimenti marini.

Losso Chiara, Arizzi Novelli Alessandra, Picone Marco, Marchetto Davide, Pantani Claudio, Ghetti Pier Francesco, Volpi Ghirardini Annamaria, (2007). Potential role of sulfide and ammonia as confounding factors in elutriate toxicity

Sartori Davide, Macchia Simona, Gaion Andrea, (2024). Did you consider ammonium? A possible confounding factor in evaluating the toxicity of marine sediments. Marine Pollution Bulletin. Volume 199.

12 Testare nuovi strumenti per la valutazione della qualità ambientale nei Porti Euro-mediterranei: approccio WOE nel Progetto TREASURE

C. Mugnai ^a, L. Morroni ^b, F. Pilato ^b, I. Buttino ^b, L. Sabatini ^c, D. Pellegrini ^b

a Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Via V. Brancati 48, Roma
cristian.mugnai@isprambiente.it

b Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Via del Cedro 38, Livorno

c Agenzia per lo Sviluppo Empolese Valdelsa SCpA (ASEV)

Abstract – Il progetto Interreg EUROMED TREASURE ha come obiettivo generale il miglioramento della qualità ambientale nei porti mediterranei e nelle aree ad essi circostanti, mitigando e riducendo l'inquinamento dei sedimenti e dell'acqua.

ISPRA, partner di TREASURE, coordina il WP2, relativo alla sperimentazione di nuovi approcci per la valutazione della qualità ambientale nelle aree portuali attraverso un approccio Weight of Evidence.

In questo senso è stato proposto un tool specifico di integrazione ponderata, al fine di promuovere un approccio comune per la valutazione del rischio ambientale a libello transazionale.

In questo contributo vien presentato il progetto TREASURE e la sua rilevanza in termini di cooperazione transazionale e di sfide comuni che affronta, con particolare riguardo alla messa a punto dell'approccio innovativo di valutazione integrata.

12.1 Introduzione

Il progetto TREASURE, finanziato dal secondo bando del Programma Interreg Euro- Med 2021-2027, ha come obiettivo generale il miglioramento della qualità ambientale nei porti mediterranei e nelle aree ad essi circostanti, mitigando e riducendo l'inquinamento dei sedimenti e dell'acqua.

Il progetto è coordinato dall' Agenzia per lo Sviluppo Empolese Valdelsa Spa (ASEV) e coinvolge, oltre a ISPRA, il Porto di Bar (Montenegro), Fund de la Com. Valenciana para la investigación, promoción y estudios comerciales de Valenciaport (Spagna); Autorità Portuale di Durazzo (Albania); Pôle Mer Méditerranée – Toulon Var Technologie (Francia); Autorità dei Trasporti di Malta; l'Autorità Portuale del Pireo (Grecia); Central European Initiative (CEI).

ISPRA coordina Work Package 2, che si pone l'obiettivo di promuovere nuovi approcci per la valutazione ambientale nelle aree portuali del Mediterraneo, portando alla definizione di una matrice di valutazione dell'impatto e gestione del rischio ambientale, da testare nei territori TREASURE. A tal fine, è stato applicato un approccio Weight Of Evidence (WOE). Questo approccio, messo a punto da Piva et al. (2011) precedentemente convalidato e implementato nel progetto Interreg Marittimo Italia-Francia GEREMIA, fa riferimento a un modello quantitativo per integrare molteplici dati ambientali eterogenei in scenari di monitoraggio complessi. In particolare, il WOE si basa su indagini multidisciplinari, ponderate in modo diverso a seconda della loro rilevanza ecologica, e chiamate *Lines Of Evidence* (LOE). Le LOE includono analisi chimiche tradizionali e diverse indagini biologiche. L'obiettivo generale è stabilire non solo la presenza ma anche la biodisponibilità di contaminanti e il verificarsi di effetti biologici avversi a diversi livelli, dal livello molecolare a quelli degli organismi o della comunità. Nel progetto TRASURE è stato scelto il modello Weight Of Evidence (SediquaSoft®) per essere testato a livello transazionale.

Attraverso SediquaSoft®, vengono elaborati in modo indipendente diverse linee di evidenza (LOE), per calcolare un indice di rischio ambientale integrato delle aree portuali. Tale indice viene ottenuto utilizzando criteri specifici per ciascun dato, ponderando la tipologia di inquinanti chimici e la rilevanza eco-tossicologica degli endpoint misurati, nonché il numero e l'entità delle variazioni osservate normalizzate verso soglie specifiche. In questo modo, vengono calcolati indici di pericolo sintetici e

quantitativi per ciascun LOE, prima della loro integrazione complessiva nella valutazione WOE: il livello di rischio calcolato viene assegnato a una delle cinque classi di rischio, che vanno da rischio assente a grave.

12.2 Materiali e Metodi

Le LOE considerate nel modello sono: la caratterizzazione chimica dei sedimenti (LOE-1), la caratterizzazione chimica della colonna d'acqua (LOE-2), la valutazione della biodisponibilità (bioaccumulo) in organismi bioindicatori idonei (LOE-3), gli effetti biologici subletali misurati attraverso l'analisi di biomarkers (LOE-4), l'applicazione di batterie di saggi ecotossicologici (LOE-5) e l'analisi delle comunità bentoniche (LOE-6).

A tutti i partner TREASURE) è stato chiesto di selezionare un minimo di 2 LOE da testare nelle loro aree portuali durante la durata del progetto, raccogliendo dati da almeno 2 stazioni di campionamento. E' stato suggerito di posizionare le stazioni una all'interno e una all'esterno dell'area portuale, per riflettere diversi gradienti di contaminazione (ad esempio sedimenti, dragaggio, estuario del fiume, ecc.). Si suggerisce un campionamento periodico, due volte all'anno, come ottimale. Sono state inoltre identificate soglie comuni per confrontare i dati tra nazioni e porti. ISPRA, in qualità di leader del WP2, ha fornito indicazioni, quando necessario. Elementi tecnici, come la scelta degli analiti, sono stati discussi con i partner durante incontri svolti in presenza (Kick-off meeting a Livorno il 3-4 aprile 2024; Meeting 02 a Valencia il 15-16 ottobre 2024) e durante incontri bilaterali interattivi online, alcuni dei quali organizzati su richiesta specifica da alcuni partners

12.3 Risultati e Discussione

I partners, generalmente non esperti sull'approccio di indagine proposto, soprattutto per quanto riguarda la componente biologici, hanno scelto di concentrarsi sulle indagini chimiche della colonna d'acqua e del sedimento. Nella maggior parte dei casi, sono state scelte stazioni di campionamento già utilizzate in programmi di monitoraggio, integrando il set analitico anche attraverso il ricorso a soggetti esterni. Alcuni partners, quali il porto di Malta e il Porto di Bara (Montenegro) hanno mostrato interesse riguardo alle indagini biologiche, rispettivamente saggi biologici e bioaccumulo con i mitili trapiantati.

Nel periodo settembre-novembre 2024, una web demo basata sull'interfaccia SediquaSoft® è stato reso accessibile a ciascun partner TREASURE da ISPRA.

La demo consente l'elaborazione e l'integrazione di dati ambientali storici campionati in ciascun territorio, considerando, come punto di partenza, l'analisi chimica della colonna d'acqua (LOE 1) e dei sedimenti (LOE 2). La demo consente ai partner di familiarizzare con lo strumento, al fine di sviluppare la matrice definitiva di Hazard Management, con il set completo di LOE selezionati e adattati ai territori TREASURE e determinare gli indici di rischio integrati per ciascun porto.

12.4 Conclusioni

L'applicazione di una matrice integrata basata sull'approccio Weight of Evidence (WOE) consentirà di valutare la qualità ambientale e gestire i rischi negli ecosistemi marini, nelle aree portuali TREASURE e nelle zone limitrofe. Applicando il WOE, una valutazione qualitativa di diversi comparti ambientali non solo misura la presenza di sostanze chimiche, ma valuta anche il loro impatto mediante una valutazione integrata TREASURE utilizzerà, in tutta l'area Euro-MED, il modello WOE per calcolare un indice ambientale integrato delle aree portuali, consentendo così di confrontare le diverse aree con gli stessi criteri quantitativi. Ciò è rilevante soprattutto durante il confronto di scenari di rischio ambientale prima e dopo la sperimentazione di nuove tecniche di bonifica, oggetto sempre del progetto TREASURE.

La cooperazione transnazionale, in particolare nei test applicati all'applicazione pratica in ambienti portuali reali, porterà a significativi passi avanti nella valutazione della qualità ambientale. Ciò è rilevante per diverse sfide ambientali di rilevanza transnazionale come il dragaggio dei sedimenti, l'inquinamento delle acque reflue, le fuoriuscite di petrolio e il monitoraggio.

