

10ª Edizione delle Giornate di Studio

“Ricerca e Applicazione di Metodologie Ecotossicologiche”

L'Ecotossicologia oggi, dalle esperienze di ieri alle applicazioni di domani

28-30 SETTEMBRE 2022

28 settembre (h. 14.00-19.00), 29 settembre (h. 9.00-19.00), 30 settembre (h. 9.00 -12.30)

Hotel UNA ESPERIENZE - Lido di Camaiore (Lu)

Abstracts

SESSIONE I - "AMARCORD": GLI INSEGNAMENTI DEL PASSATO...PER IL PRESENTE ED IL FUTURO

L'APPLICAZIONE DELLA RICERCA PASSA PER LA NORMAZIONE

R.Baudo

° ECOTOX LDS - r.baudo@ecotox.it

Abstract -. La letteratura scientifica ogni anno riporta numerosissime proposte per nuovi saggi ecotossicologici, che prevedono modelli biologici diversi, endpoint alternativi, nuovi metodi di misura o vengono applicati a nuovi contaminanti. Pochissimi, però, arrivano ad una larga applicazione e, solitamente, solo dopo che quel saggio è richiesto da un disposto legislativo, nazionale o sovranazionale. Quindi, se un ricercatore vuole vedere riconosciuto il proprio metodo, dovrebbe darsi alla politica e far promulgare una apposita legge.

Come alternativa, potrebbe proporre il proprio protocollo alla ISO, organizzazione internazionale che, dopo accurata verifica della validità ed applicabilità del metodo, lo pubblica come Standard ISO. UNI, che rappresenta l'Italia presso la ISO, potrebbe decidere di pubblicarlo anche come Norma Italiana UNI ISO. L'applicazione di Standard ISO e Norme UNI è facoltativa.

Il CEN è un'altra associazione, in ambito Europeo, che si occupa di standardizzazione e pubblica, spesso in collaborazione con ISO, Standard EN (ISO). Una importante differenza è che gli Standard EN sono vincolanti per gli Stati Membri dell'Unione Europea. UNI, che rappresenta l'Italia anche presso il CEN, deve quindi automaticamente recepirli come Norma UNI EN (ISO). Il riflesso immediato è che, se un disposto legislativo riguarda un saggio, anche senza uno specifico riferimento alla Norma UNI EN ISO, automaticamente tale Norma diventa il metodo "ufficiale" di riferimento per quel saggio.

Una veloce carrellata dimostrerà come, in campo ecotossicologico, l'attività di standardizzazione è continuamente in evoluzione, con sempre nuovi Standard allo studio ed un costante aggiornamento degli Standard esistenti; infatti, su richiesta o, di regola, ogni cinque anni, ogni Standard viene rivisto per essere confermato, modificato o revocato.

UNI, ISO e CEN si occupano, oltre che di saggi, di molti altri argomenti di interesse per l'Ecotossicologo: raccolta, preparazione e conservazione di campioni ambientali e biologici; verifica della qualità dei dati e loro elaborazione statistica; gestione ed interpretazione di interconfronti; accreditamento; e molto altro ancora.

C'è persino una Norma che definisce le regole ... per scrivere le Norme!

LA "METAMORFOSI" DI *A. AMPHITRITE*. DA SPECIE "TARGET" NEGLI STUDI SULLE PROPRIETÀ ANTIFOULING AD ORGANISMO MODELLO IN ECOTOSSICOLOGIA

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

^a Consiglio Nazionale delle Ricerche – Istituto per lo Studio degli impatti antropici e sostenibilità in ambiente marino (CNR-IAS), via De Marini 16, 16149 Genova

veronica.piazza@ias.cnr.it

Abstract

L'inclusione del test di tossicità acuta con le larve del crostaceo marino *Amphibalanus amphitrite* tra i saggi biologici utilizzabili per la caratterizzazione ecotossicologica di sedimenti nell'ambito del D.M.173/2016 (gestione dei materiali provenienti dal dragaggio delle aree portuali e marino costiere) rappresenta un esempio del percorso di un test dalle fasi di "sperimentazione scientifica" alla sua introduzione in una norma legislativa.

Le prime pubblicazioni che riportano la messa a punto del protocollo per l'allevamento in laboratorio di *A. amphitrite* risalgono all'inizio degli anni '70. A partire dagli anni '90 sono reperibili numerosi lavori nei quali vengono impiegati gli stadi larvali di questo organismo modello, in particolare in studi volti alla valutazione di efficacia e tossicità di sostanze impiegate nel settore "antifouling" in quanto *A. amphitrite* è una delle specie più rappresentative ed "invasive" del biofouling. L'elevata sensibilità mostrata dai nauplii di *A. amphitrite* nei confronti di un ampio range di sostanze tossiche e la relativa semplicità di allevamento in laboratorio hanno portato ad un sempre più diffuso impiego del test di tossicità acuta. La proposta di utilizzo di questo biosaggio nell'ambito del Progetto TAXA (2004), finanziato dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e finalizzato alla sperimentazione di test tossicologici su organismi marini al fine di garantire l'applicabilità del D.D. 23.12.2002, ha rappresentato l'avvio del percorso per l'ottenimento degli standard di normazione di questo metodo ecotossicologico a livello nazionale da parte di UNICHIM, che si è concluso nel 2012 con la pubblicazione della Norma Unichim 2245 "Determinazione della mobilità di nauplii di *A. amphitrite* dopo 24 e 48 ore di esposizione".

La standardizzazione della metodica del test, la sua affidabilità ed elevata sensibilità anche nei confronti di contaminanti emergenti (microplastiche) rappresentano fattori determinanti che hanno portato al suo recente inserimento nel D.M. 173/2016.

EFFETTI DI Y E SM SU *RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA*, *DAPHNIA MAGNA* E *HYDRA VULGARIS*.

*Donatella Del Bianco*¹, *Edith Guadalupe Padilla Suarez*¹, *Antonietta Siciliano*¹, *Lorenzo Saviano*¹, *Marisa Spampinato*¹, *Mariacarmen Del Mondo*¹, *Giovanni Libralato*¹, *Marco Guida*¹

¹ Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Cinthia – 80126 – Napoli, Italia

Gli elementi delle terre rare sono un gruppo di elementi chimici dalle proprietà fisico-chimiche uniche, per questomotivo sono sempre più frequentemente estratte e utilizzate. Le terre rare sono essenziali per la realizzazione di prodotti tecnologici ed industriali ma anche in campo agricolo come promotori della crescita. Data l'ampia gamma di applicazioni, è atteso un incremento delle loro concentrazioni in ambiente. È necessario studiare l'impatto che questi elementi possono avere sugli ecosistemi terrestri e acquatici con particolare riguardo al trasferimento lungo la catena trofica.

Lo scopo dello studio è stato quello di analizzare gli effetti di Ittrio e Samario nel produttore primario *Raphidocelis subcapitata*, nel consumatore primario *Daphnia magna* e in *Hydra vulgaris*. I risultati hanno evidenziato i valori di EC20 ed EC50 che sono riportati in tabella.

Bioindicatore	EC20 (mg/L)		EC50 (mg/L)	
	Y	Sm	Y	Sm
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	1.19 (± 0.03)	0.17 (±0.013)	1.46 (±0.032)	0.33 (±0.068)
<i>Daphnia magna</i>	1.93 (±0.32)	4.83 (±0.55)	2.79 (±0.3)	6.33 (±0.44)
<i>Hydra vulgaris</i>	0.28 (± 0.001)	0.56 (±0.062)	0.50 (± 0.001)	1.35 (±0.2)

Questo studio è un punto di partenza da cui far proseguire ulteriori indagini perché questi microinquinanti non vengono monitorati nei programmi ambientali e di salute pubblica e i loro meccanismi di tossicità ambientale e umana sono poco conosciuti.

ESPOSIZIONE MULTI ENDPOINT A LUNGO TERMINE DELLA DIATOMEA PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM (BOHLIN) A CERIO E GADOLINIO

Marisa Spampinato, Antonietta Siciliano, Edith Guadalupe Padilla Suarez, Lorenzo Saviano, Donatella Del Bianco, Mariacarmen Del Mondo, Giovanna Salbitani, Marco Guida, Giovanni Libralato.

Dipartimento di Biologia, Università di Napoli Federico II, Via Vicinale Cupa Cintia – 80126 – Napoli, Italia

Dall'agricoltura alla cura della salute, dalla ceramica all'industria automobilistica, il futuro sostenibile è fortemente legato agli elementi delle terre rare (REE) per le loro preziose proprietà elettrochimiche, magnetiche e ottiche. Ad oggi le REE rientrano in un'economia esclusivamente lineare. È atteso a livello ambientale un aumento dei livelli di fondo delle REE a causa del loro utilizzo, a parte gli hot spot legati all'attività estrattiva. Questo studio si è concentrato sulla valutazione degli effetti di cerio e gadolinio, tra le REE più abbondanti in ambiente marino, che possono raggiungere centinaia di ng/L, sulla diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum*. Le alghe sono state esposte a concentrazioni geometriche di Ce ($Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$) e Gd (Gd_2O_3) sino a 28 giorni in cui è stata valutata l'inibizione della crescita, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la conseguente risposta antiossidante, seguendo l'attività della superossido dismutasi (SOD) e della perossidazione lipidica (LPO). Le osservazioni sono state condotte dopo 3, 7, 14, 21, e 28. Sono stati valutati i valori di concentrazione mediana di inibizione della crescita al 50% (EC50) e al 20% (EC20). L'esposizione di 3 giorni ha mostrato un'inibizione della crescita comparabile tra le due REE ed è stato utilizzato per definire i valori di EC20 ed EC50, che sono rispettivamente 2,5 e 3,4 mg/L per il Ce e 4,7 e 6,5 mg/L per il Gd. Questi valori sono stati utilizzati per la successiva esposizione di 28 giorni delle alghe a Ce e Gd in condizioni semistatiche, in cui l'inibizione della crescita è stata misurata ogni 7 giorni. In entrambi i casi, le concentrazioni di EC20 hanno prodotto una lieve inibizione della crescita algale, rispettivamente dell'1,2% e del 5,1%. Risultati opposti sono stati osservati per le concentrazioni di EC50, dove si è avuta una stimolazione della crescita, del 15% per il cerio e del 4,3% per il gadolinio. La risposta antiossidante all'EC20 ha mostrato trend differenti dell'attività di SOD e LPO: SOD ha sempre mostrato un'attività più elevata per il Gd, mentre l'attività di LPO era sempre più elevata per il Ce. Anche per la concentrazione di esposizione EC50, l'attività di SOD è risultata più elevata per il Gd. Al contrario, l'attività di LPO è risultata più alta per il Gd al giorno 7 e 14, ma più alta per il Ce al giorno 21 e 28. Il lento decremento degli effetti tossici durante i 28 giorni potrebbe essere imputabile ad una acclimatazione alle condizioni espositive i cui meccanismi sono da investigare approfonditamente.

DAI FILTRI SOLARI ALLA FORMAZIONE DI SOTTOPRODOTTI DI DEGRADAZIONE DELL'OCTOCRILENE DURANTE I PROCESSI DI CLORAZIONE: DELUCIDAZIONI SUL PATHWAY DI DEGRADAZIONE E VALUTAZIONE DELL'ECOTOSSICITÀ

Lorenzo Saviano¹, Marco Guida¹, Armando Zarrelli², Giovanni Di Fabio², Giovanni Luongo², Antonietta Siciliano¹, Emilia Galdiero¹, Federica Carraturo¹, Giovanni Libralato¹

¹Dipartimento di Biologia, Università di Napoli Federico II, Via Cinthia — 80126 — Napoli, Italia

²Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Napoli Federico II, Via Cinthia — 80126 — Napoli, Italia

I contaminanti emergenti sono da tempo oggetto di attenzione da parte della comunità scientifica in quanto tali sostanze ancora oggi non sono adeguatamente conosciute nel loro complesso e, soprattutto, mancano informazioni sufficienti sulle loro proprietà e quantità prodotte. Le valutazioni ecotossicologiche su queste sostanze sono utili per comprendere gli effetti complessivi che potrebbero avere sulla salute umana e sull'ambiente. Questo studio prende in esame i sottoprodotti di degradazione (DPs) di un filtro chimico ampiamente utilizzato per la formulazione di prodotti destinati alla protezione solare, l'octocrilene (OCT), ottenuti simulando una disinfezione con ipoclorito di sodio. L'octocrilene è un filtro per la radiazione nell'ultravioletto (UV) di tipo organico che assorbe principalmente la radiazione UVB e le lunghezze d'onda corte di tipo UVA. Negli ultimi anni questo filtro sembrerebbe essere stato accreditato come principale responsabile dell'aumento del rischio di potenziali effetti avversi sul sistema endocrino, oltre ad avere un potenziale allergico e/o fotoallergico. Continua tuttavia ad essere ampiamente utilizzato e la sua presenza è stata riscontrata in vari ambienti, non ultimi quelli delle piscine, a causa dell'applicazione di prodotti cosmetici al punto da essere ormai considerato un microinquinante emergente. La presente indagine evidenzia i possibili destini chimici dell'octocrilene nelle condizioni di clorazione tipiche delle acque reflue o delle piscine. Sono stati identificati un totale di undici sottoprodotti di disinfezione, sei dei quali completamente nuovi e separati mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography) e identificazione mediante NMR 1D e 2D (Nuclear Magnetic Resonance). La valutazione ecotossicologica dell'octocrilene e dei relativi sottoprodotti è avvenuta utilizzando *Phaeodactylum tricornutum*, *Brachionus plicatilis* e *Aliivibrio fischeri* come bioindicatori. I risultati di ecotossicità hanno rivelato che circa la metà dei DPs indagati possiedono effetti da lieve ad altamente tossici. I saggi di tossicità con *Aliivibrio fischeri* e *Phaeodactylum tricornutum*, infatti, hanno evidenziato che rispettivamente nel 45% e 90% degli undici DPs testati la tossicità è aumentata significativamente rispetto al composto parentale. Non è stato osservato, invece, alcun effetto significativo sulla mortalità dei rotiferi esposti all'octocrilene e relativi sottoprodotti di degradazione. Pertanto, la valutazione della tossicità acuta ha dimostrato che la presenza di OCT potrebbe causare effetti negativi ad un ecosistema aumentando così il potenziale rischio nell'ambiente acquatico marino.

SESSIONE II – “IL PRESENTE”: STATO DELL’ARTE E... COSA MANCA?

VALUTAZIONE DEI FATTORI DI INTERFERENZA NELL’APPLICAZIONE DI SAGGI BIOLOGICI IN SEDIMENTI DA MOVIMENTARE IN AMBITO PORTUALE

*C. Mugnai^a, L. Morroni^a, D. Sartori^a, V. Vitiello^a, S. Ferrari^a, G. d’errico^b, D. Fattorini^b, F. Regoli^b, T. Leoni^c,
D. Pellegrini^a*

^a ISPRA

^b DISVA-UNIVPM

^c ARPA MARCHE

Abstract -

A seguito dell’applicazione dell’allegato tecnico al DM 173/2016 ai sedimenti da dragare nell’area portuale di Ancona, sono emerse situazioni di elevata ecotossicità, soprattutto riscontrate mediante i saggi di sviluppo embrionale (indicati come “3 tipologia”). Tale tossicità non ha trovato riscontro nei risultati delle indagini chimiche standard e delle altre tipologie di saggi. A tale proposito si è reso necessario valutare la presenza di fattori di interferenza nell’applicazione del saggio per identificare possibili elementi di criticità “locale” e per individuare specifici percorsi e metodologie di indagine più approfondite da esportare successivamente nel più vasto ambito nazionale.

