

Progetto RACE-TN

Valutazione del Rischio Ambientale dei Contaminanti Emergenti nei fiumi TreNtini: effetti sulla vita selvatica e sull'uomo



Sommario

1	Finalità e obiettivi	6
2	Area di Studio	7
2.1	Il Torrente Noce	7
2.2	Il Torrente Vermigliana.....	9
2.3	Il Rio Presena	10
2.4	I siti di indagine	11
3	Contaminanti emergenti selezionati	24
3.1	Ibuprofene	24
3.2	Furosemide	25
3.3	Trimethoprim	26
3.4	Sucralosio.....	27
3.5	Tonalide.....	28
3.6	Triclocarban	29
3.7	Boscalid.....	30
3.8	Captan.....	31
3.9	Chlorpyrifos	32
3.10	Metolachlor	33
3.11	Terbutilazina.....	34
3.12	WP1 - Determinazione e quantificazione dei CE (UNIMIB; Sara Villa)	36
3.12.1	Obiettivo 1.1: Sviluppo di un indice per la classificazione della pericolosità dei CE (novembre 2015-febbraio 2016).....	36
3.12.2	Obiettivo 1.2: Messa a punto di una metodica analitica (marzo 2016-luglio 2016).....	53
3.12.3	Obiettivo 1.3: Analisi chimica dei campioni (settembre 2016-febbraio 2017)	58
3.12.4	Analisi del mercurio totale nei sedimenti (novembre 2016) (analisi eseguite dalla dott.ssa Laura Marziali, CNR-IRSA Istituto di Ricerca Sulle Acque, S.S. Brugherio, MB)	75
3.13	WP2 (I anno) - Diversità e struttura delle comunità procariotiche ed eucariotiche tramite analisi del metagenoma ambientale (UNIBZ; Lorenzo Brusetti)	77
3.13.1	Obiettivo 2.1-2.3: Setup della metodologia di campionamento (novembre 2015-dicembre 2015; campionamento febbraio e luglio 2016)	77
3.13.2	Obiettivo 2.2: Setup delle metodologie di laboratorio (novembre 2015-febbraio 2016) ed Estrazione del DNA metagenomico (Obiettivo 2.4) (marzo e settembre 2016).....	78
3.13.3	Obiettivo 2.5: Fingerprinting ARISA (marzo-maggio 2016 e settembre-ottobre 2016)	80
3.13.4	Obiettivo 2.6: Shotgun Metagenome Sequencing (ottobre 2016)	85
3.13.5	Obiettivo 2.8: Real Time PCR per quantificazione carica batterica (marzo 2016-ottobre 2016)	87

3.14	WP2 (II anno) - Valutazione degli effetti di miscele di contaminanti emergenti (CE) sulla componente microbica (resp. dott.ssa Valeria Di Nica, UNIMIB).....	89
3.14.1	Obiettivo 1. Valutazione degli effetti degli effluenti provenienti dal depuratore di Passo del Tonale secondo l'approccio "whole-mixture" (marzo – ottobre 2017)	89
3.14.2	Obiettivo 2. Valutazione degli effetti di miscele di contaminanti potenzialmente scaricati con gli effluenti del depuratore di Passo del Tonale secondo l'approccio "component-based mixture" (marzo – ottobre 2017).....	95
3.15	WP3 - Effetti eco-genotossici sulla comunità dei macroinvertebrati (MUSE; Valeria Lencioni)	107
3.15.1	Obiettivo 3.1: Allestimento degli acquari e messa a punto di un protocollo di allevamento (ottobre 2015-gennaio 2016)	107
3.15.2	Obiettivo 3.2: Struttura e caratteristiche funzionali della comunità di macroinvertebrati (dicembre 2015-marzo 2017; ottobre-novembre 2017).....	108
3.15.3	Obiettivo 3.3: Test di tossicità acuta (febbraio 2016-aprile 2016, giugno-luglio 2016)	135
3.15.4	Obiettivo 3.4: Test di genotossicità (febbraio 2016-aprile 2016, settembre 2016, febbraio-marzo 2017).....	159
3.15.5	Obiettivo 3.5: Valutazione di stress ossidativo da chlorpyrifos in <i>Diamesa</i> spp. (settembre 2016-febbraio 2018).....	193
3.15.6	Obiettivo 3.6: Valutazione di effetti sub-letali (comportamento) di invertebrati esposti a CE (in collaborazione con UNIMIB, dott.ssa Sara Villa, dott.ssa Valeria Di Nica, dott.ssa Tanita Pescatore)	202
3.15.7	Obiettivo 3.7: Analisi di bioaccumulo: Obiettivo 3.7.A: Analisi di bioaccumulo di farmaci in 10 taxa di macroinvertebrati (analisi a cura della dott.ssa Sara Castiglioni, Istituto Mario Negri di Milano); Obiettivo 3.7.B: Analisi di elementi in traccia in acqua e in <i>Diamesa</i> spp (analisi a cura del dott. Paolo Gabrielli, Ohio University, USA)	226
3.15.8	Obiettivo 3.8 Analisi dei dati e integrazione con i risultati degli altri WP (ottobre 2015-aprile 2018)	242
3.16	WP4 – Incidenza di chitridiomicosi in popolazioni di anfibi in prossimità di depuratori (MUSE; Michele Menegon)	243
3.16.1	Obiettivo 4.1 Studio delle popolazioni di anfibi nei siti di indagine (aprile-agosto 2016)	243
3.16.2	Obiettivo 4.2 Analisi dell'incidenza di chitridiomicosi (aprile-agosto 2016; aprile-ottobre 2017)	243
3.17	WP5 – Danno genotossico in linee cellulari umane provocati da contaminanti emergenti (CNR-IBF)	249
3.17.1	Obiettivo 5.1 High Content Screening per la determinazione della maggior tossicità di CE e/o miscele di CE in cellule umane mediante labelling metabolico e saggi genotossici	250

3.17.2	Obiettivo 5.2 Identificazione di alterazioni dell'espressione genica in cellule umane dopo trattamento con CE mediante Next Generation Sequencing (NGS)	258
3.17.3	Obiettivo 5.3 Validazione degli effetti provocati da CE in cellule umane dopo trattamento con CE	262
3.18	WP6 - Divulgazione e sensibilizzazione (resp. MUSE e APSS)	266
3.18.1	Obiettivo 6.1: divulgazione dei risultati del progetto alla comunità scientifica	267
3.18.2	Obiettivi 6.2-6.3: Dialogo con i portatori di interesse (stakeholders) e la cittadinanza (Obiettivo 6.2), Sensibilizzazione dell'opinione pubblica sulla tematica dei contaminanti emergenti (Obiettivo 6.3)	272
4	Bibliografia	278
5	Riflessioni conclusive	294
	Appendice 1 – Grafici di sopravvivenza e Curve di Weibull	298

1 Finalità e obiettivi

I contaminanti emergenti (CE) sono composti di sintesi (es. farmaci e prodotti per l'igiene personale) presenti nell'ambiente in basse concentrazioni da diversi decenni, ma solo recentemente considerati sostanze inquinanti. Vengono definiti anche come contaminanti di nuova generazione.