Pertanto, la nuova matrice di gestione dell'impatto ambientale/dei rischi può essere utilizzata per raccogliere informazioni e fornire un indice di rischio quantitativo sviluppato utilizzando solide basi scientifiche.

12.5 Bibliografia

GEREMIA, Gestione dei reflui per il miglioramento delle acque portuali, <https://interreg-maritime.eu/web/geremia>

Piva, F.; Ciaprini, F.; Onorati, F.; Benedetti, M.; Fattorini, D.; Ausili, A.; Regoli, F.(2011). Assessing Sediment Hazard through a Weight of Evidence Approach with Bioindicator Organisms: A Practical Model to Elaborate Data from Sediment Chemistry, Bioavailability, Biomarkers and Ecotoxicological Bioassays. Chemosphere, 83, 475–485, doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.064.

SEDIQUALSOFT® <https://www.isprambiente.gov.it/it/archivio/notizie-e-novita-normative/notizie-ispra/2022/05/il-software-per-la-gestione-dei-sedimenti-marino-costieri-da-dragare-sediqualssoft-109-0-da-oggi-on-line-sul-sito-web-ispra>

TREASURE, Testing novel environmental quality measures in and around EURO-MED ports <https://treasure.interreg-euro-med.eu/>

13 Nuovi End Point e sistemi di tipo Early Warning per il monitoraggio ambientale

V. Piazza ^a, E. Costa ^a, C. Gambardella ^a, F. Garaventa ^a, M. Giuga ^a, R. Miroglio ^a, R. Nugnes ^a, F. Castelli ^a, M. Faimali ^a

a CNR IAS – Istituto per lo Studio degli impatti antropici e sostenibilità in ambiente marino – via De Marini 6, 16149 Genova, Italy - veronica.piazza@ias.cnr.it

Abstract - Nell’ambito del progetto PNRR “Robotics and AI for Socio-economic Empowerment (RAISE)”, sono in fase di sviluppo innovative soluzioni automatizzate per il monitoraggio in campo dell’ambiente marino. Nello specifico, CNR IAS sta mettendo a punto sistemi di tipo “Early Warning” basati sull’analisi del movimento di stadi larvali ed adulti di organismi acquatici, in grado di fornire un segnale in tempo reale in risposta alla presenza di inquinanti o altre fonti di stress ambientale. In questo studio vengono riportati i risultati della fase di messa a punto di due differenti sistemi per il monitoraggio ambientale: i) un sistema per il rilevamento del movimento dello stadio adulto del crostaceo *Amphibalanus amphitrite*; ii) un sistema automatizzato per la registrazione del nuoto di larve di invertebrati acquatici. Entrambe i sistemi sono finalizzati alla quantificazione automatizzata di risposte comportamentali degli organismi modello in risposta a stress ambientali, fornendo innovativi strumenti per attività di monitoraggio degli impatti antropici in ambiente marino.

Abstract - In the frame of the Italian National Recovery and Resilience Plan (NRRP) Robotics and AI for Socio-economic Empowerment (RAISE) project, we are developing innovative, automatic solutions to be used directly in the field for marine environmental monitoring. CNR IAS is working on the development of “Early Warning” (EW) systems based on larval and adult stage movement, able to provide a real-time signal when pollution or other stressors may occur in the natural environment. In this study we report preliminary results of setup of two EW systems: i) a device able to detect motion behavior of the adult stage of the crustacean *A. amphitrite*; ii) an automated tool able to record swimming behavior of planctonic organisms. Both systems are designed to develop devices for the automatic detection of behavioral responses to environmental stressors, to be used in marine environment monitoring.

13.1 Introduzione

Il monitoraggio ambientale riveste un ruolo sempre più importante nella gestione del territorio. In questo contesto, è di grande rilevanza lo sviluppo di strumenti di indagine innovativi in grado di associare risposte biologiche a tecnologie che ne facilitano l’applicazione come i biosensori. I biosensori sono particolarmente importanti per il monitoraggio ambientale in quanto permettono una analisi rapida ed in continuo/semi-continuo delle fluttuazioni di uno o più parametri contemporaneamente. Tra questi sistemi, i BEWS (Biological Early Warning Systems), utilizzano risposte fisiologiche o comportamentali come strumento biologico di pre-allarme per individuare alterazioni della qualità ambientale in continuo (on-line monitoring), in modo facile, rapido ed economico. Uno degli obiettivi del progetto PNRR RAISE è la realizzazione di sistemi di allarme ambientale on-line di campo automatizzati, in grado di registrare alterazioni fisiologiche/comportamentali su modelli biologici e di fornire un allarme di tipo precoce in situazioni di potenziale inquinamento ambientale. Nello specifico, CNR IAS sta sviluppando due diversi sistemi di tipo “Early Warning” (EWS): i) un sistema per il rilevamento del movimento dello stadio adulto del crostaceo *A. amphitrite*; ii) un sistema automatizzato per la registrazione del nuoto di larve di invertebrati acquatici. In questo studio vengono riportati i risultati preliminari ottenuti durante la fase di messa a punto dei due EWS. In particolare, il primo strumento è in grado di rilevare il movimento (apertura/chiusura delle valve; movimento delle appendici) di adulti di *A. amphitrite*, considerando le variazioni comportamentali come indice di stress ambientale. In letteratura sono disponibili poche informazioni a riguardo (6,8), pertanto la fase preliminare dello studio è stata dedicata alla messa a punto del set-up di registrazione ed alla misurazione delle risposte comportamentali al variare di diversi parametri ambientali. Tali dati preliminari risultano di fondamentale importanza per un futuro utilizzo delle variazioni del movimento di questo organismo quali indice di stress in presenza di una

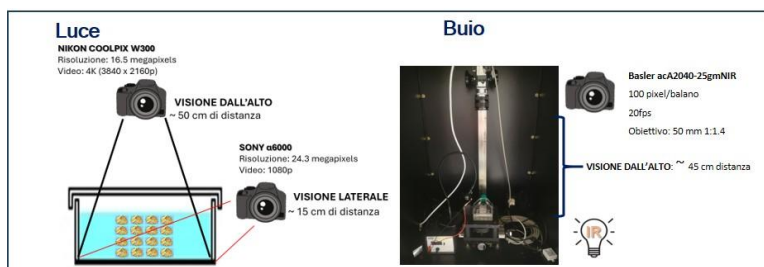
contaminazione ambientale. Il secondo strumento proposto, invece, valuta il comportamento natatorio di organismi planctonici per rilevare in maniera precoce gli effetti dovuti alla presenza di inquinanti. Precedenti studi di letteratura hanno mostrato l'elevata sensibilità di questa risposta comportamentale nei confronti di un ampio range di sostanze inquinanti (12-14), confermando l'idoneità di questo EWS come strumento per il monitoraggio ambientale. Le attività svolte hanno portato all'implementazione di un sistema prototipale per la registrazione del nuoto, basato su quello già presente presso il CNR IAS. Il risultato è un nuovo prototipo denominato "Behavioral Alteration Recorder (BAR)" che presenta un upgrade sia a livello di hardware che di software ed un TRL (Technology Readiness Level) più elevato, oltre a dimensioni e peso ridotti, tali da renderlo uno strumento appetibile per il mercato.

13.2 Materiali e metodi

13.2.1 Sistema per il rilevamento del movimento dello stadio adulto del crostaceo *A. amphitrite*

I test preliminari hanno previsto la messa a punto del set-up per la registrazione dei movimenti (apertura/chiusura valve; estroflessione appendici) degli adulti di *A. amphitrite*. Circa 15-20 esemplari (1-2 cm diametro) sono stati posizionati su un supporto e posti all'interno di beakers contenenti acqua di mare naturale filtrata. Sono stati allestiti due differenti set-up: uno per effettuare le riprese in condizioni di illuminazione ed uno in condizioni di buio. In quest'ultimo caso, per poter consentire la registrazione dei video, è stata utilizzata una luce IR (fig.1). Successivamente, sono stati registrati video della durata di 5 minuti in entrambe le condizioni (luce/buio) sia al variare della temperatura (15-20-25°C) che in presenza/assenza di cibo (*Artemia* sp. 3 nauplii/ml; *Tetraselmis suecica* 5×10^4 cells/ml).