Con riferimento alla caratterizzazione dei sedimenti da movimentare per la costruzione della banchina 27 del Porto di Ancona, si è avviato un percorso di approfondimento sulla caratterizzazione chimico-ecotossicologica dei sedimenti che ha coinvolto ISPRA, ARPA Marche e il Dipartimento di Scienze della Vita e dell’Ambiente dell’Università Politecnica delle Marche. In particolare, è stato utilizzato il saggio di embriotossicità con l’ostrica *Crassostrea gigas*, condotto sulla matrice “elutriato tal quale” (100%), preparato entro 14 giorni dalla data di campionamento, in accordo con il protocollo standard US EPA; subcampioni di surnatante sono stati congelati e utilizzati nelle varie prove, in modo da impiegare sempre il medesimo campione nel corso dei vari esperimenti, al fine di garantire la confrontabilità fra i dati sperimentali. Inoltre, sono state eseguite ulteriori analisi chimiche e chimico-fisiche sull’elutriato, evidenziando la presenza in diversi campioni di concentrazioni di ione ammonio NH₄⁺ ampiamente superiori a 4 mg l⁻¹. Tale valore è stato appurato interferire infatti in modo evidente con il normale sviluppo embrionale, come è stato possibile rilevare anche dalla correlazione della tossicità con le differenti concentrazioni di ammonio presenti anche in sequenze di soluzioni liquide preparate in laboratorio, oltre che nei campioni di elutriato. Le medesime prove sono state effettuate anche con altri saggi. Sui campioni di elutriato si è quindi proceduto con l’eliminazione dell’ammonio sfruttando la diminuzione della solubilità dell’ammoniaca in acqua al diminuire della pressione e all’aumentare della temperatura. Successivamente i campioni così trattati sono stati saggiati con la batteria scelta, ottenendo una nuova classificazione qualitativa (Allegato tecnico DM173/2016), maggiormente discriminante rispetto a quella ottenuta applicando il saggio senza il pretrattamento per l’eliminazione dell’ammonio.

LOOKING FOR MICROPLASTICS TRHESHOLD IN THE MARINE ENVIRONMENT: A LESSON OBTAINED BY AN INTEGRATED ASSESSMENT IN WATER, SEDIMENTS AND BIOTA.

F. Garaventa^{a}, E. Costa^a, R. Minetti^b, F. Castell^b, A. Montarsolo^a, V. Piazza^a, G. Ungherese^b, L. Pittura^a, L. Ventura^a, A. Nard^c, M. Benedetti^c, M. Faimali^c, F. Regolf^c, S. Gorb^c.*

^aNational Research Council, Institute for the Study of Anthropic Impact and Sustainability in the Marine Environment (CNR-IAS), Via de Marini 6, 16149, Genova, Italy

^bGreenpeace, Rome, Italy

^cPolytechnic University of Marche (UNIVPM) - Department of Life and Environmental Science, Ancona, Italy

francesca.garaventa@ias.cnr.it

Abstract

The ubiquitous presence of microplastics (MPs) in the marine ecosystem requires a holistic approach for understanding their distribution and fate in order to extrapolate the environmental thresholds on which to build proper legislative measures. This can be achieved combining data from both abiotic and biotic matrices which allow a better interpretation of the risk associated to MPs for marine organisms, ecosystems and human health.

This study assessed levels and typologies of MPs occurring in the North Tyrrhenian Sea (Mediterranean Sea), an area particularly affected by MPs pollution, integrating analysis of surface water, water column, sediments and biota. Samples were collected during a sampling campaign promoted by Greenpeace Italia, in summer 2020 from sites characterized by different level of anthropogenic pressure (ports, river mouths, MPAs). MSFD recommended sampling devices were used to collect sea surface water samples (i.e. Manta net, 330µm mesh size) and sediments were sampled at depth ranging between 10 and 20 meters using Van Veen grab. In addition, a sequential filtering device (300-100-20 µm mesh size) was used to filter water at different depths (from 5 to 10 meters). Wild-caught and farmed organisms were collected in collaboration with local fishermen, selecting species from different habitats and trophic habits. Microplastics characterization has been supported by (micro) ATR-FTIR analyses. Results highlighted significant differences in MPs concentration along the water column, varying from 0,05 to 4,15 items/m³ in surface water, from 4 to 253 items/m³ in the 5-10 m layer, and from 7,75 to 53,59 items/Kg in sediment. The majority of particles were in the range 1-3 mm in all samples with an increase proportional to depth; microfibers were the most abundant shape in water column and sediment (98%-55%), compared to surface water (10%).

As regards ingestion, an average of 2 MPs/specimen was reported for 40% of analyzed organisms. Most MPs extracted from tissues were in the size range of 500-100 µm and microfibers were confirmed also in the biotic compartment as the most frequently typology accounting for 88% of total MPs.

Outcomes of the study seem to confirm the vulnerability of the Mediterranean Sea to plastic pollution and suggest the need to perform surveys including different marine compartments to achieve a reliable monitoring strategy for MPs in marine environment.

Acknowledgement: This work was supported by the JPI Ocean Project RESPONSE - Towards a Risk-Based Assessment of Microplastic Pollution in Marine Ecosystems and the PRIN Project EMME - Exploring the fate of Mediterranean microplastics: from distribution pathways to biological effects

UN NUOVO PERCORSO METODOLOGICO PER L'ATTRIBUZIONE DELLA CARATTERISTICA DI PERICOLO HP14 "ECOTOSSICO" AI RIFIUTI UTILIZZANDO UN APPROCCIO *WEIGHT OF EVIDENCE*.

A. Paina^a, F. Onorati^a, A. Tornambè^a, C. Maggi^a, G. Chiaretti^a, O. Faraponova^a, V. Bellaria^a, A. Pati^a, M.T. Berducci^a, G. Sesta^a

ISPRA – Istituto Superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale –

andrea.paina@iosprambiente.it; fulvio.onorati@isprambiente.it; andrea.tornambe@isprambiente.it ;
chiara.maggi@isprambiente.it; gianluca.chiaretti@isprambiente.it ; olga.faraponova@isprambiente.it ;
vanessa.bellaria@isprambiente.it ; alessandra.pati@isprambiente.it; mariateresa.berducci@isprambiente.it;
giulio.sesta@isprambiente.it;

Abstract. Con l'entrata in vigore del Regolamento (UE) 2017/997 del Consiglio sono stati definiti i criteri per la valutazione della caratteristica di pericolo HP14 "ecotossico" ai rifiuti. Il Regolamento ha definito il metodo ordinario per la determinazione di tale caratteristica di pericolo, ovvero il metodo cosiddetto delle sommatorie o metodo convenzionale. L'introduzione di tale metodo intende allineare la classificazione dei rifiuti con i criteri di classificazione delle sostanze del Regolamento CLP. Tuttavia, pur considerando che il principio di base che ha introdotto il metodo convenzionale abbia una sua ragionevolezza, la sua applicazione presenta aspetti critici soprattutto nel caso in cui, come espressamente previsto dal Regolamento stesso, possano essere eseguite prove ecotossicologiche. Infatti, non sempre il contenuto totale di contaminanti di un rifiuto è in grado di fornire tutte le informazioni necessarie a comprendere l'effettiva ecotossicità e in molti casi può portare a sovrastimare tale effetto. D'altra parte, l'applicazione dei saggi ecotossicologici a matrici molto eterogenee e variabili come i rifiuti non sempre rende semplice l'interpretazione del dato ecotossicologico. In questo lavoro viene proposto e applicato sperimentalmente su campioni di 3 categorie di rifiuti (car-fluff, ceneri pesanti da incenerimento di rifiuti urbani e fanghi da trattamento di acque reflue industriali) un nuovo percorso metodologico che, partendo dalla preparazione del campione e dalle analisi ecotossicologiche e chimiche sull'eluato, attraverso un approccio integrato chimico ed ecotossicologico, utilizza indici (precedentemente sviluppati per la gestione del dragaggio dei sedimenti) da cui è possibile derivare la proprietà ecotossicologiche del rifiuto stesso.

STUDI COLLABORATIVI PER LA VALIDAZIONE DI UNA PROCEDURA OPERATIVA DEL SAGGIO IN FASE SOLIDA MEDIANTE *ALIIVIBRIO FISCHERI*

F. Onorati, G. Chiaretti, C. Martone, S. Barbizzi

ISPRA – Istituto Superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale – fulvio.onorati@isprambiente.it;
gianluca.chiaretti@isprambiente.it; cristina.martone@isprambiente.it; sabrina.barbizzi@isprambiente.it

Il test in fase solida con *A. fischeri* è certamente uno dei più versatili, veloci ed economici test ecotossicologici applicabile a matrici solide quali sedimenti di ambienti marini e dulciacquicoli, suoli e terreni ed ha il pregio di consentire un contatto diretto tra gli individui e la parte solida della matrice da saggiare. Anche ai fini del processo di accreditamento ai sensi della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 e in piena applicazione delle normative nazionali quali il DM 173/2016 nel caso degli ambienti marini, nel periodo 2019-2022 sono stati organizzati e realizzati, con la partecipazione di istituti di ricerca, università, ARPA regionali e laboratori privati, due studi collaborativi finalizzati alla validazione di una procedura operativa per l'esecuzione del saggio in fase solida mediante *Aliivibrio fischeri*.

I due studi hanno seguito essenzialmente la medesima procedura, a partire da un materiale di riferimento fornito da ISPRA, distinguendosi unicamente per la soluzione di controllo e diluizione: acqua di mare artificiale con riferimento a campioni di sedimenti marini e salmastri, soluzione di NaCl per i sedimenti di ambienti dulciacquicoli.

L'elaborazione statistica dei risultati di EC50 (%) forniti dai laboratori partecipanti è stata effettuata utilizzando modelli appropriati ai saggi ecotossicologici ed in conformità alla Norma UNI ISO 5725-2:2004, al fine di calcolare i parametri prestazionali dei metodi in termini di ripetibilità e riproducibilità.

Verrà quindi illustrato un quadro riepilogativo dei risultati dei due studi collaborativi, mettendo a confronto le due procedure, con i relativi coefficienti di ripetibilità e riproducibilità.

In particolare per quanto riguarda gli ambienti marino-salmastri, l'esito dello studio collaborativo è già stato oggetto della pubblicazione del Quaderno ISPRA 4/2021

(<https://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/quaderni/laboratorio/procedura-operativa-per-il-saggio-in-fase-solida-mediante-aliivibrio-fischeri>)

INTERCONFRONTO SUL SAGGIO ALGALE MARINO: FASE DI PREVALIDAZIONE DELLA PROCEDURA

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

^a ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale -
andrea.tornambe@isprambiente.it; claudia.sebbio@isprambiente.it;
micol.bellucci@isprambiente.it; fulvio.onorati@isprambiente.it;
cristina.martone@isprambiente.it; sabrina.barbizzi@isprambiente.it

L'esigenza di uno studio d'interconfronto sul saggio algale marino secondo la ISO 10253 è nata nell'ambito dell'applicazione del DM 173/2016 che prevede, tra i saggi ecotossicologici ammessi, quello che utilizza microalghe su fase liquida. In particolare, vengono indicate in maniera indistinta, tre specie alternative, senza tuttavia specificare i metodi da utilizzare: *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum* e *Dunaliella tertiolecta*. Infatti, mentre per *P. tricornutum* e *S. costatum* esiste un metodo standardizzato (ISO 10253), per *D. tertiolecta* non esiste un metodo equivalente e vengono utilizzati protocolli adattati da altri metodi. Anche per l'applicazione del metodo ISO 10253 tuttavia, essendo possibile eseguire il saggio in diverse modalità, si rende necessaria una verifica della riproducibilità delle risposte prodotte dai vari laboratori. Le principali varianti, giudicate critiche dagli esperti del metodo, sono: l'acqua di mare (sintetica o naturale), i contenitori test (beute in vetro, piastre multipozzetto, cuvette spettrofotometriche), il sistema di misura della densità algale (microscopica, automatica, spettrofotometrica) ed infine le modalità di elaborazione dati per il calcolo della EC50.

In questo primo studio collaborativo sull'applicazione del metodo con *P. tricornutum* organizzato da ISPRA, con la partecipazione di istituti di ricerca, università, ARPA regionali e laboratori privati, verrà stimato l'eventuale peso di queste varianti nella variabilità delle risposte, con valutazioni statistiche sulla loro ripetibilità e riproducibilità.

ALIVIBRIO FISCHERI SU FASE SOLIDA: MESSA A PUNTO DI UN METODO DI CONTROLLO INTERNO CON CAMPIONI CONTAMINATI ARTIFICIALMENTE

F. Perin^a, M. Pereira Dantas^b

^a Consula Sas di Perin Fabrizio &C., fabrizio.perin@consula.it

^b Consula Sas di Perin Fabrizio &C., marta.dantas@consula.it

Abstract -. I metodi analitici per la analisi ecotossicologica di sedimenti marini mediante Aliivibrio fischeri su fase solida non suggeriscono modalità di controllo analitico che tenga conto dell'intero processo, ovvero sia della vitalità dei batteri che delle fasi preparative del campione e dell'analisi stessa.

E' stato quindi progettato un campione di sedimento artificiale, contaminato artificialmente, stabile nel tempo e facilmente realizzabile anche in quantitativi importanti, denominato Microsand. Il campione è stato testato più volte, con strumenti differenti, differenti operatori e diversi lotti batterici, ottenendo valori confrontabili. I dati ottenuti sono utilizzati per costruire una carta di controllo per uso interno. Il sedimento artificiale viene quindi utilizzato come standard interno, e viene analizzato assieme a gruppi di campioni, a validare la stabilità nel tempo dell'intero processo analitico.

.....