RACE-TN è il primo progetto di ricerca multidisciplinare sui CE che ha come caso studio una valle alpina e un corpo idrico trentino. L'obiettivo generale è quello di valutare gli effetti di alcuni CE, selezionati tra quelli rinvenuti nei siti di indagine, sulle comunità microbiche fluviali e gli invertebrati acquatici, sugli anfibi e sull'uomo (linee cellulari umane).

I siti di indagine sono stati scelti nel bacino del Torrente Noce, un corso d'acqua che scorre in valli urbanizzate (la val di Sole e la val di Non) su cui insistono diversi impatti antropici associabili all'emissione nell'ambiente di CE (turismo, agricoltura, un ospedale). I periodi di campionamento scelti, l'inverno (quando si ha la massima affluenza turistica al Tonale) e l'inizio estate (quando si ha la massima diluizione da precipitazioni e disgelo), sono strategici per mettere in evidenza l'impatto da turismo invernale¹. In particolare sono stati scelti due siti, uno a monte e uno a valle dell'impianto di depurazione a Passo del Tonale (che tratta reflui civili) sul Torrente Vermigliana, uno dei tributari di alta quota del Noce. Più in quota è stato scelto un sito sul Rio Presena², alimentato dalle acque di fusione dell'omonimo ghiacciaio. Un quarto sito è stato scelto sul Noce in un tratto alcuni km a valle dell'impianto di depurazione di Campodoglio, a Mezzolombardo, che tratta anche reflui agricoli.

Tra i risultati applicativi lo sviluppo di nuovi protocolli analitici per l'analisi dei CE in traccia e la messa a punto di un nuovo Indice di Classificazione dei CE sulla base del rischio ambientale per la comunità acquatica, l'identificazione di biomarcatori utili nel monitoraggio di contaminazione da CE, la proposta di concentrazioni limite nell'ambiente di CE e di nuove linee guida per la gestione degli impianti di depurazione. Il progetto vuole inoltre aumentare la sensibilità pubblica (enti locali, gestori delle risorse idriche, scuole, cittadini) sulla problematica dei CE in Trentino, quindi su temi quali la salvaguardia dell'ambiente e l'uso sostenibile della risorsa idrica.

Nel presente report vengono descritti i risultati ottenuti, con grafici e tabelle, in lingua inglese se già predisposti per pubblicazioni su riviste internazionali.

¹ Nella proposta originale la seconda data di campionamento era l'autunno. Si è ritenuto in seguito più opportuno scegliere come secondo periodo l'inizio dell'estate ovvero il periodo in cui è attesa una bassa concentrazione ambientale di CE, per lo meno inferiore a quella invernale al Tonale

² Nella proposta originale il quarto sito era stato individuato sul Torrente Noce a Mezzana, sostituito a inizio progetto dal sito sul Rio Presena perché considerato, il primo, dopo un'indagine preliminare, ridondante con gli altri tre. Inoltre, il Rio Presena consentiva di valutare una eventuale contaminazione da pesticidi a media-lunga distanza dalle aree agricole come già osservato in altri sistemi glaciali alpini

2 Area di Studio

L'area di studio è compresa nel bacino idrografico del Torrente Noce, che attraversa la Val di Sole e la Val di Non, nel Trentino Nord-Occidentale, prima di diventare tributario del fiume Adige a pochi chilometri a nord di Trento (Figura 1). In Alta Val di Sole sono stati presi in considerazione due tributari del Torrente Noce, il Torrente Vermigliana (due siti, PTm e PTv) e il Rio Presena (sito PR0), alimentato dalle acque di fusione dell'omonimo ghiacciaio. Nel fondovalle è stato scelto un sito sul Torrente Noce a monte dell'impianto idroelettrico di Mezzocorona (Figura 1), nel comune di Mezzolombardo (ML).

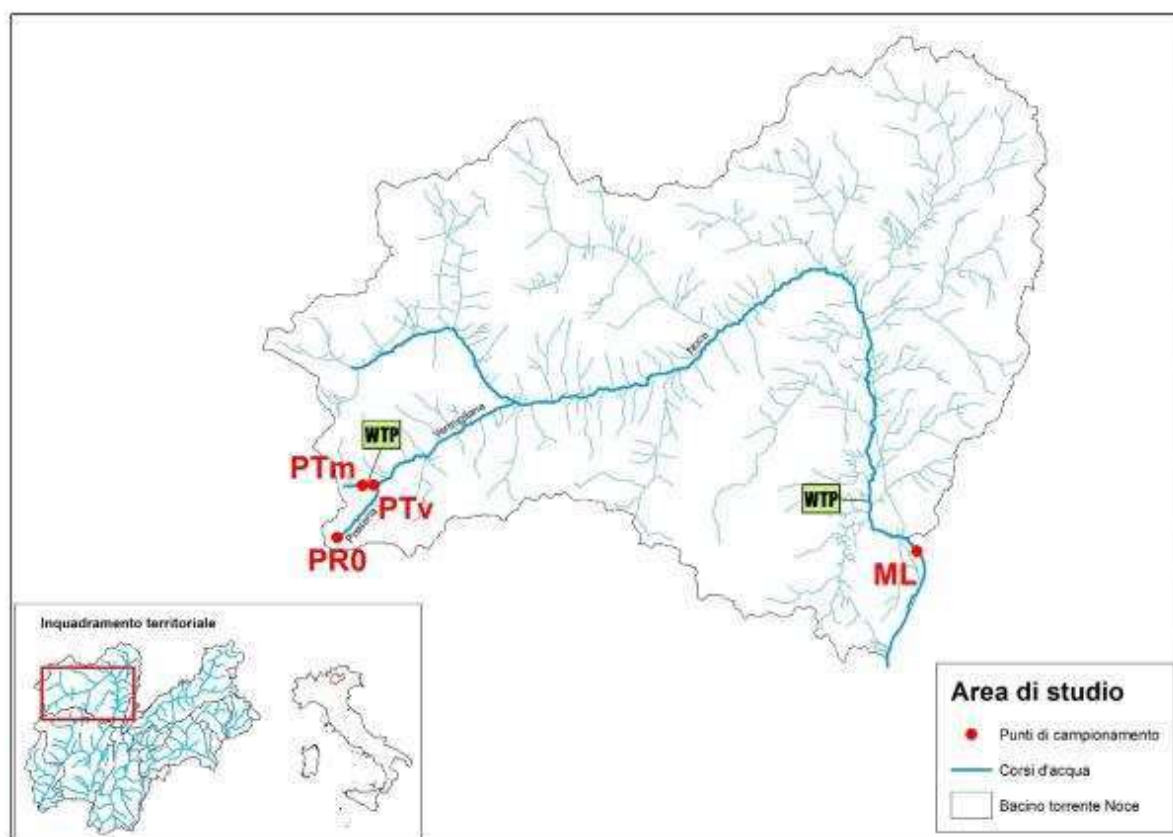


Figura 1 - Inquadramento geografico del bacino idrografico del fiume Noce; evidenziati in azzurro i percorsi del Rio Presena, del Torrente Vermigliana e del Torrente Noce. PR0= stazione sul Rio Presena; PT= Passo Tonale, Torrente Vermigliana, PTm= stazione a monte del depuratore, PTv= stazione a valle del depuratore, ML= stazione sul Torrente Noce presso Mezzolombardo. Con il simbolo WTP sono indicati sistemi di trattamento delle acque in prossimità delle stazioni di campionamento.