Fig 1 – Set-up per la registrazione del movimento dello stadio adulto del crostaceo *A. amphitrite*



13.2.2 Sistema automatizzato per la registrazione del nuoto di larve di invertebrati acquatici

L'implementazione del nuovo sistema per la registrazione del nuoto di larve planctoniche, denominato "Behavioral Alteration Recorder (BAR)", consiste in: i) una nuova telecamera con risoluzione ottica più elevata; ii) un software in grado di riconoscere in maniera automatizzata il movimento (velocità del nuoto) degli organismi planctonici e di fornire un dato di velocità media per il numero totale di organismi registrati; iii) un hardware con dimensioni e peso ridotti. Il nuovo prototipo BAR è stato quindi validato registrando variazioni del comportamento natatorio delle larve (nauplii di *A. amphitrite* e di *Artemia* sp.) in presenza di contaminanti (sia tradizionali che emergenti).

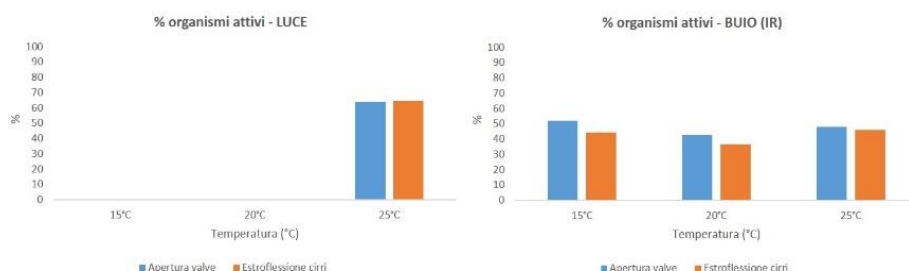
13.3 Risultati

13.3.1 Sistema per il rilevamento del movimento dello stadio adulto del crostaceo *A. amphitrite*

Le registrazioni effettuate con il set up in condizioni di luce evidenziano l'influenza della temperatura, infatti, a 15 e 20 °C vi è un'assenza di movimento, mentre, a 25°C circa il 60% degli organismi risulta attivo.

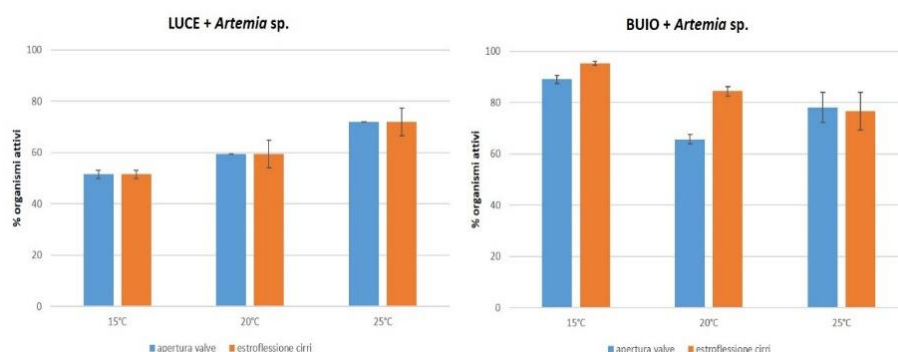
Al contrario, con il set up "buio", che utilizza luce IR, la temperatura non risulta condizionare il movimento dei crostacei adulti (fig. 2).

Fig.2 Percentuale di organismi attivi a 15-20-25°C in condizioni di luce e buio



La presenza di cibo ha mostrato un'influenza significativa sul movimento degli organismi; in particolare, la presenza di prede in movimento (nauplii di *Artemia* sp.), determina un aumento nella percentuale di organismi attivi ed una maggior frequenza nel movimento delle appendici (cirri). Questo è particolarmente evidente utilizzando il set up di registrazione al buio (con luce IR), dove le percentuali di organismi attivi superano il 60% a tutte le temperature testate (fig. 3).

Fig. 3 Percentuale di organismi attivi in presenza di cibo (*Artemia* sp.) a 15-20-25°C in condizioni di luce e buio



13.3.2 Sistema automatizzato per la registrazione del nuoto di larve di invertebrati acquatici

Il nuovo sistema per la registrazione del nuoto (BAR) è stato validato utilizzando stadi larvali planctonici di crostacei (nauplii di *A. amphitrite* e *Artemia* sp.). L'effetto tossico, ovvero la percentuale di alterazione della velocità del nuoto rispetto al controllo, di contaminanti, sia tradizionali che emergenti, misurato con il sistema BAR è risultato confrontabile con i dati di letteratura ottenuti con il prototipo precedente.

13.4 Discussione e conclusioni

La fase preliminare di validazione in laboratorio dei sistemi di tipo "Early Warning" per il monitoraggio ambientale ha mostrato buone potenzialità per entrambe gli strumenti proposti. La messa a punto del sistema per il rilevamento del movimento di adulti di *A. amphitrite* ha permesso di valutare quale tra le due risposte comportamentali osservate sia la più idonea considerando anche la variazione dei parametri nelle due condizioni di registrazione. Tali informazioni di base risultano necessarie per la successiva fase di automatizzazione del sistema, attualmente in fase di sviluppo grazie alla collaborazione con aziende. L'implementazione del sistema prototipale per la registrazione del nuoto di organismi planctonici ha portato alla progettazione di un nuovo prototipo (BAR) che, alla luce dei dati ottenuti nella validazione di laboratorio, presenta un livello di automatizzazione più elevato rispetto al prototipo originale, mostrando un elevato livello di sensibilità nel rilevare le risposte comportamentali. Le dimensioni ridotte rispetto al

prototipo originale ed il suo incremento in termini di TRL ne favoriscono il potenziale ingresso nel mercato di settore.

13.5 Bibliografia

6. Southward AJ. 1955. On the behavior of barnacles. *Journal of the Marine Biological Association UK* 34, 403-422.
8. Pope HR, Alexander ME, Robinson TB. 2016. Filtration, feeding behaviour and their implications for future spread: a comparison of an invasive and native barnacle in South Africa. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 479, 54-59.
12. Mesarič T, Gambardella C, Milivojević T, Faimali M, Drobne D, Falugi C, Makoveč M, Jemec A, Sepčić K. 2015. High surface adsorption properties of carbon-based nanomaterials are responsible for mortality, swimming inhibition, and biochemical responses in *Artemia salina* larvae. *Aquatic Toxicology* 163, 121-129.
- [13] Gambardella C, Costa E, Piazza V, Fabbrocini A, Magi E, Faimali M, Garaventa F, 2015. Effect of silver nanoparticles on marine organisms belonging to different trophic levels. *Marine Environmental Research* 111, 41-49.
- [14] Piazza V, Gambardella C, Costa E, Miroglio R, Faimali M, Garaventa F, 2022. Cold storage effects on lethal and sublethal responses of *Amphibalanus amphitrite* nauplii. *Ecotoxicology* 7, 1078-1086.

14 L'approccio ecotossicologico nella proposta di linee guida per la definizione delle terre da coltivo ottenute dal risanamento biologico di rifiuti terrosi

D. Rossi ^a, L. Federico ^a, S. Villa ^a, A. Franzetti ^a

a Università degli Studi di MILANO Bicocca – DISAT – d.rossi39@campus.unimib.it

Abstract - Garantire il riciclo dei rifiuti terrosi è fondamentale, soprattutto se si considera che in Italia sono prodotte ogni anno migliaia di tonnellate di questi materiali. L'intenso sfruttamento del suolo aggrava ulteriormente la problematica, con una costante diminuzione di una risorsa essenziale per l'ambiente e l'agricoltura. La prassi di riferimento proposta si propone di affrontare tali sfide, promuovendo il recupero e la valorizzazione dei rifiuti terrigeni. In tale contesto, le analisi ecotossicologiche giocano un ruolo cruciale nel garantire la sostenibilità e la sicurezza ambientale dei materiali recuperati. Nella nuova prassi di riferimento, queste valutazioni contribuiscono a definire criteri di qualità ambientale chiari e rigorosi, assicurando che i rifiuti terrosi recuperati rispettino gli standard di idoneità ecologica. L'integrazione di tali analisi consente di promuovere un approccio basato sul rischio, rendendo i processi di recupero compatibili con il riutilizzo sostenibile delle *terre da coltivo* in un'ottica di economia circolare.

14.1 La nuova prassi di riferimento UNI (PdR)

Le Prassi di Riferimento UNI (PdR) sono documenti pre-normativi che introducono prescrizioni tecniche o modelli applicativi in assenza di normative specifiche. Rispondono rapidamente alle esigenze di mercato e possono evolversi in norme consolidate. La PdR proposta mira a definire una "carta d'identità" per le *terre da coltivo*, stabilendo criteri per il riutilizzo dei rifiuti terrosi in Italia e in Europa.