Premio Matranga

UTILIZZO DI EMBRIONI DI ZEBRAFISH PER LA CARATTERIZZAZIONE ECOTOSSICOLOGICA DI RIFIUTI BIOGENICI DESTINATI AL RIUTILIZZO AGRICOLO

S.G. Signorini^a, S. Tagliabue^a, R. Pedrazzani^b, L. Del Giacco^c, A. Diana^a, A. Abbà^a, M. Domini^d, M. Menghini^e, G. Bertanza^f, A. Binelli^g, C. Della Torre^h

^a Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano – silvia.signorini@unimi.it

^a Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano - stefano.tagliabue6@studenti.unimi.it

^b Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Industriale, Università degli Studi di Brescia - roberta.pedrazzani@unibs.it

^a Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano - luca.delgiacco@unimi.it

^a Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano - alberto.diana@unimi.it

^c Dipartimento di Ingegneria Civile, Architettura, Territorio e Ambiente e di Matematica, Università degli Studi di Brescia - alessandro.abba@unibs.it

^c Dipartimento di Ingegneria Civile, Architettura, Territorio e Ambiente e di Matematica, Università degli Studi di Brescia - marta.domini@unibs.it

^c Dipartimento di Ingegneria Civile, Architettura, Territorio e Ambiente e di Matematica, Università degli Studi di Brescia - michele.menghini@unibs.it

^a Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano - giorgio.bertanza@unibs.it

^a Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano - andrea.binelli@unimi.it

^a Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano - camilla.dellatorre@unimi.it

Abstract - L'utilizzo di rifiuti biogenici come fertilizzanti e ammendanti potrebbe rappresentare una risorsa preziosa per migliorare le proprietà e la resilienza del suolo. Nonostante questo, la loro applicazione è limitata dalla presenza in queste matrici di sostanze chimiche di diversa tipologia, potenzialmente pericolose per gli ecosistemi naturali e per la salute umana. Per questo motivo, è necessario sviluppare strumenti di indagine ecotossicologica (la cui applicazione, nell'ambito specifico, non è al momento prevista dalla normativa) adatti a determinare la potenziale tossicità di queste matrici ambientali complesse, in modo tale da poterne garantire un utilizzo sicuro in ambiente.

In questo scenario, è stata valutata l'ecotossicità di differenti matrici, quali liquame di origine zootecnica stabilizzato o digerito anaerobicamente, compost e fango di depurazione, tramite l'impiego di embrioni di zebrafish (*Danio rerio*), come specie modello rappresentativa del sistema acquatico. In particolare, è stata saggiata l'embriotossicità (acuta e sub-letale) degli elutriati applicando l'OECD FET test 236 (2013) e della matrice solida, attraverso un test di contatto. Sono stati valutati inoltre gli effetti sub-letali utilizzando un set di *biomarker* relativi a: stress ossidativo (contenuto di specie reattive dell'ossigeno, attività della catalasi), detossificazione (attività della glutazione-S-transferasi), neurotossicità (attività dell'acetilcolinesterasi), metabolismo energetico (consumo basale di ossigeno e respirazione massimale mediante Seahorse XFe24 Analyzer Agilent) e movimento (mediante strumento DanioVision™ e EthoVision XT 15 Noldus).

L'esposizione alla fase solida ha mostrato l'insorgenza di embriotossicità per oltre il 50% degli organismi nei campioni esposti al compost e al fango di depurazione alla concentrazione di 0,04 g/L. Il saggio di embriotossicità sugli elutriati ha permesso di stabilire un valore di EC₅₀ variabile compreso nel range di 5,16 – 9,6 g/L per le differenti matrici. Gli effetti rilevati con maggiore frequenza sono stati embrioni coagulati, edemi, malformazioni e scoliosi. L'esposizione agli elutriati ha inoltre incrementato la respirazione basale e ha alterato il comportamento natatorio degli embrioni. Infine, gli elutriati ottenuti dal digestato e dal fango di depurazione hanno inibito l'attività dell'acetilcolinesterasi.

I risultati mostrano che il test di embriotossicità con zebrafish, unitamente a *endpoint* sub-letali, è risultato essere uno strumento adatto per lo *screening* di effetti combinati di matrici complesse, correlando le prime interazioni a livello biochimico con le modificazioni di funzioni fisiologiche chiave negli embrioni di zebrafish.

I risultati ottenuti verranno valutati in modo integrato con quelli relativi ad altri saggi biologici e alle analisi chimiche, tutt'ora in fase di svolgimento, per pervenire a un giudizio complessivo e rappresentativo del reale effetto di queste matrici, in assenza di valori normativi di riferimento.

SUB-LETHAL EFFECTS INDUCED BY DIFFERENT NANOPLASTIC POLYMERS IN *DAPHNIA MAGNA*

A. Masseroni^a, *M. Fossati*^b, *M. Collini*^c, *C. Della Torre*^b, *S. Villa*^a

^a Department of Earth and Environmental Sciences DISAT, University of Milano-Bicocca, Piazza della Scienza 1, 20126 Milano, Italy

^b Department of Environmental Science and Policy, University of Milan, via Celoria 26, I-20133 Milan, Italy

^c Department of Physics "Giuseppe Occhialini", University of Milano-Bicocca, Milan, Italy, Piazza della Scienza 3, 20126

Abstract. Nanoplastics (NPs) are particles within the size range from 1 to 1000 nm which mainly derive from the environmental fragmentation of larger plastic items. In recent years, the scientific interest in NPs has significantly increased because their unique properties make them potentially hazardous for organisms, even more than microplastics. To date, most of ecotoxicological studies carried out on aquatic species have tested the effects of NPs concentrations (mg/L) higher than the measured environmental exposure (ug/L), resulting therefore in toxicity data that are not representative of a real environmental scenario. Moreover, almost all studies have tested only polystyrene NPs (PS-NPs), while effect assessments induced by other NPs polymers, which are even more diffused on the market, are almost absent.

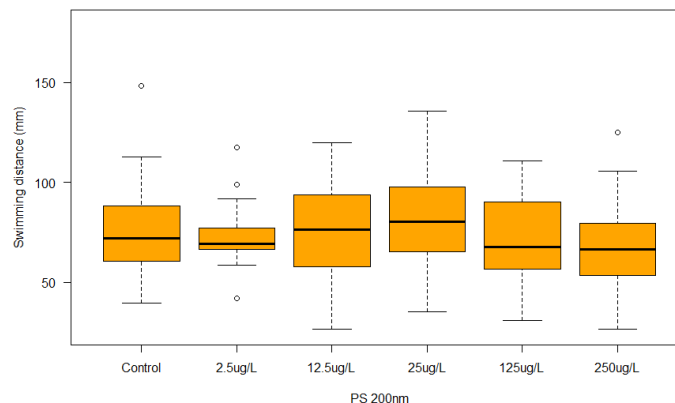
In this perspective, this study aimed to evaluate the sub-lethal effects induced by three different NPs polymers (PS-NPs, polyethylene PE-NPs, and polyvinyl chloride PVC-NPs) of a nominal size of 200 nm, on the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. For each polymer, five environmental relevant concentrations were tested (2,5-12,5-25-125-250 ug/L), with 40 individuals exposed for 48hrs to each concentration. Before conducting ecotoxicological tests, all concentration and particle dimensions were tested, using Nanoparticle tracking analysis (NTA). The measured concentrations and the particle dimensions were in the acceptable range of +/- 15% of the nominal ones.

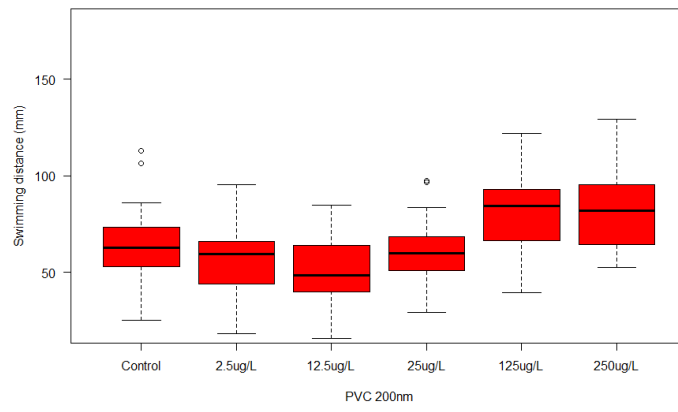
After the exposure, the NPs effects at the sub-individual and individual levels of the biological organization were assessed, considering respectively biochemical and behavioral endpoints. Since NPs can induce oxidative stress, at the biochemical level we investigated the activity of an antioxidant enzyme (catalase - CAT) and the alteration in the amount of reactive oxygen species (ROS), while at the individual level we evaluated the swimming response (distance moved) of *D. magna* using a video-tracking analysis.

The 48-hrs exposure to PS-NPs and PE-NPs did not induce either oxidative stress conditions or alteration in the swimming behavior. Statistically significant changes (p-value < 0.05) in swimming distance were observed for PVC-NPs, where the higher concentrations (125 and 250 ug/L) induced an increased swimming stimulation. At the concentration of 250ug/L, the negative effect of PVC-NPs is confirmed also at the biochemical level, where the ROS production was almost double that of the control ones. A possible explanation of these differences in inducing biochemical and behavioral alterations can be ascribed to the different physical characteristics, of the investigated polymers mainly related to the different density values.

Our results highlighted that the exposure to environmentally relevant concentrations of PVC-NPs could pose sublethal effects to *D. magna*. It is therefore recommended to conduct further studies on different NPs polymers, to better establish their different toxicity and to give helpful information to international regulatory bodies to draw strategies for the achievement of an NPs environmental risks assessment. In particular, the actual strategy to use PS-NPs as a proxy of the other plastic polymers seems not to be feasible, as polystyrene is not the most harmful polymer.

Figure: boxplot representing the different swimming distances of *D. magna* for PVC-NPs and PS-NPs.





UTILIZZO DELL'ESTRATTO DI BASILICO IN ACQUACOLTURA: UN'ALTERNATIVA ECOSOSTENIBILE?

P. Pastorino^a, M. Renzi^a, A.C. Elia^a, K. Varello^a, G. Magara^a, S. Anselmi^b, F. Provenza^c, A. Maganza^d, S. Bergagna^e, R. Barbero^f, D. Barceló^g, M. Prearo^h

^a Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria and Valle d'Aosta, Torino – paolo.pastorino@izsto.it; katia.varello@izsto.it; alessandra.maganza@izsto.it; stefania.berganga@izsto.it; marino.prearo@izsto.it

^b Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste – mrenzi@units.it

^c Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie, Università degli Studi di Perugia, Perugia – antonia.elia@unipg.it; magara.gabriele@gmail.com

^d Bioscience Research Centre, Orbetello (GR) – serena.anselmi@bsrc.it; francesca.provenza@bsrc.it

^e ASL TO4, Servizio Veterinario, Settimo Torinese (TO) – rbarbero@aslto4.piemonte.it

^f Catalan Institute for Water Research, Girona, Spain – dbcqam@cid.csic.es

L'utilizzo non razionale degli antimicrobici può generare una pressione evolutiva in grado di portare alla selezione di microrganismi, anche patogeni, resistenti agli antibiotici. L'uso di olii essenziali ed estratti vegetali in acquacoltura potrebbe rappresentare una valida strategia per ridurre l'uso degli antimicrobici. Gli obiettivi di questo studio prevedono: a) la valutazione dell'effetto dell'estratto di basilico (*Ocimum basilicum*) nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) tramite biomarcatori di stress ossidativo e parametri ematochimici; b) la valutazione l'impatto ambientale dell'estratto di basilico mediante saggi ecotossicologici. La sperimentazione è stata condotta su un lotto di 430 femmine di trota iridea. Per la realizzazione della prova, l'estratto di basilico (F1-BEO) ottenuto mediante tecnologia della CO₂ supercritica, è stato addizionato ad una dieta commerciale per pesci nelle proporzioni di 0,5% p/p (gruppo A), 1% p/p (B), 2% p/p (C) e 3% p/p (D). È stata inoltre realizzata una dieta di controllo senza F1-BEO (E). Per la determinazione dei biomarcatori di stress ossidativo e dei parametri ematici, 32 pesci per ciascun gruppo sperimentale (otto pesci per vasca; quattro repliche per dieta) sono stati campionati a metà (15 giorni; T1) e alla fine (30 giorni; T2) della sperimentazione. I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena caudale, centrifugati per l'ottenimento del siero ed analizzati con lo strumento I-Lab Aries Chemical Analyzer. I principali organi (fegato, rene ed intestino) sono stati prelevati da ciascun esemplare sia per la determinazione dei biomarcatori di stress ossidativo (fegato e rene), che per l'esame istologico (intestino e fegato). La batteria di test ecotossicologici utilizzata per la valutazione dell'impatto ambientale è stata selezionata in base all'ecosistema acquatico (dolce o marino), alla rappresentatività ecologica ed in relazione al ruolo della specie nella catena trofica; in particolare, sono stati selezionati: *Aliivibrio fischeri*, *Raphidocelis subcapitata*, *Daphnia magna*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Paracentrotus lividus*. I saggi sono stati effettuati sul mangime addizionato al 3% p/p di F1-BEO (sostanza 1), sull'estratto di basilico (F1-BEO; sostanza 2), sul mangime di controllo senza estratto di basilico (sostanza 3). I livelli di superossido dismutasi, catalasi, glutatione perossidasi, glutatione S-transferasi, glutatione reduttasi, gliossalasi I, gliossalasi II, lattato deidrogenasi, glutatione e malondialdeide hanno mostrato un aumento significativo nelle trote alimentate con lo 0,5% di F1-BEO. Una maggiore integrazione di F1-BEO (1-3% p/p) ha determinato una deplezione dell'attività di diversi enzimi ed un esaurimento dei livelli di glutatione totale. Inoltre, i livelli riscontrati di malondialdeide suggeriscono una sufficiente difesa dallo stress ossidativo promossa dalla via antiossidante contro la perossidazione lipidica in tutti i gruppi sperimentali, ad eccezione della dieta contenente il 3% p/p di F1-BEO. Anche i parametri biochimici del siero si sono rivelati altamente sensibili all'estratto di basilico. Infatti, l'ANOVA a due vie ha mostrato che il tempo, il trattamento e la loro interazione hanno avuto un effetto significativo sui livelli di creatinina, urea, proteine totali, albumina, magnesio e fosforo. All'esame istologico i campioni analizzati non hanno presentato lesioni patologiche significative né di tipo infiammatorio, né degenerativo. Per quanto riguarda i saggi ecotossicologici, i risultati risultano comparabili all'interno dello stesso livello trofico (indipendentemente dall'ecosistema di appartenenza). L'EC₅₀ non è risultata calcolabile nell'intervallo considerato (3,9–500 mg/L) per le microalghe, suggerendo un'assenza di tossicità per i produttori primari. La riduzione della bioluminescenza di *A. fischeri* alle concentrazioni testate (0,5–10 mg/L) è stata osservata solo per la sostanza 1. In *P. lividus*, l'embriotossicità è risultata maggiore per le sostanze 1 e 3 rispetto alla sostanza 2, suggerendo un effetto tossico dovuto alla dissoluzione del mangime. Al contrario, la sostanza 2 è risultata più tossica (EC₅₀: 0,34 mg/L) in *D. magna* rispetto alla sostanza 1 (EC₅₀: 3,98 mg/L) e 3 (EC₅₀: 5,50 mg/L). In conclusione, i risultati suggeriscono un potenziale utilizzo dell'estratto F1-BEO in acquacoltura; tuttavia, le sostanze testate risultano potenzialmente tossiche per l'ecosistema acquatico, in particolare per i consumatori primari.

LA DISSALAZIONE DI ACQUE MARINE. CONSIDERAZIONI TECNICHE, ECONOMICHE E GESTIONALI.