2.1 Il Torrente Noce

Il Torrente Noce nasce in due rami principali, il torrente Noce Nero, ed il torrente Noce Bianco nel gruppo montuoso Ortles Cevedale. Il corso principale misura 82 km e il bacino idrografico copre un'area di 1367 km². Il Noce Nero nasce in Val di Pejo sul Corno dei Tre Signori a quota 3360 m, dopo 15 km forma il lago artificiale di Pian Palù. Il Noce Bianco nasce come torrente glaciale dal fronte della Vedretta de la Mare, a circa 2690 m s.l.m. (nel 2010), nella discesa verso Cogolo riceve le acque di diversi tributari

non-glaciali (es. Rio Larcher) e glaciali (es. Torrente Vedretta Rossa) e poco prima del bacino di Malga Mare, l'emissario della diga del Careser, a circa 2000 m s.l.m. A valle di Cogolo, il fiume prende il nome Noce, e scorre lungo la Val di Sole e la Val di Non, sfociando nel Fiume Adige nei pressi dell'abitato di Zambana, a Nord di Trento.

Lungo il suo tragitto nelle due Valli il Noce riceve vari affluenti; tra questi i principali (corsi d'acqua tipizzati) sono, in sinistra orografica, il rio Corda, il torrente Rabbies, i torrenti Barnes e Pescara, che si immettono direttamente nel lago di S. Giustina, il torrente Novella, il rio S. Romedio, il rio Pongaiola e il torrente Rinascico. In destra orografica il Noce riceve le acque del Torrente Vermigliana, principale affluente della parte alta del suo corso; altri affluenti importanti sono il rio Foce di Valle Fazzon, il torrente Meledrio, il rio Ribosc, il torrente Tresenica, il rio di Denno, il torrente Lovernatico e il torrente Sporeggio.

Il suo bacino, chiuso alla confluenza con il fiume Adige presso Zambana, è costituito principalmente dai territori della Val di Sole e della Valle di Non prima di entrare nella Valle dell'Adige. L'area del bacino è suddivisa in foreste per il prelievo di legname (56.5%), roccia nuda (16.4%), pascoli (15.4%), campi coltivati (6.2%) e aree urbane (2.8%). L'area rimanente è coperta da corpi idrici e ghiacciai. Il clima è freddo e piovoso con una temperatura media annuale di 3.9°C e precipitazioni medie annuali di 1172 mm, queste medie sono state estrapolate dai dati del periodo compreso tra il 1970 e il 2000 (Majone et al., 2016). Lungo il suo percorso si trovano cinque grandi impianti idroelettrici: Malga Mare, Cogolo1, Cogolo2, Taio e Mezzocorona (Figura 2). La produzione energetica di queste cinque centrali è regolata da altrettanti serbatoi: Careser, Pian Palù, Malga Mare, S. Giustina e Mollaro. Questi bacini di regolazione e stoccaggio dell'acqua devono garantire un deflusso minimo vitale (DMV) per soddisfare la richiesta d'acqua dei territori a valle e mantenere la funzionalità ecologica del fiume. Due piccole centrali idroelettriche si trovano all'estremità delle riserve di S. Giustina e di Mollaro e sfruttano l'energia prodotta dal DMV. Oltre a queste grandi centrali, il bacino del Noce viene intensamente sfruttato attraverso un gran numero di piccoli prelievi associati a vari usi: per far funzionare piccoli impianti "ad acqua fluente", per usi agricoli, civili e industriali (Majone et al., 2016).

Il bacino del Noce è un territorio soggetto a numerosi fattori di stress. Oltre alla produzione di energia idroelettrica, vi sono l'agricoltura intensiva e il turismo (Chiogna et al., 2014).

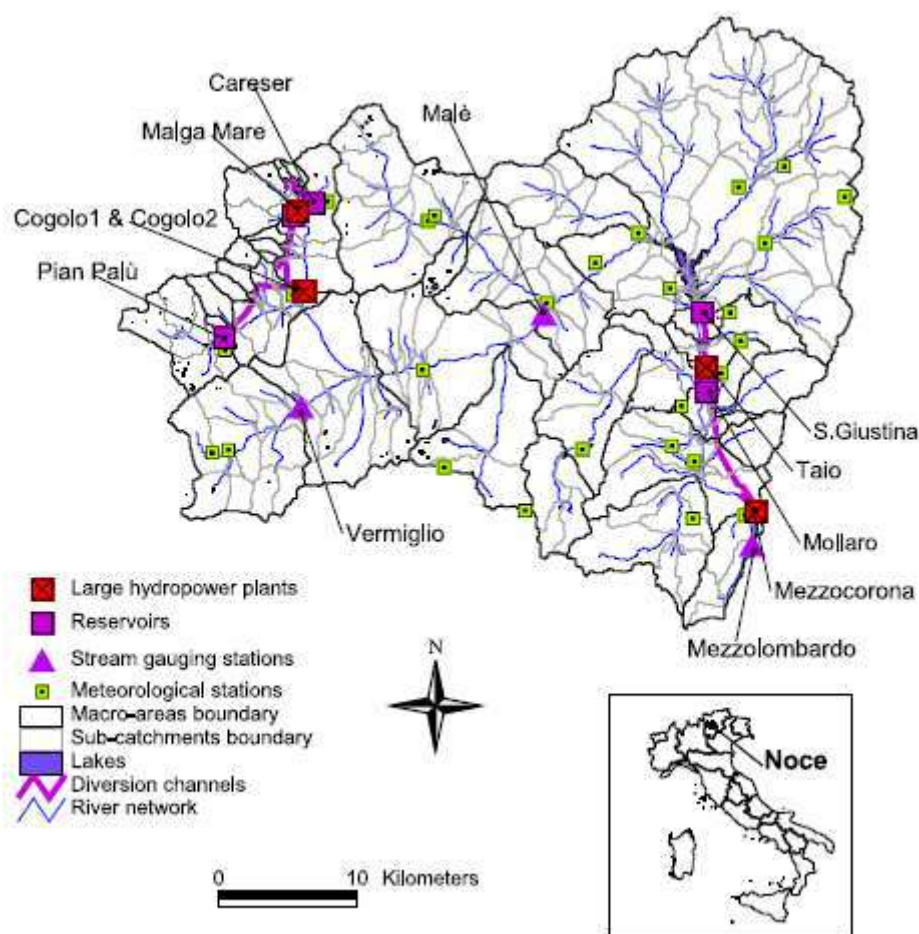


Figura 2 - Il bacino idrografico del Torrente Noce, con indicate le cinque maggiori centrali idroelettriche e i corrispondenti bacini; sono anche indicate le stazioni di monitoraggio meteorologico e del flusso idrico (mod. da Majone et al., 2016).