14.1.1 Obiettivi

L'obiettivo è incentivare il recupero dei rifiuti terrosi trasformandoli in EoW (End of Waste), grazie a processi di risanamento biologico. Questi materiali potranno essere impiegati per il ripristino di paesaggi e ampliamento delle aree verdi, favorendo l'economia circolare. In particolare, la nuova proposta di PdR mira a:

- Definire criteri tecnologici e ambientali per codificare le *terre da coltivo*.
- Adottare un approccio basato sul rischio "destino-specifico", sostituendo le CSC (Concentrazioni Soglia di Contaminazione) con le CSR (Concentrazioni Soglia di Rischio), adattate alle destinazioni d'uso.

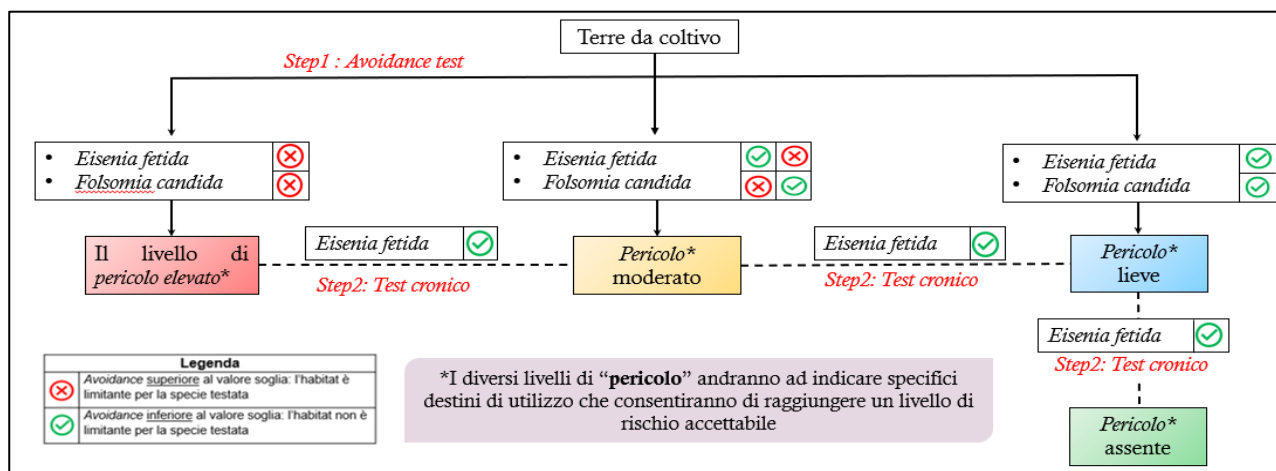
14.1.2 Criteri di qualità ambientale: i criteri di qualità ecotossicologica

Nel merito dei criteri di qualità ambientale, vengono presi in esame anche i criteri di qualità ecotossicologica, con cui si valuta la funzionalità ecosistemica dei suoli e l'impatto dei contaminanti sulla comunità biologica. Il protocollo proposto è suddiviso in due fasi e prevede l'esecuzione di saggi ecotossicologici con specie edafiche indicatrici come *Eisenia fetida/andrei* e *Folsomia candida*, considerando end point specifici per anomalie comportamentali, capacità riproduttive e sopravvivenza (Fig. 1.1). Il protocollo prevede:

- Step 1: Test di evitamento su collemboli¹ e lombrichi². Se il valore di evitamento supera il 70% o l'80% (a seconda dell'organismo target) per una, entrambe o per nessuna specie, si attribuisce un livello di pericolo tra le tre categorie proposte: "elevato, moderato e lieve".

-Step 2: si prevede l'esecuzione facoltativa di un test riproduttivo (considerato test di refinement del potenziale per le biocenosi del suolo) su *Eisenia fetida/andrei*³: se la riduzione della prole nei lombrichi è inferiore al 50% rispetto al suolo di controllo (LUFA 2.2), la classificazione del pericolo passa a una categoria inferiore: da "elevato" a "moderato", da "moderato" a "lieve", e da "lieve" ad "assente".

Fig 1.1 – Protocollo di esecuzione dei saggi ecotossicologici al fine di assegnare il livello di pericolo ai diversi campioni di *terra da coltivo*.



14.2 Analisi preliminari: Saggi ecotossicologici con *Eisenia fetida/andrei* e *Folsomia candida* (test di evitamento)

14.2.1 Dataset e Metodi

Sono stati analizzati sette campioni di *terre da coltivo* prelevati dopo un processo di biorisanamento, provenienti da due impianti (Imp1 e Imp2) con differenti caratteristiche chimico-fisiche e livelli di contaminazione. I campioni sono stati trattati con biopila dinamica per rimuovere idrocarburi, analizzando periodicamente pH e contaminazione residua. Sono state misurate anche le concentrazioni finali di metalli (es. arsenico, cromo VI, piombo, nichel), composti organici (fenoli, PCB, IPA) e microorganismi indicatori di contaminazione fecale (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*), tutti entro i limiti per uso commerciale e industriale.

Le analisi, eseguite secondo i metodi UNI EN ISO¹⁻², hanno avuto una durata di 48 ore con cinque repliche per campione e un test di controllo negativo. I campioni sono stati collocati in contenitori divisi in due sezioni: una con il terreno da analizzare e l'altra con il suolo di riferimento (LUFA 2.2), entrambi setacciati a 2 mm e disposti in strati omogenei di qualche cm. Dopo la rimozione del setto divisorio, sono stati introdotti gli esemplari oggetto del test e i contenitori sono stati sigillati con pellicola (forata per garantire l'ossigenazione). Il fotoperiodo adottato è stato 16:8 h luce-buio, come da norma.

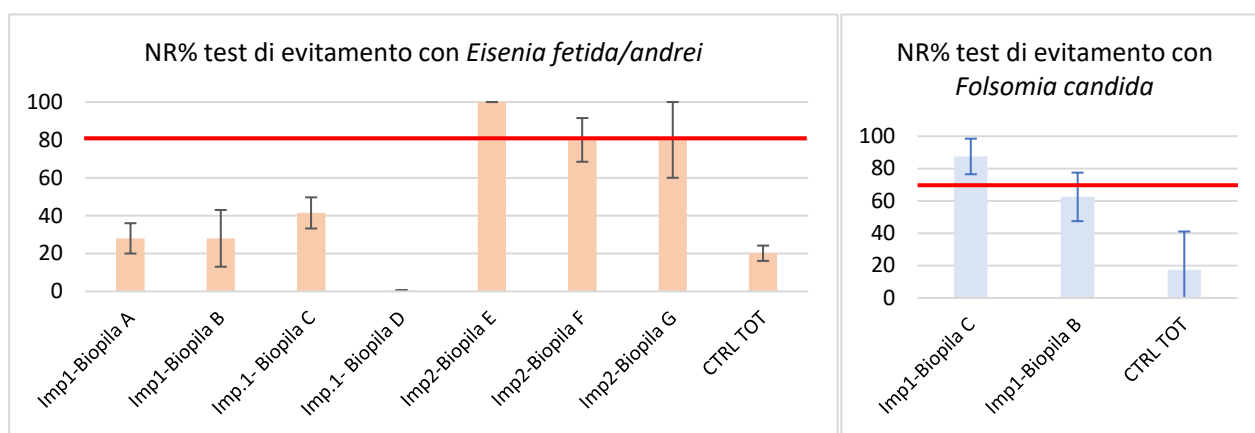
14.3 Risultati

I Risultati vengono espressi come risposta netta percentuale (NR%) che si calcola tramite la seguente formula: Risposta Netta (NR%) = [(numero di organismi nel controllo - numero di organismi nel suolo test) / numero di organismi in totale] * 100.

In Fig. 2.1 sono mostrati i risultati dei primi saggi ecotossicologici condotti sia per i lombrichi e per i collemboli, espressi come NR%. Se si osserva il caso di *Eisenia fetida* (grafico a sinistra) l'istogramma "CTRL TOT" rappresenta il controllo negativo, in cui entrambe le sezioni del contenitore sono riempite con terreno standard (LUFA 2.2), con una NR% attesa tra 15% e 20% che valida il test. Nei campioni trattati,

invece, si osserva una maggiore variabilità nei valori di evitamento (NR%). Alcuni, come "Imp2-Biopila E", mostrano un evitamento vicino al 100%, suggerendo condizioni sfavorevoli o potenziale tossicità, nonostante l'assenza di contaminanti rilevati. Ciò potrebbe dipendere da fattori come tessitura, pH, umidità, disponibilità di sostanza organica o squilibri microbici. I campioni "Imp2-Biopila F" e "Imp2-Biopila G" presentano NR% attorno all'80%, indicando un effetto meno severo ma comunque significativo. I campioni di Imp1 mostrano invece valori di evitamento inferiori (30-40%), suggerendo condizioni più favorevoli per i lombrichi. Per minimizzare le variabilità, i test sono condotti in condizioni standardizzate, con esemplari selezionati per peso ed età. Se si osserva il grafico di sinistra, relativo ai saggi condotti con *Folsomia*, anche in questo caso l'istogramma "CTRL TOT" fa riferimento al controllo negativo, che per validare la prova deve mostrare una NR% inferiore al 20%. Per i due campioni "Imp1-Biopila C" e "Imp1-Biopila B" è possibile associare una classe di pericolo, avendo a disposizione i risultati di entrambi i test. Al primo, è assegnato un valore di pericolo "moderato" dal momento che per i collemboli ha rappresentato un habitat limitante, ma non per i lombrichi. Per il secondo campione la classe di pericolo è "lieve", non avendo provocato risposte critiche in nessuna specie testata.