M. Icardi

° Collaboratore e redattore del blog "La chimica e la società" - siricaro@tiscali.it

Abstract La soluzione ovvia alla siccità sembra per la maggior parte delle persone la tecnica di dissalazione delle acque marine. La motivazione risiede nel fatto che è conoscenza comune che il 97% dell'acqua presente sul nostro pianeta è acqua salata e si trova nei mari e negli oceani. La tecnica della dissalazione è certamente una tecnica matura, ma occorre fare attente valutazioni di carattere tecnico, economico ed energetico. Altro aspetto fondamentale da considerare è che da questa tecnica si possono ottenere acque di di qualità differente e destinate ad usi diversi. Per questa ragione è necessaria l'analisi preliminare delle acque grezze e quella di controllo di qualità delle acque trattate. In caso di utilizzo di acqua dissalata destinata ad uso idropotabile, l'adozione di test ecotossicologici da affiancare ai test microbiologici e alle analisi chimiche sarebbe auspicabile. Questo per garantire non solo la qualità dell'acqua erogata, ma anche per rafforzare la fiducia dei consumatori.

SESSIONE III – “E SE DOMANI”: PROSPETTIVE PER IL FUTURO

IL PROGETTO “POLIGONI-POSEIDONE”: *BIOASSAY* E *BIOMARKER* PER CONTRIBUIRE A DECIDERE SU RESIDUATI DI ORIGINE MILITARE DISPERSI SUI BASSI FONDALI DI CAPO TEULADA (CA)

S. Giuliani ^a, G. Moltedo ^c, D. Sartori ^a, L. Alcaro ^b, P. Renzi ^b, G. Martuccio ^c, B. Catalano ^c, Maura Benedetti ^d, Francesco Regoli ^d, C. Numa ^b, E. Amato ^b

^a ISPRA CN-COS: silvia.giuliani@isprambiente.it
davide.sartori@isprambiente.it

^b ISPRA CN-CRE: luigi.alcaro@isprambiente.it
paola.renzi@isprambiente.it
claudio.numa@isprambiente.it
ezio.amato@isprambiente.it

^c ISPRA CN-LAB: ginevra.moltedo@isprambiente.it
giacomo.martuccio@isprambiente.it
barbara.catalano@isprambiente.it

^d UNIVPM: m.benedetti@staff.univpm.it
f.regoli@staff.univpm.it

Abstract. Il progetto “Valutazione delle esigenze di rimozione di residuati dai fondali marini prospicienti le aree addestrative di Capo Teulada (CA) e Torre Veneri (LE)” è stato co-finanziato dallo Stato Maggiore dell'Esercito italiano a ISPRA - SNPA e concepito e condotto per contribuire alla formazione di una decisione in merito ai residuati presenti sui bassi fondali antistanti due aree deputate all'addestramento “a fuoco” di militari dell'Esercito, della Marina e dell'Aeronautica. Per accertare il possibile effetto nocivo di questi residuati e formulare una valutazione della necessità di misure di contenimento degli eventuali impatti, inclusa la loro rimozione, il progetto si è avvalso di un approccio multidisciplinare che ha contemplato studi di sedimentologia, prospezioni elettroacustiche e visuali, *bioassay*, studio di *biomarker* e indagini radiometriche. Le attività di campo e di laboratorio relative ai test ecotossicologici e allo studio di *biomarker*, eseguite su organismi prelevati nelle acque di Capo Teulada e del vicino Capo Spartivento (area di riferimento), sono state condotte da personale tecnico di ISPRA e dell'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna (ARPAS) con il supporto di mezzi e personale di unità militari specializzate. I risultati ottenuti dai saggi biologici e dalle analisi di *biomarker*, condotte su specie bentoniche stanziali (*Paracentrotus lividus*, *Conger conger*, *Muraena spp.*), hanno contribuito a concludere che quanto disperso nell'area oggetto di studio, solo in minima parte rappresenta un rischio per gli habitat bentonici locali; non sono stati evidenziati, infatti, “effetti” fisiologici sensibili sul *biota* esaminato ascrivibili univocamente ai residuati dispersi sui fondali.



FITOTOSSICITÀ E MUTAGENICITÀ DI ESTRATTI ACQUOSI DI FANGHI BIOLOGICI, COMPOST E LIQUAMI ZOOTECNICI PER UNA POSSIBILE VALORIZZAZIONE AGRONOMICA

C. Alias^a, D. Feretti^b, I. Zerbin^c, A. Abbà^d, M. Domini^e, M. Menghini^f, R. Pedrazzani^g, G. Bertanza^h

^a DSMC-Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche, Scienze Radiologiche e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Brescia - carlotta.alias@unibs.it

^b DSMC-Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche, Scienze Radiologiche e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Brescia - donatella.feretti@unibs.it

^c DSMC-Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche, Scienze Radiologiche e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Brescia - ilaria.zerbin@unibs.it

^d DICATAM-Dipartimento di Ingegneria Civile, Architettura, Territorio, Ambiente e di Matematica, Università degli Studi di Brescia - alessandro.abba@unibs.it

^e DICATAM-Dipartimento di Ingegneria Civile, Architettura, Territorio, Ambiente e di Matematica, Università degli Studi di Brescia - marta.domini@unibs.it

^f DIMI-Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Industriale, Università degli Studi di Brescia - m.menghini@unibs.it

^g DIMI-Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Industriale, Università degli Studi di Brescia - roberta.pedrazzani@unibs.it

^h DICATAM-Dipartimento di Ingegneria Civile, Architettura, Territorio, Ambiente e di Matematica, Università degli Studi di Brescia - giorgio.bertanza@unibs.it

Abstract

Questo studio è dedicato alla caratterizzazione tossicologica di fanghi biologici, compost e liquami zootecnici ai fini della loro valorizzazione agronomica ed è parte del progetto "SLUdge (and other residues) Recovery in agriculture: environment and health Protection – SLURP" finanziato nell'ambito del Bando Fondazione Cariplo 2020 "Economia circolare: ricerca per un futuro sostenibile".

Tre fanghi di depurazione (A, B, C), un compost (D), un digestato da liquami zootecnici (E) e due liquami zootecnici di origine suina e bovina (F, G) sono stati analizzati.

Aliquote dei campioni sono state sottoposte a estrazione acquosa mediante sonicazione a freddo (2 cicli, 30 min/ciclo) seguita da filtrazione su carta. Gli estratti sono stati analizzati mediante una batteria di test *in vivo* e *in vitro* in vegetali e batteri per valutare la tossicità e la mutagenicità. La tossicità è stata valutata mediante test di germinazione e allungamento radicale (metodo UNICHIM 1651:2003) su semi di *Lepidium sativum*, *Cucumis sativus*, *Allium cepa* esposti a diverse diluizioni (100%, 50%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1%), calcolando l'indice di germinazione (IG) e, dove possibile, l'EC50. La tossicità è stata valutata anche mediante l'inibizione dell'allungamento radicale in bulbi di *Allium cepa* fatti germinare direttamente negli eluati, alle stesse diluizioni utilizzate per i semi. Per valutare la mutagenicità ciascun estratto (100%, 10%, 1%, 0,1%), preventivamente filtrato (0,45 µm), è stato saggiato mediante test di Ames in *Salmonella typhimurium*, con i ceppi TA98 e TA100.

Il test di fitotossicità sui semi ha dimostrato in generale bassa tossicità dei campioni. I campioni A, B, C (fanghi di depurazione) e G (liquame bovino) non hanno evidenziato alcun effetto di inibizione della germinazione e dell'allungamento radicale nelle tre specie vegetali utilizzate, con IG superiori a 80%. Il campione F (liquame suino) non è risultato tossico in *C. sativus* e *A. cepa*, mentre in *L. sativum* ha indotto una moderata tossicità (EC50=100%). Al contrario, due campioni (D, E) hanno inibito la germinazione e l'allungamento radicale in tutte le specie vegetali utilizzate. In particolare l'EC50 calcolata è risultata: 23% in *A. cepa*, 47% in *L. sativum*, 99% in *C. sativus* per il campione D, e 34% in *L. sativum*, 73% in *A. cepa*, 100% in *C. sativus* per il campione E. Il campione D è risultato particolarmente tossico anche sui bulbi di *A. cepa* (EC50=3,1%), così come i campioni A (EC50=4,9%), e G (EC50=9,9%), mentre il campione E ha mostrato una minore tossicità (EC50=50,5%). Per i campioni B, C e F si conferma tossicità bassa o assente. Infine per quanto riguarda il test di Ames, nessun campione ha indotto effetti mutageni in entrambi i ceppi di *S. typhimurium*.

La ricerca è tutt'ora in corso, quindi questi risultati potranno essere compiutamente interpretati solo dopo la valutazione integrata di tutti i dati ecotossicologici e chimici. Si sottolinea che al momento non vi sono riferimenti normativi circa l'uso dei saggi impiegati per la valutazione dell'idoneità dei substrati al riutilizzo in agricoltura. Intento del progetto è proprio l'identificazione di strumenti che possano essere proficuamente integrati alle analisi chimiche per una caratterizzazione completa delle matrici.

ECOTOXICOGENOMIC APPROACH TO ASSESS DIFFERENT SENSITIVITY OF THE CONGENERIC ACARTIA COPEPODS

F. Rotolo^{a,b}, Y. Carotenuto^a, V. Vitiello^b, D. Pellegrini^b, I. Buttino^{a,b}

^aStazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale 1, 80121, Napoli, Italy

^b Istituto Superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale, Via del cedro 38, 57122, Livorno, Italy

Abstract - Copepods are ubiquitous small crustaceans, the most abundant components of mesozooplankton. Their ecological role as a link between phytoplankton and higher consumers, makes them key organisms in marine ecosystem. Studying the effects of pollutants on the functional biology of copepods is therefore important to understand the impact of chemicals on the whole marine productivity. Any modification of copepod physiology due to anthropic impacts can be investigated with an ecotoxicogenomic approach, which combines both ecotoxicological assays and genomic analysis, such as transcriptome functionality.

Here, two congeneric copepod species, *Acartia clausi* and *A. tonsa*, have been used as models to analyze physiological and molecular responses to contaminants; *A. clausi* is very recently proposed as a model organism, whereas *A. tonsa* is largely used in ecotoxicology since the 80s. The published de novo transcriptome and historical control data regarding ecotoxicological data-sets of *A. tonsa*, allowed to measure the level of sensitivity and functional molecular alterations after exposure to referent toxicants, and can represent a starting point to analyze the responses induced in the congeneric *A. clausi* species by pollutants.

The objective of the present study is to widen our knowledge on the functional biology of *A. clausi* and *A. tonsa* and propose this multidisciplinary and multilevel ecotoxicogenomic analysis in ecological risk assessment. We exposed both species to the referent toxicants nickel chloride and nickel nanoparticles and ecotoxicological assays were conducted to verify acute and chronic effects. Moreover, total RNA was extracted from those females exposed to toxicants and the quantitative gene expression of selected genes of interest was studied in RT-qPCR. Our results showed that *A. clausi* nauplii are more sensitive to toxicants with respect to *A. tonsa* of almost two orders of magnitude. Physiological responses of adults to the chemicals were similar among the two species and consisted mostly in a reduction of egg production, induced by both toxicants. Regarding the molecular responses, differences in quantitative gene expression of the two species exposed to the same toxicant were revealed and could partially explain the different sensitivity recorded between the two species.

VALUTAZIONE DELLA POTENZIALE TOSSICITÀ DI MICROPLASTICHE DERIVANTI DA PLASTICHE CONVENZIONALI E BIOPLASTICHE SUL LOMBRICO *EISENIA FETIDA*

B. De Felice^a, *S. Gazzotti*^{a,b}, *G. Driussi*^a, *M. Sugni*^a, *M.A. Orteni*^b, *M. Parolini*^a

^a Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze e Politiche Ambientali, via Celoria 26, 20133 Milano

^b Laboratory of Materials and Polymers (LaMPo), Department of Chemistry, University of Milan, via Golgi 19, I-20133, Milan, Italy

e-mail: beatrice.defelice@unimi.it

Abstract La contaminazione da microplastiche (MP) è al giorno d'oggi un problema ambientale ubiquitario che riguarda sia gli ecosistemi acquatici sia quelli terrestri. Sebbene diversi studi abbiano evidenziato la presenza di microplastiche nel suolo, la loro tossicità nei confronti degli organismi che lo popolano resta ancora poco studiata a dispetto della controparte acquatica. Il presente studio si pone come obiettivo la valutazione dei possibili effetti negativi indotti dall'esposizione di 28 giorni a microplastiche di un polimero convenzionale, il polietilene tereftalato (PET), e di una bioplastica, l'acido polilattico (PLA), somministrate in concentrazione di 1 g/Kg di terreno (0,1% del peso del suolo) e 10 g/Kg di terreno (1% del peso del suolo) al lombrico terrestre *Eisenia fetida*. La scelta è ricaduta su questi due polimeri in quanto ampiamente utilizzati nel settore del *packaging* alimentare, come ad esempio le bottiglie dell'acqua minerale, e di conseguenza sono comunemente riscontrati in ambiente dove la loro degradazione può dare origine a frammenti micrometrici. Microplastiche di PET e PLA di dimensioni eterogenee e forma irregolare, scelte al fine di riprodurre il più fedelmente possibile le reali condizioni ambientali, sono state miscelate al suolo e somministrate ai lombrichi per 28 giorni in condizioni statiche. È stato quindi applicato un approccio multi-livello per valutare i possibili effetti negativi indotti dall'esposizione alle microplastiche composte da entrambi i polimeri a livello sub-individuale e individuale. A livello sub-individuale è stata valutata dopo 7, 14, 21 e 28 giorni di esposizione, la modulazione dell'attività di enzimi antiossidanti, quali la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT) e la glutazione perossidasi (GPx) e detossificanti, quali la glutazione S-transferasi (GST), oltre alle variazioni dei livelli di perossidazione lipidica (LPO). A livello tissutale, invece, al termine dei 28 giorni di esposizione, è stata valutata la presenza di alterazioni cellulari e tissutali riconducibili a danni meccanici e/o a situazioni di infiammazione a livello del tratto digerente. In ultimo, a livello individuale è stata valutata la possibile modulazione del comportamento di infossamento dei lombrichi. I risultati ottenuti dal presente lavoro hanno confermato la capacità dei lombrichi di ingerire microplastiche di PET e di PLA. Sebbene l'ingestione di microplastiche di PET non abbia indotto alcun effetto avverso né a livello sub-individuale né individuale, il trattamento con microplastiche di PLA ha causato una modulazione dello stato ossidativo dei lombrichi, che non si è però tradotta in alcun danno tissutale o alterazione comportamentale. Tale effetto potrebbe essere riconducibile ai sottoprodotti di degradazione del PLA, ipotesi che però dovrebbe essere confermata da ulteriori indagini. In conclusione, il presente lavoro amplia le conoscenze riguardanti i potenziali effetti delle microplastiche nei considerati come alternative ecosostenibili delle plastiche convenzionali, possano rappresentare un rischio per gli ecosistemi naturali.