2.2 Il Torrente Vermigliana

Il Torrente Vermigliana è un tributario del Torrente Noce. Nasce dal Passo del Tonale (1882 m slm) da cui scende verso Nord-Est lungo la valle del Vermiglio fino a confluire nel Noce nei pressi di Ossana (ca 950 m slm). Il suo bacino idrografico è compreso tra i massicci Ortles-Cevedale a Nord e l'Adamello-Presanella a Sud (Figura 3). Nel settore centrale del suo corso riceve l'apporto del rio Presena e del rio Presanella.

Il bacino idrografico del Torrente Vermigliana copre un'area di 104 km² tra i 950 e i 3558 m slm, della Cima del Presanella. Sul torrente insiste un'unica centrale idroelettrica di tipologia "ad acqua fluente" che altera la tempistica di deflusso dell'acqua solo dall'ingresso alla restituzione a valle della centrale elettrica (Chiogna et al., 2014).

Il corso principale del torrente Vermigliana ha una lunghezza di 14 km e una pendenza media dell'1%. I dati storici, registrati dalla stazione di misurazione di Vermiglio mostrano una grande variabilità stagionale nelle portate del torrente, con medie nel lungo periodo di 4.5 m³/s e 1 m³/s, rispettivamente in estate e inverno. Il clima è freddo e piovoso, con una temperatura media annuale di 2.9°C e precipitazioni medie annue di

1440 mm, che, durante l'inverno, sono costituite essenzialmente da neve (Chiogna et al., 2014)

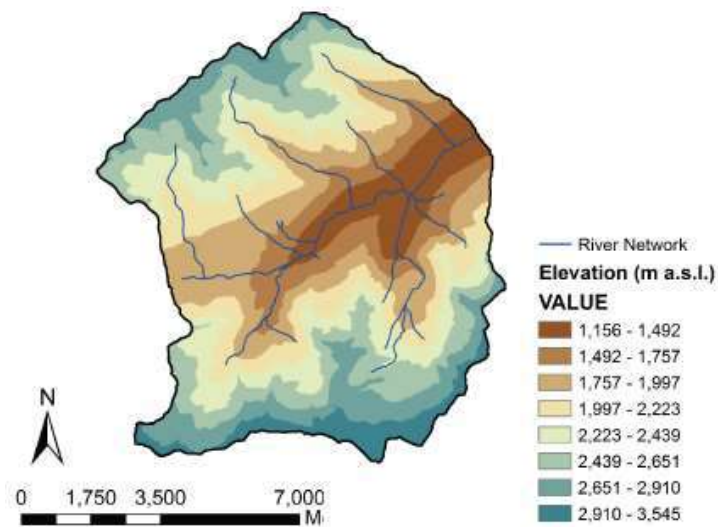


Figura 3 - Bacino idrografico del Torrente Vermigliana (Cano Paoli, 2016).

2.3 Il Rio Presena

Il Rio Presena è il torrente glaciale che nasce sul fronte destro dell'omonimo ghiacciaio (Figura 4, Figura 5). Dopo aver percorso 3,36 km (<http://www.alpiorientali.it/>) lungo la Val Presena, confluisce nel torrente Vermigliana. Si tratta di un tratto tipicamente criale (Ward, 1994).

Il contributo percentuale medio del Rio Presena alla portata del torrente Vermigliana, a livello della loro confluenza, è del 75%. Il suo contributo non è significativo solo durante l'estate, nel periodo di fusione del ghiacciaio, ma anche durante l'inverno, quando il suo apporto arriva anche al 90% (Chiogna et al., 2014).

Il ghiacciaio Presena Occidentale (codice CGI 684; coordinate: 46° 13' 23" N; 10° 34' 54" E) è situato nelle Alpi Retiche Meridionali, nel gruppo Adamello-Presanella ed è compreso nel bacino idrografico Vermigliana-Noce-Adige. È un piccolo ghiacciaio montano (0.26 km² al 2011) che si estende tra i 2700 e i 3000 m.s.l.m. (Grossi et al., 2013) (Figura 4) (Diolaiuti et al., 2010; Smiraglia & Diolaiuti, 2015).

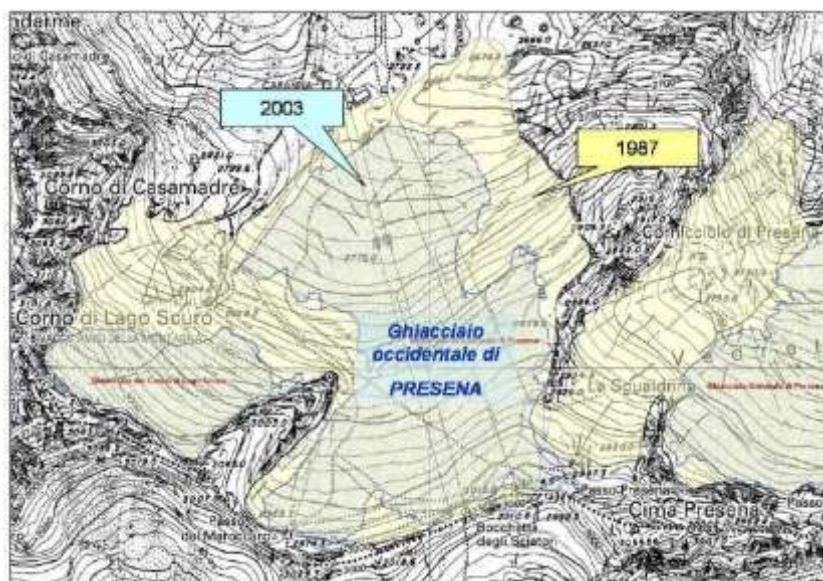


Figura 4 - Ghiacciaio Presena. Confronto tra la superficie del 1987 (ghiacciaio ancora unico) e il 2003 (ghiacciaio suddiviso nelle due porzioni) (Trenti, 2011).

Dal 1987 ad oggi la sua superficie si è ridotta notevolmente, passando da 68 ha a 41 ha nel 2003, anno in cui si è diviso in due porzioni, quella del Presena Occidentale (33 ha) e una più piccola denominata “del Corno del Lago Scuro” (8 ha). Nel 2011 la superficie del Presena Occidentale era di 26 ha, mentre quella “Del Corno del Lago Scuro” era di soli 6 ha (Diolaiuti et al., 2010; Trenti, 2011).



Figura 5 - Ghiacciaio Presena. In evidenza la fronte da cui nasce il Rio Presena (la stazione PR0 è stata scelta a monte del piccolo bacino di sedimentazione (Foto © MUSE).