Fig 2.1 – Risultati dei saggi ecotossicologici per *Eisenia fetida* e *Folsomia candida*. Ciascun istogramma fa riferimento ad un esperimento compost da diverse repliche



14.4 Prospettive future

È necessario completare le diverse fasi di test e ampliare il numero di campioni da analizzare, inserendo anche i dati di caratterizzazione pedologica. Inoltre, occorre definire un criterio ponderato che permetta di interpretare e integrare i diversi aspetti trattati dalla PdR. Infine, è importante caratterizzare la comunità microbiologica dei campioni testati per verificare l'eventuale relazione con i risultati dei saggi ecotossicologici

14.5 Bibliografia

UNI EN ISO 17512-2 (edizione dicembre 2020) Qualità del suolo - Test di comportamento anomalo per determinare la qualità dei suoli e gli effetti delle sostanze chimiche - Parte 2: Prova con collemboli (*Folsomia candida*)

UNI EN ISO 17512-1 (edizione dicembre 2020) Qualità del suolo - Test di comportamento anomalo per determinare la qualità dei suoli e gli effetti delle sostanze chimiche - Parte 1: prove con i lombrichi (*Eisenia fetida* ed *Eisenia andrei*).

UNI EN ISO 11268-2 (edizione aprile 2023) Qualità del suolo - Effetti degli inquinanti sui lombrichi - Parte 2: Determinazione degli effetti sulla riproduzione di *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* e altre specie di lombrichi.

15 Saggio di tossicità con *Phaeodactylum tricornutum* su tossico cieco secondo il protocollo standard ISO 10253:2016 – Prima prova valutativa interlaboratorio

A. Tornambè^a, C. Sebbio^a, F. Onorati^a, C. Martone^a, S. Barbizzi^a

a Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Via V. Brancati 48, Roma
andrea.tornambe@isprambiente.it

Abstract - Per il saggio di inibizione della crescita algale con *Phaeodactylum tricornutum*, il protocollo di riferimento standardizzato è il metodo ISO 10253. Questo metodo permette di eseguire il saggio in diverse modalità operative, il che potrebbe però portare ad una variabilità nei risultati. In questo contesto, ISPRA ha organizzato un confronto interlaboratorio a livello nazionale per confrontare i risultati relativi alla determinazione dell'inibizione del tasso di crescita delle alghe (ErC₅₀) dovuta a un tossico di riferimento (TR) e un tossico cieco (TC). Il valore del TC è stato determinato come media di consenso robusto (anti-trasformata) dei risultati ErC₅₀ (log-trasformati), con i relativi intervalli di confidenza (95%).

Questo test di competenza ha consentito una valutazione delle prestazioni dei laboratori riguardo alle misurazioni ErC₅₀ a 72h con il tossico cieco, attraverso l'attribuzione di punteggi z-score.

15.1 Introduzione

Il saggio di inibizione della crescita algale con la diatomea marina unicellulare *Phaeodactylum tricornutum* viene ormai ampiamente utilizzato nei programmi di monitoraggio, come previsto anche dal DM 173/2016. Per l'esecuzione del saggio si fa solitamente riferimento al metodo standardizzato ISO 10253 [1], che tuttavia può essere eseguito in diverse modalità operative che potrebbero portare ad una variabilità nei risultati. In questo contesto ISPRA ha raccolto l'esigenza a livello nazionale di un confronto dei risultati relativi alla determinazione dell'inibizione del tasso di crescita delle alghe (ErC₅₀) dovuta a specifici materiali di prova, tramite l'organizzazione di un confronto interlaboratorio a livello nazionale. Questo confronto è stato organizzato dal Centro PTP (Proficiency Testing Provider) n.10, afferente all'Area Metrologia con la collaborazione dell'Area Ecotossicologia del Centro Nazionale per la rete Nazionale dei Laboratori di ISPRA. L'iniziativa è stata rivolta sia ai laboratori delle ARPA/APPA indicati dalla Rete RR-TEM 16-3 (per il supporto a ISPRA nell'organizzazione di confronti interlaboratorio in ambito SNPA), sia a laboratori privati ed enti di ricerca.

Il disegno sperimentale della prova ha previsto la determinazione dell'inibizione del tasso di crescita di *P. tricornutum* per effetto di un tossico di riferimento TR e di un tossico cieco TC, consentendo di acquisire informazioni circa il grado di dispersione dei risultati forniti dai laboratori.

In questo contesto, sulla base dei risultati ottenuti per il TR, è stata effettuata anche una valutazione preliminare della variabilità dovuta ad alcune diverse modalità di esecuzione del test, come consentito dal metodo ISO 10253:2016.

15.2 Materiali e Metodi

15.2.1 Materiali di prova

Il tossico di riferimento (TR), non fornito dagli organizzatori, era costituito da sale dicromato di potassio K₂Cr₂O₇, mentre il tossico cieco, fornito dagli organizzatori, era costituito da sale zinco solfato eptaidrato (ZnSO₄·7H₂O) ultrapuro ≥ 99% (PM: 287,56).

Per la prova definitiva sono stati richiesti i valori grezzi ed ErC₅₀-72 ± 2 ore, espresso in mg L⁻¹, determinato secondo il metodo di calcolo in uso presso il laboratorio partecipante, per il TR e per il TC.

15.2.2 Valori Assegnati

Il valore assegnato alla proprietà di interesse relativo al TC è stato determinato come valore medio robusto di consenso (anti-trasformato) dei risultati di ErC_{50} (log trasformati) dei Laboratori partecipanti tramite l'applicazione dell'Algoritmo A [2]. Al valore assegnato sono stati associati un limite inferiore (Lim. Inf) e uno superiore (Lim. Sup.) di attenzione pari al valore assegnato più o meno due volte il valore dello scarto tipo robusto della prova valutativa, espressi in forma anti-trasformata dei valori logaritmici [3]. Lo scarto tipo robusto della prova valutativa, così come il valore assegnato, è stato ottenuto tramite un foglio di calcolo validato che sviluppa l'algoritmo A di statistica robusta [2] sulla base dei valori logaritmici e successivamente anti-trasformato, secondo quanto riportato in "Environment Canada, 2005" [3].

15.2.3 Elaborazione statistica e criteri di valutazione dell'accettabilità dei risultati

Per ciascun risultato grezzo restituito dai partecipanti, l'organizzatore ha effettuato un ricalcolo del valore di inibizione del tasso di crescita e conseguentemente dell' ErC_{50-72h} utilizzando il foglio di calcolo "Alghe Marine Regtox" [4] applicando il modello di regressione non lineare Logit-Hill a quattro parametri. L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando modelli statistici appropriati ai saggi ecotossicologici ed in conformità alla norma UNI ISO 13528:2022 [2].

In particolare, tutti i valori di ErC_{50} rielaborati sono stati trasformati in logaritmo base 10, secondo quanto riportato in "Environment Canada, 2005" [3] ed elaborati tramite Kernel Density e Istogramma per individuare la forma della distribuzione dei dati, successivamente tramite test di Grubbs e grafico Box Plot per l'individuazione di eventuali outlier. Infine, è stata applicata la statistica robusta in accordo a UNI ISO 13528:2022 [2]. Per il TC la valutazione dell'accettabilità dei dati di ciascun laboratorio è stata effettuata sulla base dei punteggi di z-score (z) calcolati in accordo a UNI ISO 13528:2022 e UNI EN ISO/IEC 17043:2023 [2,5]. Sono stati adottati i seguenti criteri di accettabilità degli z-score: $z \leq 2,0$ Accettabile; $z \leq 3,0$ Discutibile; $z \geq 3,0$ Non accettabile.

15.3 Risultati

15.3.1 Partecipazione

Dei 31 laboratori aderenti alla prova, 24 hanno restituito i risultati di cui 6 Agenzie regionali, 2 laboratori ISPRA, 12 laboratori privati e 4 Università/Enti di ricerca.