CONFRONTO NELLA TOSSICITÀ DEGLI OGGETTI DI PLASTICA VERGINE RISPETTO A QUELLI SPIAGGIATI LUNGO GLI AMBIENTI COSTIERI

C. Mazzoli^a, G. d'Errico^a, F. Iezzi^a, D. Fattorini^a, M. Di Carlo^a, L. Pittura^a, A. Nardi^a, M. Benedetti^a, S. Gorbi^a, F. Regoli^a

^aDipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, via Brecce Bianche (60131), Ancona, Italy

- c.mazzoli@pm.univpm.it

Abstract: La presenza e l'accumulo di plastic litter nell'ambiente marino è un fenomeno ormai ben noto e largamente indagato, che tende ad acuirsi nei bacini caratterizzati da coste fortemente antropizzate e scambi d'acqua limitati, proprio come il Mare Adriatico. Il destino della plastica in mare è ancora poco conosciuto; essa può impiegare centinaia di anni a degradarsi e, permanendo in mare per un così lungo periodo, può percorrere lunghe distanze, affondare o raggiungere la costa, agendo come carrier di composti chimici intrinseci (additivi e polimeri organici che la costituiscono) e composti chimici presenti in ambiente. Questi composti possono essere assorbiti/adsorbiti sulla superficie dei materiali plastici per poi essere nuovamente rilasciati nell'ambiente marino o essere potenzialmente veicolati negli organismi, causando effetti tossici e rappresentando un rischio concreto per la biodiversità marina. Al fine di indagare il possibile ruolo della plastica come carrier di contaminanti nell'ambiente marino e valutare l'impatto biologico dovuto all'interazione tra gli organismi ed i composti rilasciati dalla plastica stessa, il presente studio ha come obiettivo quello di utilizzare una batteria di saggi ecotossicologici per confrontare la potenziale tossicità degli elutriati ottenuti da oggetti di plastica vergini e gli stessi oggetti rinvenuti spiaggiati lungo le coste dell'Adriatico.

A seguito dell'attività di raccolta del materiale plastico spiaggiato, che ha interessato un'area di circa 176 m² situata nella Riviera del Conero (Mar Adriatico, Italia), 5 categorie di oggetti più abbondanti sono state selezionate come rappresentative: (1) frammenti eterogenei (polipropilene, PP); (2) scatole di polistirolo (PS); (3) retini da mitilicoltura (PP e polietilene, PE); (4) gomma del "Rapido" (specifica rete a strascico) e (5) bottiglie (polietilene tereftalato, PET).

L'identificazione dei polimeri plastici è stata eseguita utilizzando la tecnica della spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) in riflettanza totale attenuata (ATR). Gli stessi oggetti, con la medesima natura polimerica di quelli spiaggiati, ma di plastica vergine, sono stati acquistati sul mercato.

Gli elutriati sono stati ottenuti mantenendo in agitazione i frammenti di plastica (≤ 1 cm²) in acqua di mare naturale filtrata, a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ\text{C}$) e condizioni di luce naturale, per 72 ore. Il rapporto plastica-acqua è stato mantenuto costante a 100 g/L per tutte le categorie di plastica, ad eccezione delle "scatole di polistirolo" (33 g/L). Per evitare il disturbo meccanico delle particelle plastiche, gli elutriati sono stati filtrati (0,45 mm) prima di essere testati a diverse diluizioni.

Oltre alle analisi chimiche di metalli in traccia e contaminanti organici, l'effetto tossico degli elutriati è stato valutato indagando alcuni endpoint, quali: l'inibizione della bioluminescenza in *Aliivibrio fischeri* (Quaderno ISPRA, 4/2021), l'alterazione dello sviluppo embrionale in *Paracentrotus lividus* (Quaderno ISPRA, 11/2017) e l'inibizione della crescita della microalga *Phaeodactylum tricorutum* (UNI EN ISO 10253:2016E). Dai risultati ottenuti, è stato possibile evincere che gli elutriati delle plastiche vergini mostrano un effetto tossico maggiore rispetto a quelli delle plastiche spiaggiate; tra le varie categorie di oggetti plastici, gli elutriati della categoria "gomma del Rapido" causano l'effetto tossico più elevato.

ECOTOSSICITÀ, GENOTOSSICITÀ E TRASFERIMENTO TROFICO DI MICROPARTICELLE DI POLIETILENE (PE) IN AMBIENTI D'ACQUA DOLCE: IL MODELLO SPIRODELA-ECHINOGAMMARUS

*Iannilli V.*¹, *Lecce F.*¹, *Sciacca G.*^{1,2}, *Pietrini F.*², *Passatore L.*², *Carlioni S.*², *Zacchini M.*²

¹ENEA, Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile, Dip. Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali, C.R. Casaccia, 00123 Roma (ITALY) – e-mail: valentina.iannilli@enea.it

²Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri (IRET), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), 00015 Monterotondo Scalo, Roma (ITALY)

Il rilascio e l'accumulo di detriti plastici negli ecosistemi acquatici rappresentano una minaccia ambientale di crescente interesse. Le microplastiche (MPs) sono tra i contaminanti più diffusi, potenziale minaccia per l'intero biota, essendo ormai molte le evidenze del loro ingresso nella catena alimentare. Sono, inoltre, vettori di composti chimici quali additivi e plastificanti e di altri inquinanti adsorbiti sulla loro superficie. Ad oggi, le conoscenze sull'impatto biologico delle MPs e il loro trasferimento trofico sono limitate e controverse, rendendo difficile una valutazione del rischio negli ecosistemi acquatici. In questo contesto, è stato osservato che l'adsorbimento di particelle di plastica sulle piante acquatiche può avere un ruolo determinante nel loro trasferimento alle diverse specie erbivore all'interno dell'ecosistema. Nel presente lavoro è stato utilizzato un approccio multispecie nella valutazione dell'impatto di microparticelle di PE (40-50µm) in ambiente dulcacquicolo utilizzando una piccola pianta flottante, *Spirodela polyrrhiza* (Araceae, Lemnoideae), usata come specie modello nei test di tossicità e l'anfipode gammaride *Echinogammarus veneris*. I Crostacei anfipodi rivestono una posizione chiave all'interno delle reti trofiche essendo detritivori, erbivori, o predatori, rappresentando, inoltre, un'importante fonte alimentare per molti animali dei livelli trofici superiori. A causa del ruolo trofico, possono interagire con le MPs e ingerirle, costituendo entry points nella rete alimentare. L'adsorbimento delle MPs nelle Lemnoideae e l'ingestione negli anfipodi sono stati già documentati in letteratura (Mateos-Cardenas, 2021; Iannilli et al., 2020).

Nel presente studio è stata valutata in laboratorio la capacità di *S. polyrrhiza* di trattenere le microparticelle di PE e il trasferimento trofico a *E. veneris*. Parallelamente, abbiamo valutato l'ecotossicità e la genotossicità di queste particelle in entrambe le specie. Nelle fronde di *Spirodela*, attraverso l'Eco-Tox Photosystem Tool (ETPT, Pietrini & Zacchini, 2020), non sono stati rilevati effetti dell'esposizione alle microparticelle di PE sui parametri biometrici e sull'apparato fotosintetico, mentre è stata stimata una leggera riduzione del contenuto di clorofilla e dei carotenoidi attraverso lo studio degli spettri di riflettanza fogliare e degli indici ad essi correlati. Nei tubi digerenti degli esemplari di *E. veneris*, alimentati per 24h con *S. polyrrhiza* contaminata con le microparticelle di PE, sono state rilevate circa 6 particelle per ogni campione. Per la valutazione della genotossicità, esemplari di *E. veneris* sono stati esposti per 24h ad una concentrazione di microparticelle di PE pari a 40µg/ml. Attraverso il Comet Assay sugli emociti estratti, è stato possibile verificare un danno significativo al DNA rispetto al controllo negativo.

Sebbene gli effetti prodotti dalle microparticelle di PE sulle piante di *Spirodela*, nella concentrazione utilizzata in questa sperimentazione, siano risultati lievi, sono state trovate centinaia di particelle adsorbite sulle fronde e sulla superficie delle radici. L'adesione delle microparticelle di PE su queste piante rende tale materiale più facilmente disponibile all'ingresso nella catena trofica. Anche se gli effetti delle MPs sugli organismi animali sono già stati oggetto di numerosi studi, con particolare attenzione ai parametri vitali standard come mortalità, crescita e riproduzione, risultano scarsamente documentati quelli sugli effetti genotossici. Questa sperimentazione descrive per la prima volta gli effetti genotossici delle MPs sui crostacei anfipodi.

Bibliografia

Iannilli, V., Corami, F., Grasso, P., Lecce, F., Buttinelli, M., Setini, A., 2020. Plastic abundance and seasonal variation on the shorelines of three volcanic lakes in Central Italy: can amphipods help detect contamination? Environ. Sci. Pollut. Res. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07954-7>.

Mateos-Cárdenas, A., van Pelt, F.N.A.M., O'Halloran, J., Jansen, M.A.K., 2021. Adsorption, uptake and toxicity of micro- and nanoplastics: Effects on terrestrial plants and aquatic macrophytes. Environ. Pollut. 284. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117183>.

Pietrini, F., Zacchini, M., 2020. A new ecotoxicity assay for aquatic plants: eco-tox photo- system tool (ETPT). Trends Plant Sci. 25 (12), 1266–1267. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.08.012>

SESSIONE I

L'UTILIZZO DEL CAMPIONAMENTO PASSIVO PER IL MONITORAGGIO DEI CONTAMINANTI CHIMICI NELLE ACQUE PORTUALI

B. Marras^a, N. Montero^b, A. Marrucci^a, A. Desogus^a, D. Todde^a, D. Pellegrini^d, D. Sartori^d, S. Macchia^d, M. Schintu^a

^a Università degli Studi di Cagliari - schintu@unica.it

^b AZTI, San Sebastian, Spagna - nmontero@azti.es

^d ISPRA Livorno - david.pellegrini@isprambiente.it

Abstract - Le aree portuali sono soggette a contaminazioni di diversa natura, non solamente legate al traffico navale. Periodiche operazioni di dragaggio possono portare al rilascio di contaminanti chimici dai sedimenti nella colonna d'acqua e al loro trasporto a distanza da parte delle correnti. Anche la risospensione dei sedimenti causata dalle manovre delle navi può liberare inquinanti presenti sul fondo. Per valutare il rischio legato a queste attività e più in generale alla presenza di contaminanti nelle acque portuali è necessario utilizzare strumenti affidabili. I campionatori passivi sono stati proposti come una valida alternativa al monitoraggio tradizionale (spot sampling) o all'utilizzo di bioaccumulatori (mitili). Questo studio è stato condotto nell'ambito dei progetti Interreg Atlantico MONITOOL (2017-in corso) e Interreg Italia-Francia Marittimo SEDRIPORT (2017-2020) nei porti di Olbia, Cagliari, La Spezia e Tolone. Per i metalli in traccia sono stati utilizzati Diffusive Gradients in Thin Films (DGT), mentre le sostanze organiche (IPA, PCB, profumi e sostanze antivegetative) sono state campionate con Silicone Rubber (SR). I risultati mostrano che il campionamento passivo può essere considerata una tecnica utile per il monitoraggio della qualità dell'acqua nei porti.

POTENTIAL CORRELATION BETWEEN ALTERED CHROMATINE STRUCTURE, ESTROGENIC POTENTIAL AND METABOLIC IMPAIRMENT IN BISPHENOL EXPOSED BROWN TROUT.

M. Bernardeschi^a, M.Palumbo^a, P.Guidi^b, J.Sturve^b, N.Diano^c, G.Frenzilli^a

^aDepartment of Clinical and Experimental Medicine, University of Pisa, Via A.Volta 4, 56126 Pisa

^bDepartment of Biological and Environmental Sciences, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden

^cDepartment of Experimental Medicine, University of Campania "L. Vanvitelli", Naples, Italy

Bisphenol A (BPA) acts as endocrine-disruptor. Here, a structural alteration of chromatin was reported to be associated with estrogenic activity induced by BPA and thyroid hormones impairment induced by its analogue bisphenol S (BPS). Specimens of *Salmo trutta* were exposed at 2 different times and doses of BPA and BPS. Results showed that BPS might affect thyroid function and glucose balance in the exposed fishes. In contrast, BPA showed stronger estrogenic and mutagenic capacity compared to BPS.

CLASSIFICAZIONE DI RISCHIO ECOTOSSICOLOGICO DEI SEDIMENTI MARINI: NECESSITA' DI STANDARDIZZARE I FATTORI INTERFERENTI IN FASE DI CAMPIONAMENTO E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI.

S. Anselmi[†], F. Provenza^{a,b}, M. Renzi[†]

^a Bioscience Research Centre, Orbetello (GR) – serena.anselmi@bsrc.it; francesca.provenza@bsrc.it

^b Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste – mrenzi@units.it

La valutazione del rischio ecotossicologico dei sedimenti marini è ormai un elemento cruciale nella scelta della gestione del materiale dragato nelle aree portuali e costiere. Infatti, un errore nella classificazione del rischio ecotossicologico ha un impatto negativo sulla qualità dell'ambiente e sull'economia degli stakeholder. La corretta esecuzione delle analisi alla base della classificazione del rischio ecotossicologico comporta competenze importanti da parte del laboratorio di prova che includono la capacità di controllo e standardizzazione di numerosi fattori che possono influenzare l'esito delle prove diminuendone l'affidabilità e la ripetibilità. Questo studio, condotto nell'ambito di un progetto finanziato mediante convenzione di ricerca (RG05100022021, Assing SpA), analizza ed evidenzia i fattori che determinano interferenza significativa sull'esito dell'analisi ecotossicologica quali, ad esempio, il controllo della temperatura di conservazione del campione di sedimento nel periodo compreso tra il campionamento e l'analisi, le diverse modalità di preparazione dell'elutriato da testare, le temperature, i tempi e le modalità di conservazione degli elutriati. Lo studio fornisce, quindi, una valutazione critica di alcuni aspetti cruciali che devono essere valutati e controllati per una migliore standardizzazione del risultato della prova fornendo una stima realistica e ripetibile sul livello di rischio associato alla movimentazione del sedimento. Lo studio vuole anche valutare su scala relativa quale tra i fattori considerati mostrano il maggiore contributo alla variabilità complessiva del risultato analitico e di classificazione integrata considerato.