2.4 I siti di indagine

In Tabella 1 sono elencati i 4 siti di indagine. Il sito più in quota si trova sul Rio Presena a 2685 m s.l.m. (PR0) a pochi metri dalla fronte del ghiacciaio Presena Occidentale. PTm e PTv si trovano rispettivamente a circa 100 m a monte e 20 m a valle dell'impianto di depurazione del Passo del Tonale (46.260031°N; 10.604832°E; 1799 m s.l.m., comune

di Vermiglio), a circa 1800 m di quota. Si tratta di un piccolo depuratore che serve la stazione turistica invernale ed estiva del Passo del Tonale dal 2002 e presenta una capacità di 10000 Abitanti Equivalenti (<https://adep.provincia.tn.it/Impianti-di-depurazione-biologica>). ML è la stazione di fondovalle, a 221 m di quota, sul Torrente Noce alcuni km a valle dell'impianto di depurazione di Campodenno (46.250134 °N; 11.057782 °E; 262 m s.l.m.). Questo depuratore, attivo dal 2005, presenta una capacità di 20000 Abitanti Equivalenti, serve vari comuni ed è associato a diverse stazioni di sollevamento (<https://adep.provincia.tn.it/Impianti-di-depurazione-biologica>).

Tabella 1 - Localizzazione delle quattro stazioni di campionamento; coordinate definite attraverso il sistema WGS84 GPS. Quota= m s.l.m.

STAZIONE	CORSO D'ACQUA	QUOTA	COORDINATE	
PR0	Rio Presena	2685	N46°13.596' E010°34.929'	
PTm	Torrente Vermigliana	1792	N46°15.566' E010°36.271'	
PTv	Torrente Vermigliana	1790	N46°15.580' E010°36.330'	
ML	Fiume Noce	221	N46°13.147' E011°06.125'	



Figura 6 - Depuratore di Passo Tonale (sinistra) e di Campodenno (destra).

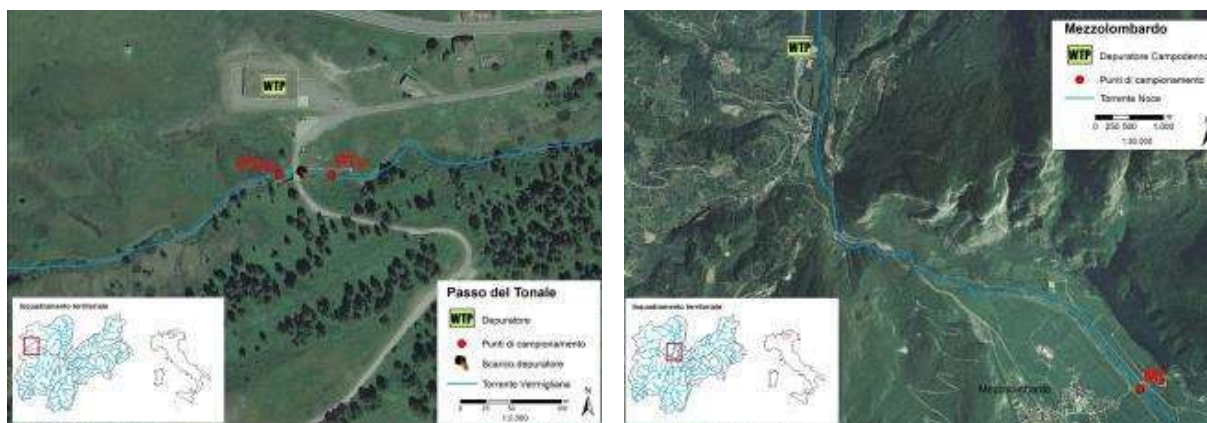


Figura 7 - Sinistra: Inquadramento del Passo del Tonale, Vermiglio (TN). Sono evidenziati i punti di campionamento (PTm e PTv), il depuratore del Passo del Tonale e il suo scarico nel Vermigliana. WTP= depuratore del Passo del Tonale. Destra: Inquadramento geografico di Mezzolombardo (TN). In rosso il sito di campionamento (ML). WTP= depuratore di Campodeno.

Per l'analisi delle popolazioni di anfibi presenti all'interno del bacino idrografico del Torrente Noce sono stati scelti 18 siti che ricoprissero in maniera quanto più efficace la superficie e l'intervallo altitudinale dell'area di studio e che fossero nei pressi di impianti di depurazione (Figura 8). Tra i criteri di scelta è stato considerato l'Indice di Funzionalità Fluviale attribuito ai diversi tratti dei torrenti (APPA 2012), privilegiando, sulla base delle caratteristiche vegetazionali delle rive risultanti dall'applicazione dell'Indice da parte dell'Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente, alcuni tratti con buona funzionalità in grado di garantire habitat idonei agli anfibi. Sui 18 siti scelti, 9 si trovano lungo il corso del Torrente Noce, dei quali, 2 si trovano in Piana Rotaliana, 3 si trovano in Val di Non, rispettivamente a valle e a monte del Lago di S. Giustina, 2 si trovano in Val di Sole, presso Malè e presso il depuratore di Mezzana e 2 si trovano in Val di Pejo presso il Lago di Pian Palù. I rimanenti 9 siti si trovano distribuiti sui principali affluenti del Noce, Torrente Sporeggio, Torrente Rinascico, Torrente Tresenica, Torrente San Romedio, Torrente Novella, Torrente Barnes, Torrente Rabbies, Torrente Meledrio e Torrente Vermigliana.



Figura 8 – Localizzazione dei siti di rilevamento anfibi.

La posizione del punto di prelievo è stata registrata mediante strumenti di posizionamento satellitare (Global Position System, GPS) ed è riassunta nella Tabella 2.

Tabella 2 – Elenco dei siti di rilevamento degli anfibii.

Nome	Coordinate geografiche
BARN025	N46° 25.204' E10° 56.568'
MELE009	N46° 17.691' E10° 52.365'
NOCE005-Biotopo Rupe	N46° 11.479' E11° 05.822'
NOCE008-Ponte della Fosina	N46° 13.132' E11° 06.106'
NOCE012-Botopo Rocchetta	N46° 14.830' E11° 03.542'
NOCE027	N46° 20.262' E11° 03.450'
NOCE031	N46° 23.569' E11° 00.672'
NOCE066	N46° 20.143' E10° 54.014'
NOCE093	N46° 19.005' E10° 48.825'
NOCE117	N46° 19.769' E10° 42.614'
NOCE142	N46° 20.269' E10° 36.922'
NOVE004	N46° 24.377' E11° 05.195'
RABB037	N46° 26.436' E10° 45.974'
RINA004	N46° 15.707' E11° 04.957'
SPOR033	N46° 11.524' E10° 59.808'
SROM015	N46° 23.267' E11° 07.648'
TRES026	N46° 15.830' E10° 57.212'
VERM037	N46° 15.549' E10° 36.162'

NOCE005 - RISERVA NATURALE PROVINCILAE “LA RUPE” (IT3120054)

Il sito si trova all'interno dell'area protetta denominata “La Rupe”, situata a sud dell'abitato di Mezzolombardo. L'area, delle dimensioni di 42 ha circa e posta a 210 m s.l.m., rientra nella rete di Riserve Naturali Provinciali e nella Rete Natura 2000 come ZSC (Zona Speciale di Conservazione).