15.3.2 Valori Assegnati

Il valore assegnato di riferimento ErC_{50} (anti-logaritmo e logaritmo), con i rispettivi limiti di attenzione, per il TC è stato 66,3 mg/L (22,8-192,7).

15.3.3 Analisi dei risultati

Nelle seguenti figure vengono riportati i valori ErC_{50} , ricalcolati con foglio di calcolo "Alghe Marine Regtox", con i rispettivi limiti inferiori e superiori per il TC (Fig.1) e TR (Fig.3).

In Fig.2 vengono riportati i valori degli z-score su TC per ogni singolo laboratorio.

Figura 1: valori di z-score per ogni singolo laboratorio

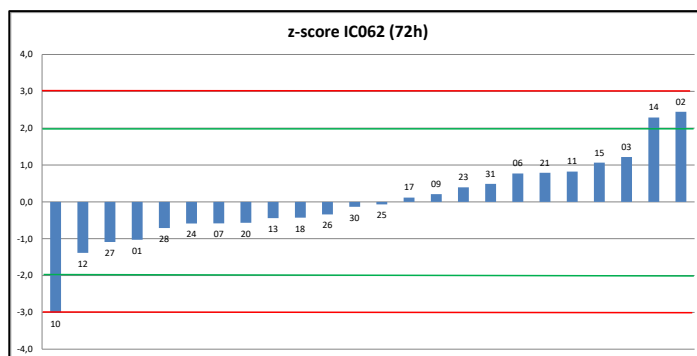


Figura 2: grafico riepilogativo delle EC_{50} per lo $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ di ogni singolo laboratorio. La linea rossa continua rappresenta il valore di consenso anti-log pari a 66,3 mg/L e le linee tratteggiate rappresentano il limite inferiore (22,8 mg/L) e superiore (192,7 mg/L).

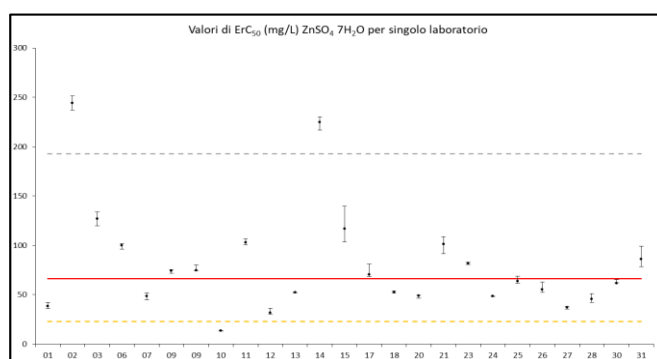
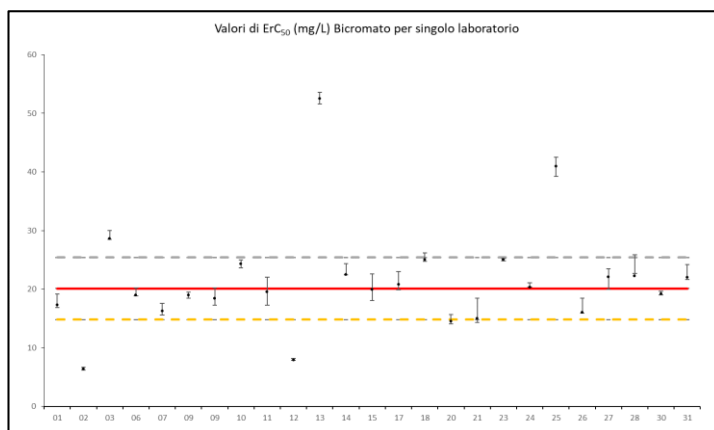


Figura 3: grafico riepilogativo delle E_rC_{50} per il bicromato di tutti i laboratori partecipanti. La linea rossa continua rappresenta l' E_rC_{50} del Bicromato indicato dalla norma ISO 10253:2016 (20,1 mg/L) e le linee tratteggiate rappresentano la deviazione standard ($\pm 5,3$ mg/L).



15.3.4 Valutazione preliminare delle varianti metodologiche impiegate

Per la prova su *P. triconutum* ogni laboratorio ha adottato la propria metodologia di allestimento e lettura del saggio. In particolare, 12 laboratori hanno eseguito il test in piastra, 6 laboratori in beuta, 6 utilizzando le celle spettrofotometriche (Kit) (un laboratorio ha restituito i risultati di due saggi eseguiti con due varianti metodologiche diverse). Per quanto riguarda i metodi di misura delle densità algali, 10 laboratori hanno adottato la conta microscopica manuale, 10 la lettura spettrofotometrica, 5 un sistema di conta

automatica. Su 24 laboratori 8 hanno utilizzato il foglio di calcolo "Alghe Marine Regtox" per la stima della ErC₅₀ sia del TR che del TC.

15.4 Discussione

Su un totale di 24 laboratori, 21 presentano uno z-score accettabile, 2 discutibile e 1 non accettabile.

Il livello di dispersione tra laboratori dei risultati delle misure espressi in valore logaritmico ha evidenziato una risposta confrontabile rispetto al criterio Environment Canada (CV% del 20% come valore "preferibile" di una serie di dati ecotossicologici). Nello specifico per il TC il valore di CV% ottenuto è stato di 12,7%.

Da una valutazione preliminare delle varianti metodologiche non sono emerse differenze significative tra i tre sistemi di misura della densità cellulare, mentre si evidenzia una differenza significativa tra il sistema Alghe marine Regtox e le diverse modalità di calcolo adottate dai 16 laboratori.

15.5 Conclusioni

La partecipazione dei laboratori alla prova rispetto alle adesioni (24 su 31) può essere ritenuta più che positiva e si osserva, in generale, una corretta applicazione dei metodi di esecuzione dei saggi.

La prova valutativa ha consentito, mediante l'attribuzione di punteggi z-score, di verificare le prestazioni dei laboratori in merito alle misure di ErC₅₀ a 72h con tossico cieco. I valori di z-score per il TC sono molto soddisfacenti, in relazione allo scarto tipo della prova stessa.

Per quanto riguarda la modalità di esecuzione, i metodi più utilizzati sono stati il saggio in piastra con conta microscopica e l'utilizzo del kit spettrofotometrico; tuttavia, non sembrano incidere significativamente sulla variabilità dei risultati al contrario dell'applicazione del sistema di calcolo utilizzato per la stima della ErC₅₀. Si ritiene quindi che ogni ulteriore discussione non possa prescindere dal ricercare primariamente una maggiore uniformità nell'utilizzo dei modelli per la stima delle ErC₅₀.

15.6 Bibliografia

1. UNI EN ISO 10253:2017: Water quality — Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema sp.* and *Phaeodactylum tricornutum*
2. UNI ISO 13528:2022 "Metodi statistici utilizzati nelle prove valutative mediante confronti interlaboratorio".
3. Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests. Environment Canada Report EPS 1/RM/46 March 2005 (with June 2007 amendments).
4. http://www.normalesup.org/~vindimian/en_index.html
5. UNI EN ISO/IEC 17043:2023 "Valutazione della conformità - Requisiti generali per la competenza dei provider di prove valutative interlaboratorio"

16 Ecotossicologia della matrice aria: a che punto siamo?

S. Vezzoli^a, R. Pedrazzani^{ab}

a DIMI-Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Industriale, Università di Brescia, Via Branze 38, I-25123 Brescia, Italia - simona.vezzoli@unibs.it

b MISTRAL-Centro di Ricerca Interuniversitario "Modelli Integrati di Prevenzione e Protezione in Salute Ambientale e Occupazionale", DSCS, Dipartimento di Scienze Cliniche e Sperimentali, Università degli Studi di Brescia, Viale Europa 11, I-25123 Brescia, Italia - roberta.pedrazzani@unibs.it