SESSIONE II

ARE NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS ALWAYS A SUSTAINABLE OPTION? A BIOASSAY-BASED STUDY

Matilde Vieira Sanches^a, *Rosa Freitas*^a, *Matteo Oliva*^b, *Angelica Mero*^c, *Lucia De Marchi*^{ab}, *Alessia Cuccaro*^{ab}, *Giorgia Fumagalli*^b, *Andrea Mezzetta*^c, *Greta Colombo Dugoni*^d, *Monica Ferro*^d, *Andrea Mele*^d, *Lorenzo Guazzelli*^c, *Carlo Pretti*^{b,e*}

^a Department of Biology & Centre for Environmental and Marine Studies (CESAM), University of Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal - matilde.vieira@ua.pt

^b Interuniversity Consortium of Marine Biology and Applied Ecology of Leghorn "G. Bacci", 57128 Livorno, Italy - oliva@cibm.it

^c Department of Pharmacy, University of Pisa, 56126, Pisa, Italy

^d Department of Chemistry, Materials and Chemical Engineering "G. Natta" Politecnico di Milano, Piazza Leonardo da Vinci, 32, Milano, Italy

^e Department of Veterinary Sciences, University of Pisa, 56122, San Piero a Grado, Pisa, Italy - carlo.pretti@unipi.it*

Abstract -. The traditional use of organic solvents in various branches of industry is being rethought as these compounds very often display high volatility, toxicity and lipophilicity (related to the ability to interact with biological membranes). More recently, developments in the field of Green Chemistry are focused on the design of more sustainable and cost-effective solvent alternatives like Ionic Liquids (ILs), bio-based solvents and natural deep eutectic solvents (NADESs). The present study aimed to perform an ecotoxicological screening of 15 NADESs using an extensive set of marine and freshwater bioassays, based on different endpoints: immobilization of the crustacean *Daphnia magna*, growth inhibition of *Raphidocelis subcapitata* and *Phaeodactylum tricornutum*, larval development alterations on the serpulid *Ficopomatus enigmaticus* and bioluminescence inhibition of *Aliivibrio fischeri*. What emerged was a general absence of toxicity in all samples. However, algal assays showed a certain degree of biostimulation, up to over 100% growth increase with respect to controls with 8 out of 15 compounds tested with *Raphidocelis subcapitata*. Despite NADESs induced negligible toxicity effects to invertebrates, encouraging their labelling as "sustainable" solvents, the liability of their intentional or accidental release into aquatic systems may represent a serious risk in terms of ecosystem functioning impairments.

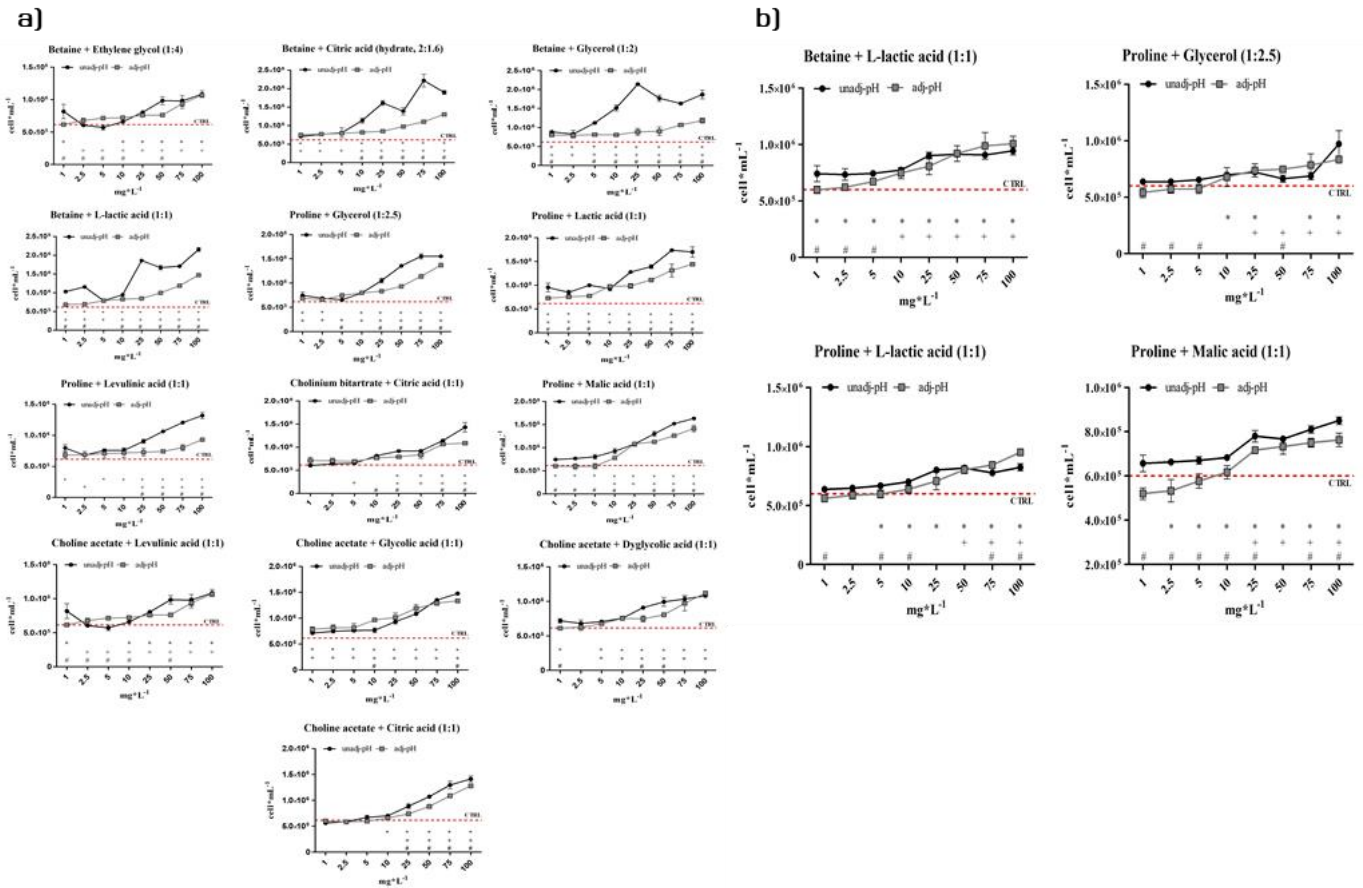


Figure 1. Concentration-response graphs of samples with $\Delta G\% > 40\%$ after a) *R. subcapitata* and b) *P. tricornutum* inhibition of growth assay with both pH-unadjusted (unadj-pH) and adjusted (adj-pH) samples. Red line is the mean algal concentration in controls. Results are expressed as mean algal concentration (cells mL⁻¹) \pm standard deviation (n=3). A Student's *t*-test was performed between each concentration of unadj-pH and control (*), between adj-pH and control (+) and between unadj-pH and adj-pH (#). *, +, # = statistically significant difference, $p < 0.05$.

CURRENT KNOWLEDGE OF APPROVAL PROCEDURES OF DISPERSANT USE AT SEA: WHAT IS STILL MISSING?

L. Manfra^{a,b}, M. Mannozi^a, F. Onorati^a

^aInstitute for Environmental Protection and Research (ISPRA), Rome, Italy

loredana.manfra@isprambiente.it, michela.mannozi@isprambiente.it, fulvio.onorati@isprambiente.it

^bDepartment of Marine Biotechnology, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Naples, Italy

loredana.manfra@szn.it

The unexpected spill into the sea of a large quantity of hydrocarbons, in addition to compromising the integrity of vulnerable habitats, may have serious repercussions on coastal socio-economy sectors (such as tourism, trade, fishing, mariculture and related activities, water uptake for public services and industries), whose success is directly or indirectly related to the good conditions of the marine environment. Thus, an accidental oil spill requires a prompt strategy by the competent authorities in response to the emergency and the chemical dispersion is a possible anti-pollution measure in the marine environment. Chemical dispersion acts on enhancing the typical natural dispersion and dilution of the oil droplets into the water column occurring when sufficient environmental energy conditions (wind, current, wave action, or other forms of turbulence) are met. In addition, dispersants may also strengthen the bacterial degradation of dispersed oil droplets. These products are approved for use in many countries (UK, South Korea, Australia, Egypt, France, Greece, Indonesia, Italy, Japan, Malaysia, Norway, Singapore, Spain, Thailand, and several coastal African, South American, and Middle Eastern countries). But the requirements for their application are country-specific and a harmonization of approval procedures of dispersant use would be suitable, above-all for the countries bordering the same basin. This overview aimed to collect and critically analyze the protocols of the most advanced countries (France, Norway, UK, Spain, Greece, Italy, USA and Australia) in terms of approval for the use of dispersants to identify the best practices for dispersant use, together with challenges and perspectives for future research. With reviewing the approaches applied by the most advanced countries, we identified some opportunities to be shared to increase harmonization: i) performance and effectiveness criteria of the products as pre-toxicity testing requirements; ii) dispersant effectiveness assessment considering a rich oil dataset, a common threshold value (e.g., dispersion of the oil $\geq 60\%$), standardized protocols with reproducible conditions for dispersant use; iii) toxicity assessment considering three matrices (alone dispersant, untreated oil and dispersed oil), three trophic level (e.g., algae, rotifers, crustaceans), a common threshold value (e.g., $EC_{50} \geq 10$ mg/l), standardized protocols (e.g., ISO methods available for all above-mentioned levels); iv) biodegradability and bioaccumulation assessment by recognized datasets, using the experimental route only for unknown substance; v) sharing of NOSCPs and annexed zoning according to common criteria; vi) monitoring before, during and after use of dispersants at sea. New potential challenges were also identified on dispersant use: i) deepen human health risk assessment; ii) assess further effects at sea in term of long-term biological responses, effects of subsea use of dispersants; iii) deepen use of natural dispersants containing environmentally friendly ingredients (e.g., food grade chemical surfactants, biosurfactants, ionic liquids, and additives).

SESSIONE III

APPLICAZIONE DI TEST ECOTOSSICOLOGICI IN STUDI DI RECUPERO AMBIENTALE

L. Mariani^a, P. Grenni^a, A. Narciso^{ab}, L. Patrolecco^c, V. Ancona^d, A. Barra Caracciolo^a.

^a Istituto di Ricerca sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), Montelibretti (Roma) - livia.mariani@irsa.cnr.it; paola.grenni@irsa.cnr.it; alessandra.narciso@irsa.cnr.it; anna.barracaracciolo@irsa.cnr.it

^b Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo (VT); ^c Istituto di Scienze Polari, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), Montelibretti (Roma) - luisa.patrolecco@cnr.it

^d Istituto di Ricerca sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), Bari (BA) - valeria.ancona@irsa.cnr.it

Per recuperare gli ambienti impattati da diverse attività antropiche, le nuove strategie verdi, le cosiddette nature-based solutions (NBS), costituiscono una valida metodologia alternativa alle tradizionali pratiche di

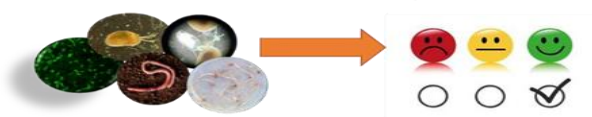
Microcosm experiments with contaminated (PCB, IPA, HMs, lime) soil/sediment



Nature-based solutions:
Bioremediation/Phyto-assisted bioremediation

bonifica, in linea con il concetto di sostenibilità ambientale. Le NBS hanno l'obiettivo di ripristinare i servizi ecosistemici funzionali alla salute ambientale, con benefici per salute animale e umana, secondo il principio di *One Health*. Un approccio ecologico di NBS, ispirato ai fenomeni naturali, è il biorimedio o il biorimedio fito-assistito per ristabilire e promuovere l'attività della comunità microbica nella matrice ambientale.

Ecotoxicological tests on contaminated soil/sediment at the start and the end of the experiments



I test ecotossicologici possono essere utilizzati come un valido strumento per analizzare le matrici ambientali impattate, prima e dopo l'applicazione delle NBS, al fine di valutare se tali strategie siano efficaci. Nel presente lavoro si riportano alcuni test ecotossicologici [*Aliivibrio fischeri*, ISO 11348-3:2019; *Heterocypris incanegrans*, ISO 14371:2012] effettuati su diverse matrici ambientali prima e dopo l'applicazione di NBS. In particolare, sono stati analizzati suoli e sedimenti diversamente impattati: terre provenienti da

uno scavo meccanizzato di una galleria e trattate a calce; un sedimento marino e un suolo, entrambi contaminati da PCB e metalli pesanti; un sedimento fluviale contaminato da IPA. I risultati dimostrano l'efficacia degli interventi di recupero e l'importanza dei test ecotossicologici come strumento di supporto alla valutazione dello stato di qualità delle matrici contaminate. E' interessante evidenziare che, in alcuni casi, sebbene i valori soglia di contaminazione, secondo le normative vigenti, siano rispettati, possono persistere delle criticità nella matrice esaminata, dovute probabilmente alla presenza di alcune sostanze chimiche e/o metaboliti (intermedio prodotti di degradazione) non noti o emergenti.

ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS OF THE UV-FILTER 4-MBC ON SPERMS AND ADULTS OF THE MUSSEL *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

A. Cuccaro^{ab}, L. De Marchi^{ab}, M. Oliva^b, F. Battaglia^c, V. Meucci^c, G. Fumagalli^d, R. Freitas^a, C. Pretti^{bc}

^a Centre for Environmental and Marine Studies (CESAM) & Department of Biology, University of Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal - alessia.cuccaro@ua.pt - lucia.demarchi.ld@gmail.com - rosafreitas@ua.pt

^b Interuniversity Consortium of Marine Biology and Applied Ecology "G. Bacci", 57128, Livorno, Italy - oliva@cibm.it - carlo.pretti@unipi.it

^c Department of Veterinary Sciences, University of Pisa, 56122, San Piero a Grado, PI, Italy - valentina.meucci@unipi.it - federica.battaglia@phd.unipi.it

^d Department of Biology, University of Pisa, Via Derna 1, 56126, Pisa, Italy - giorgi.fumagalli.95@gmail.com

Abstract - Present in an increasing number of products, UV-filters are continuously discharged into aquatic environments. Despite potential risks for inhabiting organisms are recognized, the effects of UV-filter 4-methylbenzylidenecamphor (4-MBC) on marine invertebrates are poorly investigated. By combining *in vitro* / *in vivo* exposures through a multi-biomarker approach on sperms and adults, the present study evaluated how 4-MBC affect the mussel species *Mytilus galloprovincialis*, providing ecologically relevant information on organisms' responses. From obtained results, considering mortality as endpoint, sperms revealed a greater sensitivity (EC₅₀: 347 µg/L) than adults (EC₅₀: not calculable). From an ecotoxicological perspective, this resulted in a derived threshold concentration (LOEC) of 100 µg/L and 72 µg/L, respectively. Effects at the cell/molecular level were provided by general redox-status imbalance and oxidative stress. Sperms showed functional and structural impairments, hyperactivation and DNA damage (Figure 1), while adults showed physiological, metabolic/energetic dysfunctions, DNA damage and activation of oxidative and biotransformation enzymes (Figure2). High 4-MBC bioaccumulation was also observed in exposed mussels (BCFs: 14.0–32.0 L/kg). These findings suggest that 4-MBC may impair fitness and survival of the broadcast spawning mussel *M. galloprovincialis*, affecting reproduction success and population growth.