L'origine del Biotopo è dovuta alle opere di sistemazione idraulica realizzate nel secolo scorso dall'Amministrazione Statale Austro-ungarica: il corso del torrente Noce, che un tempo raggiungeva il fiume Adige all'altezza dell'abitato di San Michele, venne deviato a sud dell'abitato di Mezzolombardo attraverso un nuovo alveo lungo circa 7 chilometri e rivestito interamente di pietrame. Nel 1926, in coincidenza di una piena, il Noce ruppe l'argine destro assestandosi nel nuovo letto, parallelo a quello artificiale, ove scorre tuttora.

Oggi il biotopo costituisce uno degli ultimi lembi dell'antico paesaggio fluviale che caratterizzava la Val d'Adige e la Piana Rotaliana. Questi ambienti umidi sono divenuti assai rari, soprattutto a causa delle profonde alterazioni provocate dalle bonifiche.

Il punteggio IFF in questo tratto di torrente è di II-III per la sponda destra e di III per quella sinistra (APPA, 2012). Il biotopo comprende ambienti diversificati che presentano differenti condizioni per la vita di piante ed animali: il corso d'acqua con ampie anse, meandri, pozze e lame d'acqua; le rive caratterizzate da campagne e da vegetazione ripariale con salici (diverse specie di *Salix*) e pioppi (diverse specie di *Populus*), ontani (*Alnus sp.*) ed erbeacee igrofile.

Il popolamento ittico è rappresentato da varie specie, alcune delle quali divenute ormai rare in Trentino a causa dell'alterazione dei corsi d'acqua. Lungo il torrente nidificano uccelli tipici delle zone umide, come il germano reale (*Anas platyrhynchos*), il martin pescatore (*Alcedo atthis*), l'usignolo di fiume (*Cettia cetti*) e uccelli di ripa, come il piro piro piccolo (*Actitis hypoleucos*). I lembi di bosco ripariale sono frequentati da alcune specie di rettili, vari uccelli e mammiferi, che qui trovano rifugio e possibilità di alimentazione. La presenza di pareti rocciose e di aree aperte adatte alla caccia favoriscono la presenza di uccelli da preda sia diurni che notturni, come i rari falco pellegrino (*Falco peregrinus*) e gufo reale (*Bubo bubo*).

I principali fattori di minaccia dell'area sono: l'attività estrattiva localizzata ai piedi delle pareti rocciose che provoca alterazioni della falda detritica e il traffico di automezzi lungo le carrarecce, oltre alle piccole discariche di inerti nell'area a bosco (Aree protette TN, 2012).

Tra gli anfibi nel biotopo sono segnalati l'ululone dal ventre giallo (*Bombina variegata*), il rospo comune (*Bufo bufo*), il rospo smeraldino (*Bufo viridis*), *Rana dalmatina*, *Rana temporaria* e rane verdi della specie *Pelophylax ridibundus*.

Nelle ricerche effettuate durante il mese di marzo 2016 sono stati osservati, anche di sera, diversi esemplari di *Rana dalmatina* in attività riproduttiva.

Circa 20 esemplari sono stati osservati in acqua, nei prati adiacenti agli stagni realizzati per gli anfibi e presso alcune lagune di fitodepurazione. Gli habitat più utilizzati per le deposizioni sono gli stagni artificiali con il fondo in argilla, purtroppo in alcuni di questi bacini sono stati introdotti pesci (persico sole e altre specie n.d.). A stagione più avanzata presso gli stagni sono state osservate decine di rane verdi in canto appartenenti alla specie *Pelophylax ridibundus* e non sono stati più rilevati esemplari di

Rana dalmatina. Il successo riproduttivo di quest'ultima sembra subire la sintopia con le rane verdi e la presenza dei pesci. Durante i sopralluoghi non sono state invece rinvenute le altre specie segnalate per il biotopo (ululoni dal ventre giallo, ecc.). Nel sito è stato inoltre osservato un esemplare giovane di biscia tessellata (*Natrix tessellata*) e un biacco di grosse dimensioni (*Hierophis carbonarius*).

NOCE008 - PONTE DELLA FOSINA (CENTRALE IDROELETTRICA DI MEZZOCORONA)

Il sito si trova nei pressi del ponte della Fosina, che "unisce" l'abitato di Mezzolombardo a quello di Mezzocorona in Piana Rotaliana.

Il tratto a monte della centrale di Mezzocorona è stato rinaturalizzato negli anni '90 con la costruzione di buche di curva, alternate a raschi e zone piatte e con la piantumazione di ontani e salici. Lo scarico della centrale EDISON restituisce al Noce l'originaria portata, ma solo di giorno, quando sono in funzione le turbine; durante la notte e nei fine settimana in alveo continua a scorrere solamente la frazione d'acqua proveniente dalla Rocchetta, che nelle estati più siccitose risulta a malapena sufficiente per coprire le richieste di derivazione ad uso irriguo.

In questo tratto del Noce, lungo più di tre chilometri, è presente una popolazione riproduttiva di rane verdi *Pelophylax ridibundus*, comprendente decine di esemplari di diverse classi di età (compresi individui molto grandi). Gli habitat utilizzati sono i rami secondari del Torrente Noce, con acqua ferma o mediamente corrente, e per la deposizione le zone di acqua lenticale come fossati e laghetti di piena.

Nel corso delle ricerche lungo questo tratto è stato osservato anche un esemplare adulto di *Rana temporaria* e un rospo comune (*Bufo bufo*) adulto.

Descrizione dei siti di campionamento in Val di Non

NOCE012 – RISERVA NATURALE PROVINCIALE “LA ROCCHETTA” (IT3120061)

Il sito è all'interno della Riserva Naturale Provinciale “La Rocchetta”, un'area protetta di circa 88 ha posta a 250 metri di quota nella porzione più bassa della Val di Non.

L'origine del Biotopo è complessa ed è legata all'azione dei corsi d'acqua presenti. In questa zona il flusso del Noce è fortemente rallentato dalla scarsa pendenza della valle, il che facilita il deposito dei materiali trasportati dall'acqua; ne risulta che il torrente scorre, fin dall'altezza della stazione di Denno, sopra i suoi depositi alluvionali, ai quali si aggiungono quelli dei corsi d'acqua tributari, il Torrente Lovernatico e il Torrente Sporeggio in riva destra ed il Torrente Rinascico in riva sinistra. Questi tributari concorrono sensibilmente all'apporto idrico dell'area rendendo questo fondovalle assai ricco di acque.