Abstract - Il numero sempre crescente di contaminanti rappresenta una minaccia concreta per gli organismi viventi e l'ambiente, costantemente esposti a tali sostanze attraverso numerose sorgenti. L'ecotossicologia si inserisce in questo contesto come disciplina fondamentale per valutare l'impatto di agenti chimici sul biota e sugli ecosistemi, contribuendo allo sviluppo di regolamenti e strategie volte alla loro tutela. Se da un lato gli studi ecotossicologici su matrici come acqua, suolo e sedimenti si avvalgono di metodi standardizzati, quelli sulla matrice aria sono ancora in via di sviluppo e mancano di metodi consolidati. Poiché, però, la componente particolata è da anni oggetto di studio e approfondimento, questa revisione della letteratura scientifica si è focalizzata sui composti organici volatili (VOC), i cui potenziali effetti dannosi a livello respiratorio, neurologico, immunitario, e riproduttivo sono ben noti sui mammiferi, anche in ragione della ricerca nel settore della medicina del lavoro. Molto meno noti sono gli effetti di questi contaminanti su organismi come piante, batteri e animali invertebrati. Inoltre, la letteratura tende a concentrarsi su composti o miscele di sintesi, trascurando una valutazione più ampia della tossicità dell'aria atmosferica, che include miscele presenti in ambiente naturale. Si pone pertanto la necessità di utilizzare modelli biologici alternativi più rapidi ed economici; se l'esecuzione di test ecotossicologici su piante rispetta questi criteri ed è più semplice, l'utilizzo di invertebrati come *Drosophila melanogaster* nei saggi biologici è più diffuso (60 % degli studi indagati) e offre un'alternativa promettente per gli studi sulla tossicità dei VOC, non solo su endpoint apicali, ma anche biochimici e molecolari. In sintesi, è necessario condurre ulteriori studi mirati a comprendere meglio la tossicità della matrice aria, integrando modelli vegetali e animali, e adottando nuovi organismi come gli insetti e altri invertebrati.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, composti organici volatili, *Drosophila melanogaster*, emissioni gassose, tossicità dell'aria

16.1 Introduzione

I VOC (Volatile Organic Compounds) sono sostanze caratterizzate da elevata volatilità (con una tensione di vapore maggiore o uguale a 0,01 kPa alla temperatura di 293.15 K) responsabili, accanto alla componente particolata, dell'inquinamento atmosferico. I VOC possono avere origine naturale e antropica. Essi vengono rilasciati nell'ambiente indoor, attraverso vernici, cosmetici, detergenti, materiali edili, lementi d'arredo, così come in ambiente esterno, tramite produzioni industriali petrolchimiche, cartarie, alimentari, automobilistiche, di verniciatura, tessili, trasporti, e altre attività.

Gli effetti nocivi dei VOC sulla salute umana in ambienti indoor sono ampiamente documentati; l'esposizione a questi contaminanti aumenta infatti il rischio di sviluppare malattie respiratorie, leucemia, difetti congeniti, disturbi neurocognitivi e tumori (Li et al., 2021). D'altra parte, è ormai ampiamente riconosciuto che queste sostanze abbiano un impatto anche a livello atmosferico, contribuendo all'assottigliamento dello strato di ozono, alla formazione di smog a livello del suolo e causando potenziali effetti ecologici legati ai cambiamenti climatici (Kamal et al., 2016).

Considerata la scarsità attuale di studi sull'ecotossicologia dei VOC e l'assenza di saggi biologici standardizzati per testare questa matrice, questa review presenta gli approcci e i metodi individuati in letteratura, con l'obiettivo di delineare una metodologia sperimentale futura nell'ambito di un progetto di ricerca di interesse nazionale.

16.2 Lo stato dell'arte della letteratura scientifica

16.2.1 Modelli biologici

Dal 1997 al 2020 sono state pubblicate 17 ricerche, con una maggiore frequenza tra il 2008 e il 2017. Le specie modello utilizzate comprendono sia piante che animali. Tra le specie vegetali testate figurano *Arabidopsis thaliana* e alcune specie del genere *Tradescantia* spp., con una selezione di genotipi, sia wildtype che ibridi, e testando diversi stadi vitali. Per quanto riguarda le specie animali, sono stati utilizzati insetti e vermi clitellati: *Tribolium castaneum*, *Eisenia fetida*, e *Drosophila melanogaster*. Per le prime due specie sono stati testati individui adulti wildtype, mentre per *D. melanogaster* individui appartenenti a ogni stadio vitale, sia wildtype che transgenici e mutanti. La maggior parte delle pubblicazioni riguarda specie animali (13 articoli), con *D. melanogaster* risultante il modello più utilizzato (10 articoli).

Questo dittero è riconosciuto come un eccellente modello biologico, grazie al suo basso costo, alla semplicità di utilizzo, al breve ciclo vitale e alla conoscenza approfondita del suo genoma. Inoltre, la capacità di inalare e assorbire contaminanti atmosferici, la sua sensibilità verso di essi, nonché l'adattamento a una vasta gamma di nicchie ecologiche e microhabitat, ne fanno un organismo ideale anche per saggi ecotossicologici (Eom et al., 2017). L'alta omologia genetica con l'uomo e i meccanismi antiossidanti e di difesa conservati con i vertebrati, consentirebbero, allo stesso tempo, di ottenere indicazioni sui possibili effetti sulla salute umana, creando un ponte tra uomo e ambiente (Wilson et al., 2005).

16.2.2 Scala e ambito di studio

Tutti gli studi su animali sono stati svolti in laboratorio, mentre quelli su piante comprendono anche due studi realizzati *in situ*, uno dei quali a condizioni controllate, con esposizione diretta di miscele di VOC in forma gassosa. L'ambito di indagine principale è quello indoor (13 articoli), con studi sull'impatto dei VOC outdoor prevalentemente su specie vegetali (3 articoli su 4).

16.3 Allestimento sperimentale

Il setup sperimentale utilizzato comprende diversi apparati: per le specie vegetali testate in laboratorio sono state impiegate giare di cultura in vetro, riempite di liquido e sigillate, nelle quali sono state collocate piastre Petri o provette chiuse, a seconda dell'organismo testato, contenenti i VOC selezionati in forma liquida, successivamente volatilizzati. Nel caso del saggio *in situ* a condizioni controllate, è stata realizzata una camera chiusa per l'esposizione della pianta, attraverso un condotto a una miscela di contaminanti volatili a concentrazioni note. Per il test *in situ* a condizioni ambientali reali, i modelli sono stati racchiusi in una scatola aperta, coperta superiormente da un tessuto ombreggiante, fissata a diversi tipi di supporti, come segnali stradali e lampioni, in prossimità di strade e incroci con traffico intenso. Per le specie animali, l'apparato sperimentale è consistito principalmente in contenitori come piastre Petri, beute o bottiglie per reagenti, nei quali sono stati inseriti gli organismi, esposti a una membrana o un filtro imbevuti di VOC in forma liquida, successivamente volatilizzati. I vermi clitellati invece sono stati esposti a terreno con diverse diluizioni dei VOC selezionati e infine, in uno studio su *D. melanogaster*, l'insetto è stato sottoposto a inalazione di alcuni VOC a concentrazioni note all'interno di una camera atmosferica.

16.3.1 VOC

Sono stati testati 41 composti singoli, tutti di sintesi, tra cui i più utilizzati sono gli alcoli (16), seguiti da idrocarburi saturi (7), idrocarburi policiclici aromatici (6), chetoni (5), solfuri (2), aldeidi (2), eteri (1), furani (1) e composti terpenici (1). Le molecole più studiate sono la formaldeide, il toluene, il benzene, lo xilene e l'1-otten-3-olo. Quest'ultimo è un alcol responsabile dell'odore caratteristico delle muffe e può essere considerato un indicatore della crescita fungina in ambienti chiusi. È stato in grado di indurre danni locomotori, perossidazione lipidica, ritardo nello sviluppo, morte cellulare per apoptosi, neurotossicità e risposta infiammatoria mediata dall'ossido nitrico in *D. melanogaster* (Macedo et al., 2020). Sono state inoltre testate 21 miscele di VOC, alcune di sintesi, come deodoranti per ambienti, miscele di benzene,

toluene e xilene, e carburanti, ma anche miscele naturali derivate da diverse specie fungine. Tra i campioni testati c'è anche l'aria urbana di diverse città, di cui tuttavia non sono state effettuate analisi chimiche