VALUTAZIONE PRELIMINARE DEGLI EFFETTI DEI CONTAMINANTI IN *MULLUS BARBATUS* AI FINI DEL MONITORAGGIO NAZIONALE PREVISTO DA STRATEGIA MARINA E DA IMAP-UNEP

G. Molledo, B. Catalano, G. Martuccio

1Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Via di Castel Romano, 100, 00128 Rome, Italy.
Email: ginevra.molledo@isprambiente.it;

barbara.catalano@isprambiente.it; giacomo.martuccio@isprambiente.it

Abstract - Sia in ambito europeo (DM 2008/56/CE, Marine Strategy) che al livello dei Paesi del Mediterraneo (Convenzione di Barcellona, 1976, IMAP-UNEP) è recentemente emersa l'esigenza di una valutazione dello stato di qualità ambientale e, in particolare, degli effetti dei contaminanti. A tal fine nel Programma di monitoraggio ambientale italiano sono state previste le analisi di biomarker in organismi bioindicatori. Come specie target è stato selezionato il *Mullus barbatus*, in accordo con le indicazioni IMAP-UNEP e normativa italiana in recepimento della Strategia Marina. Come biomarker sono stati selezionati la frequenza dei micronuclei, l'inibizione dell'acetilcolinesterasi e la stabilità delle membrane lisosomiali (metodo enzimatico), oltre all'attività dell'EROD, in accordo con il Piano di Monitoraggio Nazionale per MSFD e con le indicazioni IMAP-UNEP, tenendo in considerazione quelli per i quali sono stati definiti valori soglia. Per la valutazione integrata dei risultati in ambito nazionale non è stato ancora definito il metodo da utilizzare. Questo studio rappresenta un tentativo di applicazione del metodo qualitativo del "traffic light" utilizzato in ambito ICES/OSPAR per la valutazione integrata dei risultati del monitoraggio nazionale degli effetti dei contaminanti mediante analisi di biomarker, eseguito da ISPRA tra il 2019 e il 2021 (MSFD). Ulteriori sviluppi di criteri di valutazione, tuttavia, sono ancora necessari prima che si possa definire quale sia l'approccio più idoneo per la determinazione del buono stato ambientale (GES) della Strategia Marina nella Regione del Mediterraneo.

IMPIEGO E VALORIZZAZIONE DEGLI STRUMENTI ECOTOSSICOLOGICI NELL'AMBITO DEL CICLO IDRICO INTEGRATO

M. Menghini^a, R. Pedrazzani^a

^a DIMI-Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Industriale, Università degli Studi di Brescia, Via Branze 38, I-25123 Brescia, Italia - m.menghini@unibs.it

Abstract - La protezione delle risorse idriche dalla contaminazione di inquinanti che potrebbero rappresentare una minaccia per la salute umana e l'equilibrio degli ecosistemi, si configura come una tematica cruciale al fine di ottemperare l'esigenza di un "ambiente privo di sostanze tossiche e a inquinamento zero", dettata dall'Unione Europea attraverso il Green Deal (call del programma Horizon 2020).

I programmi di monitoraggio, finalizzati a controllare la qualità dell'acqua lungo l'intera filiera del servizio idrico integrato, prevedono, quasi esclusivamente, l'utilizzo di analisi chimiche. Tale approccio, però, non permette di restituire un quadro completo circa la qualità della matrice analizzata, in quanto le analisi chimiche si focalizzano sulla ricerca di un gruppo ristretto di sostanze inquinanti (nella maggior parte dei casi corrispondono unicamente alle sostanze regolamentate), trascurando le eventuali interazioni che si potrebbero instaurare fra i diversi analiti. È sempre più riconosciuta, dal mondo scientifico, la necessità di prevedere un piano di monitoraggio che integri analisi chimiche e saggi ecotossicologici. Solo essi, infatti, sono in grado di valutare la tossicità complessiva dell'intera miscela, considerando eventuali effetti sinergici/additivi/antagonisti che si generano tra i diversi composti.

L'ingegnere ambientale (in ambito accademico e nel management pubblico e privato) potrebbe assumere un ruolo di collegamento tra il settore dell'ecotossicologia e quello impiantistico gestionale/normativo, con la finalità di mettere a punto e proporre nuovi modelli di monitoraggio in grado di assicurare un maggiore livello di protezione della qualità delle acque e della salute umana.

Tale approccio integrato è seguito dal nostro gruppo di ricerca per valutare la qualità di diverse matrici ambientali: acque sotterranee e sorgenti alpine, acque reflue, fanghi di depurazione, compost e liquami zootecnici. I risultati ottenuti evidenziano la necessità di strutturare piani di monitoraggio integrati.

Sebbene non esistano ancora normative che regolamentano l'utilizzo di tali strumenti ecotossicologici, in alcuni stati, come i Paesi Bassi, all'interno dei piani di monitoraggio delle aziende di distribuzione dell'acqua potabile sono già previsti saggi biologici pilota.

Come è possibile indirizzare la strategia europea verso la regolamentazione di tale approccio integrato? Si devono compiere ulteriori sforzi che consentano di: (1) aumentare la conoscenza della correlazione tra risultati dei saggi ecotossicologici e le sostanze chimiche responsabili dell'effetto misurato, (2) armonizzare la composizione delle batterie di saggi da utilizzare in funzione della matrice testata e (3) stabilire un metodo univoco per la determinazione dei cosiddetti EBTs (Effect-Based Trigger values).

INGESTIONE DI MICROPLASTICHE DA PARTE DELL'ANFIPODE SEMITERRESTRE *CRYPTORCHESTIA GARBINII* (AMPHIPODA, TALITRIDAE), QUANTIFICAZIONE ED EFFETTI SUI PROCESSI FISILOGICI.

Ciotti C.¹, Setini A.², Lecce F.¹, Iannilli V.¹

¹ENEA, Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile, Dip. Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali, C.R. Casaccia, 00123 Roma (ITALY) – e-mail: valentina.iannilli@enea.it

²Dipartimento di Biologia e Biotechnologie "Charles Darwin", Università di Roma, Sapienza, viale dell'Università, 32, 00185 Roma

La contaminazione da microplastica è un problema riconosciuto ormai a livello mondiale. Di recente, sono aumentate le indagini sull'abbondanza e la dispersione delle microplastiche nelle acque interne, tuttavia, si sa ancora poco sull'ingestione e sui loro effetti negli organismi. Questo studio mira a sviluppare un protocollo efficace per valutare l'ingestione di microplastiche da parte dell'anfipode talitride *Cryptorchestia garbinii* e verificare e valutare gli effetti biologici. Questa specie è presente nella zona sopralitorale delle acque salmastre e dolci del bacino del Mediterraneo, dell'Europa centrale e della Gran Bretagna. Essendo una specie detritivora, può ingerire piccoli frammenti plastici dispersi nell'ambiente insieme al detrito organico; l'ingestione di microplastiche in natura da parte di *C. garbinii* è stata, infatti, già dimostrata nel 2020 (Iannilli et al.).

Gli individui utilizzati negli esperimenti, campionati sulle rive del Lago Albano, sono stati esposti in condizioni di laboratorio a quattro diversi polimeri: polietilene a bassa densità (LDPE), polietilene tereftalato (PET), poliestere (PE) e polipropilene (PP). Questi polimeri sono stati forniti agli animali come alimento, introducendoli nelle Decomposition and Consumption Tablets (DECOTAB, Kampfraath, 2012), utilizzate con successo come fonte alimentare standardizzata nei test di tossicità in ambiente acquatico. Le DECOTABs, nelle 4 diverse formulazioni, sono state offerte agli esemplari di *C. garbinii* per 24h e 48h. Al termine delle esposizioni, sono state valutate le riserve energetiche andando a dosare lipidi, glucosio e glicogeno negli animali esposti. Utilizzando il colorante solvatocromico e fluorescente Nile Red, è stato, inoltre, possibile rilevare e quantificare le microplastiche ingerite, rilevate all'interno dei tubi digerenti.

I risultati mostrano chiaramente l'ingestione dei polimeri forniti tramite le DECOTABs, confermando l'utilità di queste nell'esposizione a contaminanti per ingestione. Inoltre, il dosaggio delle riserve energetiche (glucosio, glicogeno, lipidi) mostra, già dopo 24 ore di esposizione, che le microplastiche producono un effetto sul metabolismo di *C. garbinii*. Questo lavoro conferma come questa specie possa essere utilizzata come organismo modello in laboratorio nello studio dell'ingestione e degli effetti delle microplastiche, rilevabili sui processi fisiologici di questi macroinvertebrati. Inoltre, poiché *C. garbinii* vive all'interfaccia tra l'ambiente acquatico e quello terrestre, possiamo supporre un suo ruolo nell'ingresso delle microplastiche nella rete trofica e, costituendo una fonte alimentare per molti animali dei livelli trofici superiori, nel trasferimento delle microplastiche dall'acqua ai vertebrati terrestri da cui *C. garbinii* viene predata, quindi alla rete trofica terrestre.

Bibliografia

Kampfraath, A.A., Hunting, E.R., Mulder, C., Breure, A.M., Gessner, M.O., Kraak, M.H.S., Admiraal, W., 2012. DECOTAB: A multipurpose standard substrate to assess effects of litter quality on microbial decomposition and invertebrate consumption. *Freshw. Sci.* 31, 1156–1162. <https://doi.org/10.1899/12-075.1>

Iannilli, V., Corami, F., Grasso, P., Lecce, F., Buttinelli, M., Setini, A., 2020. Plastic abundance and seasonal variation on the shorelines of three volcanic lakes in Central Italy: can amphipods help detect contamination? *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07954-7>.

VALUTAZIONE DELLA POTENZIALE TOSSICITÀ DI MICROPLASTICHE DERIVANTI DA PLASMIX NEL CROSTACEO DI ACQUA DOLCE *DAPHNIA MAGNA* E SUL LOMBRICO TERRESTRE *EISENIA FETIDA*

B. De Felice^a, S. Gazzotti^{a,b}, L. Arnaboldi^b, M.A. Orteni^b, M. Parolini^a

^a Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze e Politiche Ambientali, Università degli Studi di Milano, via Celoria 26, 20133 Milano

^b Laboratorio di Materiali e Polimeri (LaMPo), Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Milano, Via Golgi 19, I-20133, Milano

e-mail: beatrice.defelice@unimi.it

Abstract Dagli anni '50 del secolo scorso la produzione, l'uso e l'importanza di polimeri plastici sono cresciuti esponenzialmente, tanto che questi materiali ricoprono un ruolo pressoché insostituibile nella nostra società. Tuttavia, a dispetto degli innumerevoli benefici socio-economici, l'inappropriata gestione del rifiuto plastico a fine vita ha contribuito al crescente manifestarsi della contaminazione ambientale da plastica. Attualmente, a livello nazionale, circa la metà del tonnellaggio di rifiuti plastici conferiti dai consumatori è destinata al riciclo, mentre la restante parte è destinata allo stoccaggio in discarica o alla termovalorizzazione. Quest'ultima frazione, costituita da una miscela complessa di plastiche non omogenee e non riciclabili definita Plasmix, rappresenta una delle principali sfide nell'ambito della gestione dei rifiuti. In un contesto di economia circolare è auspicabile trovare un'applicazione per questa miscela di plastiche miste, cercando di sviluppare approcci e/o strategie innovative da affiancare ai tradizionali canali di gestione, smaltimento e riutilizzo, con l'obiettivo ultimo di valorizzare in maniera sostenibile questo rifiuto. Un approccio innovativo consiste nel riciclo meccanico del Plasmix, il quale ambisce a modificare il complesso rifiuto plastico con l'aggiunta di opportuni additivi e generare un nuovo materiale da utilizzare nuovamente nel processo produttivo. Oltre a valutare le caratteristiche chimico-fisiche e le proprietà meccaniche di questo nuovo materiale, risulta necessario saggiarne anche la potenziale tossicità nei confronti degli organismi con cui potrebbe entrare in contatto, soprattutto a seguito di una sua degradazione o frammentazione in ambiente. Per questo motivo, il presente studio ambisce a valutare l'ingestione e la potenziale tossicità acuta e cronica indotte dall'esposizione a microplastiche derivanti dalla frammentazione di materiali a base di Plasmix, sia tal quale sia addizionato con opportuni additivi, nei confronti di un organismo di acqua dolce, il crostaceo *Daphnia magna*, e di un organismo terrestre, il lombrico *Eisenia fetida*. I risultati ottenuti dal presente lavoro hanno evidenziato come, sebbene entrambe le specie modello siano in grado di ingerire efficacemente le microplastiche, anche a concentrazioni simili a quelle che potrebbero essere riscontrate in ambiente, esse non abbiano inficiato né la sopravvivenza né il successo riproduttivo degli organismi esposti rispetto ai conspecifici di controllo. A fronte di questi risultati, sarebbe comunque opportuno applicare batterie di saggi volti a valutare i potenziali effetti sub-letali indotti dall'esposizione a microplastiche derivanti da oggetti in Plasmix in modo da implementare la valutazione ecotossicologica di questi materiali.

INDAGINI PRELIMINARI SULLA TOSSICITÀ DI MATERIALI DI PLASTICA RICICLATA E POTENZIALI RISCHI PER L'AMBIENTE MARINO

C. Mazzoli, G. D'errico, F. Iezzi, M. Orsini, L. Pittura, M. Benedetti, S. Gorbi, F. Regoli

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, via Brecce Bianche (60131), Ancona, Italy - c.mazzoli@pm.univpm.it

Abstract: In accordo col principio della *Circular Economy*, il riciclo dei materiali plastici può tradursi in una minore richiesta di materiali vergini sul mercato ed una riduzione sia delle emissioni di CO₂ che della quantità di rifiuti da smaltire. Questa buona pratica deve però affrontare una moltitudine di sfide, perché la maggior parte dei materiali e dei prodotti in plastica presenti sul mercato, non sono progettati per essere riciclati o riutilizzati, ma pensati per un uso specifico e con una limitata durabilità di vita commerciale. La promozione di un sistema di economia circolare efficiente dovrebbe condurre alla generazione di nuovi tipi di oggetti di plastica da immettere sul mercato, realizzati con materie prime di origine secondaria, derivanti da materiali riciclati o da scarti di lavorazione di vario genere. Oltre all'importante e dibattuto aspetto del sostegno alla *Green Economy*, è tuttavia necessario valutare anche il possibile impatto ambientale della plastica riciclata o dei processi stessi di riciclaggio. Infatti, così come gli oggetti di plastica tradizionale, anche quelli di plastica riciclata possono raggiungere gli ambienti più reconditi del pianeta, venendo dispersi accidentalmente o volontariamente sia in terra che in mare.

Le materie plastiche, indipendentemente dal fatto che siano o non siano riciclate, sono composte da polimeri organici e da additivi chimici (ad es. ftalati o ritardanti di fiamma), che possono essere rilasciati nell'ambiente; le plastiche disperse, oltre a rilasciare composti intrinseci, possono agire come *carrier* di contaminanti ambientali che tendono ad assorbirsi o adsorbirsi alla loro superficie, esponendo potenzialmente il biota ad un *cocktail* complesso di composti chimici.

A tale proposito, il presente studio ha la finalità di valutare, attraverso una batteria di saggi ecotossicologici, la potenziale tossicità degli elutriati ottenuti da 4 differenti materiali plastici riciclati e/o di scarto, considerati materie prime secondarie, ossia utilizzabili come risorse per la produzione di nuovi oggetti.

I 4 materiali sono stati recuperati da scarti di lavorazione aziendale (sottoforma di frammenti) e sono rispettivamente: 1) Frammenti grossolani di gomma bianca (~2cm) ottenuti da un primo passaggio di triturazione dell'oggetto originale;

2) Frammenti di gomma bianca (~0,5cm) ottenuti da un secondo passaggio di triturazione del medesimo oggetto; 3) Frammenti di palline da tennis (2mm); 4) Frammenti di soles di scarpe (2mm).