L'attuale configurazione del territorio è in parte dovuta all'intervento dell'uomo. Nel 1922, infatti, il corso del Torrente Noce è stato artificialmente sbarrato con una piccola diga per finalità idrauliche posta all'inizio della forra della Rocchetta. Così si è innalzato il livello dell'acqua a monte, ed il corso del Noce si è allargato in un bacino allungato e poco profondo denominato “Lago della Rocchetta”. Tuttavia, a causa del grande apporto alluvionale dei corsi d'acqua che andava rapidamente colmando il bacino, il progetto è stato abbandonato.

Oggi il biotopo della "Rocchetta" è un ambiente fluviale e perifluviale di fondovalle, protetto a partire dal 1986, che rientra anche nella Rete Natura 2000 come ZSC (Zona Speciale di Conservazione) e ZPS (Zona di Protezione Speciale).

I lembi di bosco ripariale sono costituiti da salici (soprattutto *Salix alba*) e ontani (*Alnus incana* e *Alnus glutinosa*); essi formano delle strisce a fregio del corso d'acqua, talvolta assai sottili, ma nel complesso ben conservate. È presente un'abbondante vegetazione ripariale erbacea e arbustiva che svolge una preziosa funzione di "filtro" nei confronti del disturbo. La presenza di acqua semistagnante favorisce lo sviluppo della cannuccia di palude (*Phragmites australis*), che crea dei fitti canneti.

Il biotopo ospita numerose specie di pesci, rettili e uccelli, che vi nidificano, tra cui entità poco comuni legate all'acqua: il germano reale (*Anas platyrhynchos*), la gallinella d'acqua (*Gallinula chloropus*), la folaga (*Fulica atra*), il martin pescatore (*Alcedo atthis*), il merlo acquaiolo (*Cinclus cinclus*), l'usignolo di fiume (*Cettia cetti*) e la cannaiola verdognola (*Acrocephalus scirpaceus*). La zona funge anche come area di sosta, rifugio e alimentazione per gli uccelli nel corso degli spostamenti migratori.

Tra i mammiferi sono presenti il tasso (*Meles meles*) e il cervo (*Cervus elaphus*) (Aree protette TN, 2012).

Per quanto riguarda gli anfibi, sono segnalati per l'area l'ululone dal ventre giallo (*Bombina variegata*), il rospo comune (*Bufo bufo*), il rospo smeraldino (*Bufo viridis*), *Rana dalmatina*, rane verdi *Pelophylax kl. Esculentus* e *Pelophylax ridibundus*, *Rana temporaria* e la salamandra pezzata (*Salamandra salamandra*).

Durante la stagione primaverile è stata osservata una colonia riproduttiva di *Rana temporaria* in una pozza laterale al corso del fiume con acqua ferma e rada vegetazione palustre in contesto boschivo.

Inoltre, nella parte meridionale dell'area, presso ramificazioni dei torrenti e pozze sono presenti numerosi siti utilizzati da rane verdi che potrebbero appartenere al taxon *P. kl. esculentus* o alla specie *P. ridibundus*. Tutti i siti sono difficilmente accessibili e sono all'interno della boscaglia.

Sono stati inoltre osservati due esemplari di *Rana dalmatina* in zona aperta caratterizzata da prato da sfalcio.

Nel biotopo, quali predatori di anfibi, sono stati osservati aironi cenerini ed esemplari appartenenti alle due specie di *Natrix* presenti in Trentino: *Natrix tessellata* e *Natrix natrix*.

Un fattore di minaccia potrebbe essere la presenza di grosse carpe (*Cyprinus carpio*), pesci di origine alloctona, presenti in zone golenali ad acqua lenticia.

NOCE027

Il sito si trova nel tratto del Noce a valle del bacino di Santa Giustina e dell'omonima diga, prima della forra che rende inaccessibile l'alveo del torrente.

In tutta l'area adiacente al Torrente Noce, è stato rinvenuto un solo girino di anuro, probabilmente appartenente alla Famiglia Ranidae, in una zona ad acqua lenticia ricca di vegetazione sui bordi circondata da bosco rado di latifoglie.

Il territorio è caratterizzato da fenomeni carsici ed è ricco di nicchie e grotte nella roccia dolomitica, con concrezioni calcaree e percolazioni di acqua. Tuttavia, nessun anfibio è stato rinvenuto in questi ambienti.

NOCE031

Questo sito si trova a monte del bacino di Santa Giustina all'altezza del Ponte di Mostizzolo e della confluenza del Torrente Barnes nel Noce.

In questo sito non sono stati ritrovati anfibi, forse per le caratteristiche naturali inidonee (forte acclività dei versanti, acqua troppo corrente).

Descrizione dei siti di campionamento in Val di Sole

NOCE066

Il sito si trova tra l'abitato di Malè e quello di Monclassico in Val di Sole.

Presso questo sito, nonostante approfondite ricerche, è stato trovato un solo anfibio: un esemplare giovane di *Rana temporaria* in attività in un prato da sfalcio adiacente al letto del torrente.

NOCE093 – Depuratore di Mezzana

Il sito si trova circa mezzo chilometro a valle dell'abitato di Mezzana, in Val di Sole, in prossimità del depuratore situato in destra orografica del torrente Noce.

In questo tratto e nel tratto più a valle, sia in destra che in sinistra, non sono stati trovati anfibi.

Tuttavia, vicino alla ciclabile (sulla sponda destra) è presente un prato artificiale con vari ruscelli apparentemente idonei per gli anfibi, quantomeno come habitat occasionale, poiché la corrente potrebbe rappresentare un ostacolo alla riproduzione.

Un dato interessante è stata l'osservazione, in uno di questi ruscelli adiacenti al bosco, di una *Natrix natrix* in frenetica attività di ricerca di cibo.

Descrizione dei siti di campionamento in Val di Pejo

NOCE117

Il sito è posto nella porzione meridionale della Val di Pejo all'altezza dell'abitato di Comasine.

Durante le ricerche effettuate su entrambe le sponde sono stati trovati due esemplari di *Rana temporaria*, di cui uno giovane e uno adulto, entrambi nella fascia di vegetazione adiacente al letto del torrente, costituita da specie erbacee non igrofile nelle interruzioni della vegetazione arborea e arbustiva.

Si segnala la presenza di vipera comune (*Vipera aspis*) e orbettino (*Anguis veronensis*) nelle aree circostanti.

NOCE142 – LAGO DI PIAN PALU'

Il sito si trova subito a valle del bacino artificiale di Pian Palù (1800 m s.l.m.), in Val di Pejo, all'interno del Parco Nazionale dello Stelvio; è stata indagata tutta l'area a monte del sito, comprese le sponde del lago e il tratto di Noce proveniente dal Corno dei Tre Signori che si immette nel lago.

Per quanto riguarda la vegetazione legnosa in quest'area si segnala il larice (*Larix decidua*), l'ontano verde (*Alnus viridis*) e gli arbusti *Rhododendron sp.* All'interno dei cariceti si segnala la presenza sporadica di cuscinetti di sfagno.

Numerose le zone umide caratterizzate da ruscelli in cui sono presenti specie come *Parnassia palustris*, l'insettivora *Pinguicula alpina*, *Myosotis scorpioides*, *Aconitum napellus*.