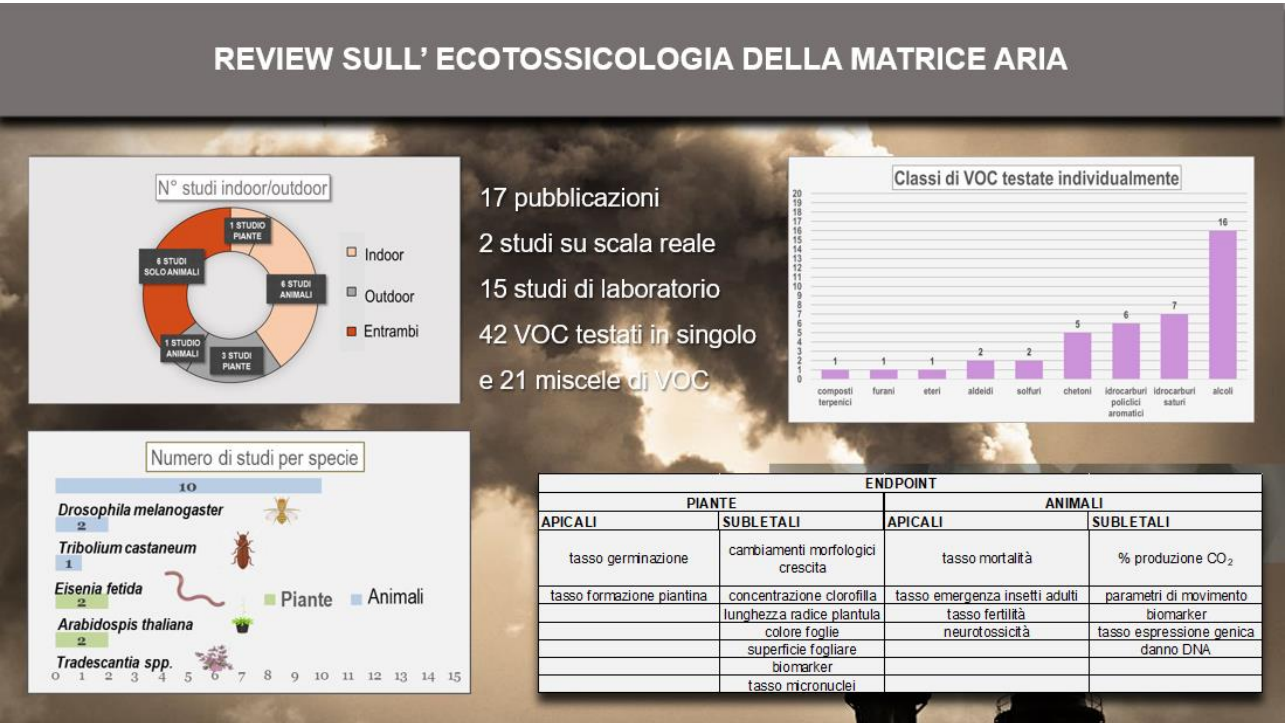
16.3.2 Durata e endpoint

Gli studi trovati in letteratura hanno applicato saggi sia acuti che cronici, con endpoint relativi a diversi livelli di organizzazione biologica. In particolare, i saggi su piante sono tutti di tipo acuto, con una durata che va da poche ore a 12 giorni. Sono stati misurati endpoint cellulari, molecolari e fisiologici, tra cui il tasso di micronuclei, la quantità di H_2O_2 e il tasso di germinazione.

I saggi su modelli animali sono prevalentemente acuti, con durate che vanno da pochi minuti a 14 giorni, ad eccezione di due test cronici condotti su *D. melanogaster*, finalizzati a misurare il tasso di mortalità e lo sviluppo nei diversi stadi del ciclo vitale a seguito di esposizione all'1-otten-3-olo. Oltre agli endpoint legati alla fisiologia e alla scala cellulare e molecolare, come il tasso di espressione genica, l'attività di biomarkers di stress ossidativo e la produzione di CO_2 , sono stati misurati anche endpoint riproduttivi e comportamentali, come il numero di uova deposte e la locomozione.

16.4 Conclusioni e prospettive future

Dalla presente review emerge chiaramente che l'ecotossicologia relativa alla matrice gassosa è un ambito ancora quasi completamente inesplorato. In letteratura sono presenti alcuni approcci e metodologie, applicati principalmente in contesti indoor, che potrebbero essere implementati per sviluppare protocolli standardizzati per la valutazione dell'impatto ambientale. Le specie vegetali testate, tra cui spicca *Arabidopsis thaliana*, sono generalmente più facili da impiegare rispetto ai modelli animali. Tuttavia, manca ancora un approccio integrato per misurare endpoint su diversi livelli di complessità biologica e per valutare l'impatto dei VOC a lungo termine. Tra i modelli animali, *Drosophila melanogaster* si distingue come la specie più promettente, grazie al suo potenziale legame tra ecotossicologia e salute umana.



16.5 Bibliografia

- Eom, H. J., Liu, Y., Kwak, G. S., Heo, M., Song, K. S., Chung, Y. D., ... & Choi, J. (2017). Inhalation toxicity of indoor air pollutants in *Drosophila melanogaster* using integrated transcriptomics and computational behavior analyses. *Scientific Reports*, 7(1), 46473.
- Inamdar, A. A., Masurekar, P., & Bennett, J. W. (2010). Neurotoxicity of fungal volatile organic compounds in *Drosophila melanogaster*. *Toxicological Sciences*, 117(2), 418-426.
- Inamdar, A. A., & Bennett, J. W. (2014). A common fungal volatile organic compound induces a nitric oxide mediated inflammatory response in *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports*, 4(1), 3833.
- Inamdar, A. A., Zaman, T., Morath, S. U., Pu, D. C., & Bennett, J. W. (2014). *Drosophila melanogaster* as a model to characterize fungal volatile organic compounds. *Environmental Toxicology*, 29(7), 829-836.
- Kamal, M. S., Razzak, S. A., & Hossain, M. M. (2016). Catalytic oxidation of volatile organic compounds (VOCs)—A review. *Atmospheric Environment*, 140, 117-134.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Calatayud, V., Garrec, J. P., He, S., ... & Vergne, P. (2006). *Tradescantia* micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities. *Environmental Pollution*, 139(3), 515-522.
- Lee, S., Hung, R., Schink, A., Mauro, J., & Bennett, J. W. (2014). *Arabidopsis thaliana* for testing the phytotoxicity of volatile organic compounds. *Plant growth regulation*, 74, 177-186.
- Li, A. J., Pal, V. K., & Kannan, K. (2021). A review of environmental occurrence, toxicity, biotransformation and biomonitoring of volatile organic compounds. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3, 91-116.
- Macedo, G. E., de Brum Vieira, P., Rodrigues, N. R., Gomes, K. K., Martins, I. K., Franco, J. L., & Posser, T. (2020). Fungal compound 1-octen-3-ol induces mitochondrial morphological alterations and respiration dysfunctions in *Drosophila melanogaster*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 206, 111232.
- Pajaro-Castro, N., Caballero-Gallardo, K., & Olivero-Verbel, J. (2017). Toxicity of naphthalene and benzene on *Tribolium castaneum* Herbst. *International journal of environmental research and public health*, 14(6), 667.
- Pajaro-Castro, N., Caballero-Gallardo, K., & Olivero-Verbel, J. (2019). Toxicity and expression of oxidative stress genes in *Tribolium castaneum* induced by toluene, xylene, and thinner. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 82(1), 28-36.
- Placencia, F., Fadic, X., Yáñez, K., & Cereceda-Balic, F. (2019). *Tradescantia* as a biomonitor for genotoxicity evaluation of diesel and biodiesel exhaust emissions. *Science of the Total Environment*, 651, 2597-2605.
- Singh, M. P., Reddy, M. K., Mathur, N., Saxena, D. K., & Chowdhuri, D. K. (2009). Induction of hsp70, hsp60, hsp83 and hsp26 and oxidative stress markers in benzene, toluene and xylene exposed *Drosophila melanogaster*: role of ROS generation. *Toxicology and applied pharmacology*, 235(2), 226-243.
- Singh, M. P., Ram, K. R., Mishra, M., Shrivastava, M., Saxena, D. K., & Chowdhuri, D. K. (2010). Effects of co-exposure of benzene, toluene and xylene to *Drosophila melanogaster*: alteration in hsp70, hsp60, hsp83, hsp26, ROS generation and oxidative stress markers. *Chemosphere*, 79(5), 577-587.
- Singh, M. P., Mishra, M., Sharma, A., Shukla, A. K., Mudiam, M. K. R., Patel, D. K., ... & Chowdhuri, D. K. (2011). Genotoxicity and apoptosis in *Drosophila melanogaster* exposed to benzene, toluene and xylene: attenuation by quercetin and curcumin. *Toxicology and applied pharmacology*, 253(1), 14-30.
- Splivallo, R., Novero, M., Berteà, C. M., Bossi, S., & Bonfante, P. (2007). Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 175(3), 417-424.
- Wasserkort, R., & Koller, T. (1997, March). Screening toxic effects of volatile organic compounds using *Drosophila melanogaster*. In *Journal of Applied Toxicology: An International Forum Devoted to Research and Methods Emphasizing Direct Clinical, Industrial and Environmental Applications* (Vol. 17, No. 2, pp. 119-125). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Zhiquan, T., Jian, Z., Junli, Y., Chunzi, W., & Danju, Z. (2017). Allelopathic effects of volatile organic compounds from *Eucalyptus grandis* rhizosphere soil on *Eisenia fetida* assessed using avoidance bioassays, enzyme activity, and comet assays. *Chemosphere*, 173, 307-317.

Zhou, X., Zhou, X., Wang, C., & Zhou, H. (2023). Environmental and human health impacts of volatile organic compounds: A perspective review. *Chemosphere*, 313, 137489.