L'identificazione polimerica dei vari materiali è stata eseguita utilizzando la tecnica della spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) in riflettanza totale attenuata (ATR).

Gli elutriati sono stati ottenuti mantenendo in agitazione i frammenti di plastica in acqua di mare naturale filtrata, a temperatura ambiente (~20°C) e condizioni di luce naturale, per 72 ore. Il rapporto plastica-acqua è stato mantenuto a 50 g/L (campioni 1

- 2) o 100 g/L (campioni 3 - 4) e per evitare il disturbo meccanico delle particelle plastiche, gli elutriati sono stati filtrati (0,45

mm) prima di essere testati a diverse diluizioni.

L'effetto tossico degli elutriati è stato valutato indagando alcuni *endpoint*, quali: l'inibizione della bioluminescenza in *Aliivibrio fischeri* (Quaderno ISPRA, 4/2021), l'alterazione dello sviluppo embrionale in *Paracentrotus lividus* (Quaderno ISPRA, 11/2017) e l'inibizione della crescita della microalga *Phaeodactylum tricorutum* (UNI EN ISO 10253:2016E). I valori di LOEC, NOEC e ECx hanno permesso di valutare la tossicità relativa ai 4 materiali plastici riciclati e fare considerazioni importanti sul rischio ecotossicologico delle plastiche riciclate.

CARATTERIZZAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DI PLASTICHE PRESENTI IN RIFIUTI BIOGENICI DESTINATI AL RIUTILIZZO AGRICOLO

M. Fossati¹, S. Magni¹, R. Pedrazzani², A. Abbà³, M. Domini³, M. Menghini³, G. Bertanza³, A. Binelli¹, C. Della Torre¹

¹ Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano - marco.fossati@unimi.it

¹ Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano - stefano.magni@unimi.it

² Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Industriale, Università degli Studi di Brescia - roberta.pedrazzani@unibs.it

³ Dipartimento di Ingegneria Civile, Architettura, Territorio e Ambiente e di Matematica, Università degli Studi di Brescia - alessandro.abba@unibs.it

³ Dipartimento di Ingegneria Civile, Architettura, Territorio e Ambiente e di Matematica, Università degli Studi di Brescia - marta.domini@unibs.it

³ Dipartimento di Ingegneria Civile, Architettura, Territorio e Ambiente e di Matematica, Università degli Studi di Brescia - michele.menghini@unibs.it

³ Dipartimento di Ingegneria Civile, Architettura, Territorio e Ambiente e di Matematica, Università degli Studi di Brescia - giorgio.bertanza@unibs.it

¹ Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano - andrea.binelli@unimi.it

¹ Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano - camilla.dellatorre@unimi.it

Abstract - Il riutilizzo di rifiuti biogenici in agricoltura rappresenta una strategia in linea con i principi dell'economia circolare. Il tema della presenza di plastiche in alcune di queste matrici, testimoniata da diversi studi, è in discussione a vari livelli (nel mondo della ricerca così come nel contesto della regolamentazione e normazione). Il presente studio ha avuto come obiettivo la caratterizzazione quali-quantitativa delle plastiche presenti in matrici quali liquami di origine zootecnica (suino e bovino) stabilizzati o digeriti anaerobicamente, compost e fanghi di depurazione idonei e non al riuso in agricoltura. La caratterizzazione quali-quantitativa delle particelle plastiche è stata effettuata mediante l'utilizzo di uno spettrometro infrarosso in trasformata di Fourier (μ FT-IR) accoppiato a microscopio ottico, grazie al quale sono state indagate forma, colore, dimensione e composizione chimica dei potenziali detriti plastici presenti nei campioni. L'analisi ha evidenziato una presenza di detriti plastici variabile da 0,2 plastiche/g (peso fresco) nei liquami, fino a 11,7 plastiche/g (peso fresco) nei fanghi di depurazione, con una maggior presenza media di fibre rispetto ai frammenti, e di microplastiche rispetto alle mesoplastiche. I polimeri maggiormente presenti nei vari campioni sono risultati essere il poliestere (PEST), la gomma poliacrilica, il polipropilene (PP) e il polietilene (PE). Un caso a parte è stato quello rappresentato dal compost, dove sono state riscontrate 989,9 plastiche/g, di cui l'89% rappresentato da frammenti di plastiche biodegradabili e compostabili. Il restante 11% è rappresentato sempre da polimeri come PEST e PE. Questo studio evidenzia la presenza di plastiche nelle differenti matrici investigate sebbene con notevoli differenze tra le diverse matrici e indica l'importanza di un monitoraggio quali-quantitativo di questi materiali nei residui destinati al riutilizzo agricolo. L'intento è quello di fornire un contributo di conoscenza per indagare un tema oggi molto dibattuto e con molti aspetti controversi.

TIGRIOPUS FULVUS: ENDPOINT SUBLETALE E SCALA DI TOSSICITÀ

O. Faraponova, F. Onorati, A. Tornambe

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Via di Castel Romano, 100, 00128 Rome, Italy.
Email: olga.faraponova@isprambiente.it;

fulvio.onorati@isprambiente.it; andrea.tornambe@isprambiente.it

Abstract – *Tigriopus fulvus* (Fisher, 1860) da tanti anni si applica nell'ambito dello sviluppo e standardizzazione dei test ecotossicologici con i crostacei nell'ambiente marino. Per questa specie è stato individuato un endpoint subletale costituito dal rilascio delle mute come espressione dell'accrescimento (Faraponova *et al.*, 2005).

Nel presente studio è stata indagata la variabilità naturale del rilascio delle mute in acqua marina sintetica o naturale, allo scopo di individuare una possibile soglia di tossicità oltre la quale è possibile affermare che campioni naturali inducono alterazioni del metabolismo. Poiché tali oscillazioni naturali tra le diverse repliche delle prove effettuate possono raggiungere il 20%, tale valore potrebbe essere considerato come effect threshold per tale endpoint. Analizzando diverse matrici ambientali marine è stata osservata una differenza assoluta nel numero di mute rilasciate fino al 60%. Poiché tale effetto è stato riscontrato nei test a breve termine in assenza di mortalità, il rilascio delle mute si conferma come un buon endpoint sub letale nei, soprattutto per quei campioni ambientali che per diluizione e bassa tossicità non provocano effetti misurabili in termini di mortalità, seppur riferita allo stadio naupliare, ben più sensibile di quello adulto (Faraponova *et al.*, 2003; Faraponova *et al.*, 2016).

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DELLE MICROPLASTICHE (MPS) SUL COMPORTAMENTO NATATORIO DI DAPHNIA MAGNA.

C. Profico^{ab} *#, F. Di Giacinto^{a*}, G. Andrei^c, C. Bertolucci^c, T. Lucon-Xiccato^c, G. Mascilongo^a, F. Bellia^a, F. Conti^a, L. Di Renzo^a, G. Di Francesco^a, N. Ferri^a, C. Giansante^a

^a Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo

^b Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Teramo

^c Università di Ferrara, Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, Ferrara

*Equal contribution #Corresponding author: c.profico@lzs.it

Introduzione:

Le microplastiche (MPs) possono essere definite come un gruppo di materiali aventi diverse forme e dimensioni comprese tra 5 mm e 0.1 µm [1]. Recenti studi hanno dimostrato che negli ambienti acquatici le microplastiche possono influire negativamente sull'alimentazione degli organismi, accumularsi nella catena trofica ed essere *carrier* di sostanze tossiche [2,3]. Proprio per queste motivazioni, negli ultimi anni molteplici studi hanno analizzato i potenziali effetti dannosi di questo contaminante emergente in ambito ecotossicologico [4]. Tra i diversi organismi sentinella utilizzati in questo ambito, il principale è sicuramente il crostaceo *Daphnia magna*, organismo ampiamente utilizzato per la sua elevata sensibilità agli agenti tossici e la facilità dell'approvvigionamento e manipolazione [5].

Nel presente studio è stato valutato l'effetto delle microplastiche sul comportamento natatorio di *D. magna* esposte a microparticelle plastiche di dimensioni adeguate all'ingestione (<70 µm) [6], utilizzando tecniche di video analisi.

Materiali e Metodi:

È stato allestito un test preliminare a 24h con *D. magna*, utilizzando sospensioni di microsferi di polistirene fluorescenti da 6.00 µm (Fluoresbrite® YG Carboxylate Microspheres), da 4x10³ fino a 4 particelle/ml, in progressione geometrica da 10, per individuare il range di concentrazione da utilizzare per il test definitivo. Il test finale è stato allestito con la stessa metodica, partendo da una concentrazione di 4 fino a 4x10⁴ particelle/ml. Per ogni concentrazione sono stati utilizzati 20 daphnidi (nati da meno di 48h), posti a 20°C ± 2°C al buio per 24h. Dopo 22 ore di esposizione, i soggetti sono stati spostati all'interno dell'apparato di videotracking (DanioVision, Noldus, Wageningen, The Netherlands) per analizzare i parametri comportamentali di velocità di nuoto, distanza percorsa, tempo di immobilità, risposta agli stimoli luminosi e apprendimento per abituação nel corso delle ultime 2 ore di test mantenendo le medesime condizioni ambientali. Al termine del test, i soggetti sono stati immediatamente osservati allo stereomicroscopio con lampada UV per verificare la presenza del materiale microparticolato ingerito, procedendo poi alla digestione alcalina e successiva filtrazione su una membrana di nitrocellulosa per l'osservazione ed il conteggio delle microplastiche ingerite.

Risultati e Conclusioni:

Le daphnie sottoposte ai test preliminare e definitivo non hanno mostrato alcun caso di immobilità per tutte le concentrazioni sperimentali. Dalle analisi di videotracking è stato osservato un effetto sul comportamento natatorio delle dafnie. Nello specifico, i soggetti esposti a 4x10³ e 4x10⁴ particelle/ml hanno mostrato una diminuzione significativa della velocità di nuoto (4x10³ vs CTRL P=0.013; 4x10⁴ vs CTRL P<0.001, Tukey post-hoc test) e incremento significativo del tempo di immobilità (4x10³ vs CTRL P=0.003; 4x10⁴ vs CTRL P<0.001) rispetto al gruppo di controllo. Per quanto riguarda la distanza percorsa, l'unica differenza osservata è stata tra gli individui esposti a 4x10⁴ particelle/ml rispetto al gruppo esposto a 400 particelle/ml (P=0.006). Per quanto riguarda il test di risposta allo stimolo luminoso non sono state osservate differenze tra i gruppi, mentre al test di apprendimento per abituação è stata osservata una differenza significativa tra i gruppi esposti a 40 e 4x10⁴ particelle/ml (P=0.002, Tukey post-hoc test). In conclusione, è stato evidenziato come le microplastiche vadano ad influire sul comportamento di questi organismi, andando ad alterare la velocità di nuoto, distanza percorsa, tempo di immobilità e capacità di apprendimento.

Bibliografia:

1. GESAMP (2019). Guidelines on the monitoring and assessment of plastic litter and microplastics in the ocean [Kershaw P.J., Turra A. and Galgani F. editors], (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP/ISA Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud. GESAMP No. 99, 130p.
2. Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D. R. U., Barlaz, M. A., Jonsson, S., Björn, A., et al. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364, 2027–2045. DOI: 10.1098/rstb.2008.0284.
3. Wright, S. L., Rowe, D., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Current Biology*, 23, 1031–1033. DOI: 10.1016/j.cub.2013.10.068.
4. Browne, M. A., Galloway, T., & Thompson, R. (2007). Microplastic: an emerging contaminant of potential concern?. *Integrated environmental assessment and Management*, 3(4), 559-561. DOI: 10.1002/ieam.5630030412.
5. Alberdi, J.L., Saens, M.E., Di Marzio, W.D., Tortorelli, M.C. (1996). Comparative acute toxicity of two herbicides, paraquat and glyphosate, to *Daphnia magna* and *D. spinulata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57(2) 229-235.
6. Ebert, D. (2005). *Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in Daphnia*. US: National Center for Biotechnology Information. ISBN-10: 1-932811-06-0.

IMPIEGO DI *PARACENTROTUS LIVIDUS* (LAMARCK, 1816), *MURAENA HELENA* (LINNAEUS 1758) E *CONGER CONGER* (LINNAEUS 1758) PER *BIOASSAYE BIOMARKER* NELLE INDAGINI SUI RESIDUATI DI ORIGINE MILITARE DISPERSI SUI FONDALI DI CAPO TEULADA (CA)

L. Alcaro^a, A. De La Fuente Origlia^a, S. Di Muccio^a, P. Giordano^a, S. Giuliani^b, D. Sartori^b, E. Amato^a

^a ISPRA CN-CRE: luigi.alcaro@isprambiente.it
andeka.delafuenteoriglia@isprambiente.it
stefano.dimuccio@isprambiente.it
pierpaolo.giordano@isprambiente.it
ezio.amato@isprambiente.it

^b ISPRA CN-COS: silvia.giuliani@isprambiente.it
davide.sartori@isprambiente.it

Abstract. Il progetto “Valutazione delle esigenze di rimozione di residuati dai fondali marini prospicienti le aree addestrative di Capo Teulada (CA) e Torre Veneri (LE)” è stato concepito e condotto per contribuire alla formazione di una decisione in merito al munizionamento, esplosivo o in forma di rottame, presente sui fondali antistanti due aree deputate all’addestramento “a fuoco” di militari dell’Esercito, della Marina e dell’Aeronautica. Co-finanziato dallo Stato Maggiore dell’Esercito italiano a ISPRA – SNPA, il progetto ha contemplato la selezione e il prelievo di organismi stanziali idonei alla conduzione di indagini eco tossicologiche, incluso lo studio di *biomarker*, per accertare la possibile nocività ambientale del materiale di origine militare accidentalmente disperso sui fondali costieri. Le attività di campo e di laboratorio, condotte da personale tecnico di ISPRA e dell’Agenzia Regionale per la Protezione dell’Ambiente della Sardegna con il supporto logistico e tecnico di unità militari specializzate, hanno contemplato la selezione e il prelievo di esemplari di specie marine stanziali, atte quindi a rappresentare eventuali differenze significative nei parametri studiati imputabili a sorgenti puntuali d’inquinamento.

Gli organismi selezionati per lo studio, l’Echinaceo *Paracentrotus Lividus* (Lamarck, 1816) e i Teleostei *Muraena helena* (Linnaeus 1758) e *Conger conger* (Linnaeus 1758), sono infatti specie stanziali che per gran parte del loro ciclo vitale, si spostano restando entro ciascuna delle aree di fondale investigate, Capo Teulada, interessata dalla presenza dei residuati studiati e Capo Spartivento, individuato quale sito di riferimento. In questo poster si riassumono le motivazioni delle scelte delle tre specie, le tecniche e i modi di prelievo e conservazione dei campioni che hanno permesso di ipotizzare che quanto disperso sui fondali di Capo Teulada, solo in minima parte rappresenti una sorgente di rischio per gli habitat e le specie presenti nei tratti di mare che contornano il poligono di Capo Teulada.