In questo tipo di ambienti, a monte e a lato del lago sono state individuate diverse pozze con numerosi girini di *Rana temporaria*. Inoltre sono stati trovati tre esemplari subadulti della stessa specie.

Descrizione dei siti di campionamento sui principali affluenti del Noce

SPOR033 - TORRENTE SPOREGGIO

Il sito si trova lungo il Torrente Sporeggio, nella valle omonima, situata all'interno del Parco Naturale Adamello-Brenta.

Il torrente è stato indagato anche per due lunghi tratti a valle del sito.

Il primo, verso la confluenza con il Noce, è molto antropizzato, caratterizzato dalla presenza di meleti e abitazioni e qualche tratto di bosco di latifoglie e salici (*Salix alba*). Non sono stati trovati anfibi, anche se alcuni ambienti (es. pozze temporanee) sarebbero potuti essere idonei ad alcune specie, come l'ululone dal ventre giallo (*Bombina variegata*).

Il secondo tratto è caratterizzato esclusivamente da bosco di faggio (*Fagus sylvatica*) e misto con abete rosso (*Picea abies*), con sottobosco di megaforie (*Petasites sp.*) in alcune zone a ridosso del torrente e presenza dell'orchidea *Listera ovata*.

Lungo la sponda sinistra sono stati trovati due esemplari giovani di *Rana dalmatina* in acqua e al lato dell'alveo, e più di 10 giovani rospi comuni (*Bufo bufo*) di 1,5-2 cm di lunghezza attivi sulla lettiera di foglie di faggio.

Inoltre sono state rinvenute alcune larve di *Salamandra salamandra* in corsi laterali e piccoli affluenti.

RINA004 – TORRENTE RINASCICO

Il sito si trova sul Torrente Rinascico subito prima dell'abitato di Vigo di Ton, a circa 470 m s.l.m.

Tra le specie arboree della fascia boschiva sono presenti il faggio (*Fagus sylvatica*), il pino silvestre (*Pinus sylvestris*), il tasso (*Taxus baccata*), l'acero (*Acer sp.*), l'abete rosso (*Picea abies*), l'abete bianco (*Abies alba*) e la robinia (*Robinia pseudoacacia*), con arbusti come madreselva pelosa (*Lonicera xylosteum*) e biancospino (*Crataegus monogyna* e *C. oxyacantha*). Il sottobosco è di tipo nemorale con ciclamino (*Cyclamen purpureum*), erba trinità (*Epatica nobilis*), primula selvatica (*Primula vulgaris*) oppure presenta entità più nitrofile e amanti dell'umidità come *Urtica dioica*, *Petasites album*, *Stachys sp.*, *Ranunculus acris* e *Equisetum sp.*

Gli unici anfibi rinvenuti sono state quattro larve di *Salamandra salamandra* in una pozza laterale del torrente con acqua ferma.

Si segnala un biacco (*Hierophis carbonarius*) morto per road-killing sulla strada vicina.

TRES026 – TORRENTE TRESENICA

Il sito si trova sul Torrente Tresenica a 1178 m s.l.m., nel tratto che fuoriesce dal Lago di Tovel, in Val di Tovel all'interno del Parco Naturale Adamello-Brenta.

Le ricerche sono state effettuate in tutto il comprensorio del Lago di Tovel. Il Lago di Tovel è un'area particolarmente tutelata, fin dal 1980 è nell'elenco delle zone umide di importanza internazionale, in base alla Convenzione di Ramsar.

Le sue acque sono alimentate da immissari e da piccole sorgenti perilacuali e altre acque sorgive che fuoriescono dal fondo, provenienti dalla località Pozzol, un'ampia depressione situata circa un chilometro a monte, dove il torrente Santa Maria Flavona si esaurisce scomparendo nel terreno.

Il terreno particolarmente poroso viene quindi attraversato dall'acqua sino a raggiungere la falda acquifera. L'acqua di falda ha un movimento lento ma costante verso valle e le sorgenti perilacuali rappresentano il punto in cui la falda acquifera incontra nuovamente la superficie.

All'interno delle acque del lago si trovano diverse specie di pesci, come il salmerino alpino (*Salvelinus alpinus*), la sanguinerola (*Phoxinus phoxinus*), l'alborella cisalpina (*Alburnus albolella*) ed il cobite barbatello (*Barbatula barbatula*).

L'ambiente perilacuale offre rifugio e nutrimento alla biscia dal collare (*Natrix natrix*).

Il lago di Tovel è noto per il caratteristico arrossamento che avveniva nelle sue acque, dovuto all'azione di un'alga identificata come *Tovellia sanguinea*. Il fenomeno dell'arrossamento si è verificato in estate durante i mesi più caldi fino all'estate del 1964. In seguito il fenomeno non si è più manifestato. Secondo alcuni studiosi il mancato fenomeno negli ultimi anni sarebbe dovuto alla scomparsa del carico organico (azoto e fosforo) proveniente dalle modalità di monticazione (transumanza) delle mandrie di bovini che pascolavano nei pressi del lago. La *T. sanguinea* è stata recentemente identificata in almeno un altro lago alpino, il Seealpsee in Svizzera.

Un altro rappresentante tipico del fitoplancton presente nel lago di Tovel è la *Fragilaria tenera*, un'alga di tipo unicellulare libera, appartenente al gruppo delle diatomee.

Tra le entità sommerse sono poi presenti l'alga bentonica macroscopica *Chara aspera* e la pianta acquatica *Ranunculus trychophyllus*.

L'ambiente circostante il lago è occupato da una fustaia quasi pura di conifere in cui, a seconda del luogo, prevalgono l'abete rosso (*Picea abies*) o il pino silvestre (*Pinus sylvestris*) o l'abete bianco (*Abies alba*). Un particolare tipo di vegetazione "pioniera" ha poi colonizzato gli scoscendimenti rocciosi a nord del lago.

Tra la fauna dell'ambiente alpino circostante sono presenti alle quote più alte il camoscio (*Rupicapra rupicapra*), l'aquila reale (*Aquila chrysaetos*) ed il corvo imperiale (*Corvus corax*) e attorno al lago vive una ricca avifauna di ambiente lacustre e torrentizio.

Un'entità faunistica di rilievo che caratterizza la val di Tovel è inoltre l'orso bruno delle Alpi (*Ursus arctos*) che qui trova buone condizioni per sopravvivere: la Val di Tovel rappresenta infatti una delle aree di importanza primaria per la conservazione della popolazione trentina di questo plantigrado.

Durante le ricerche sono stati trovati alcuni esemplari adulti di *Rana temporaria*, presenti soprattutto lungo le rive più riparate e ricche di vegetazione dell'ambiente lacustre. Inoltre sono stati osservati numerosi neometamorfosati di rospo comune (*Bufo bufo*), a testimonianza del successo riproduttivo di questa specie nell'area.

Negli ambienti di riva ricchi di cariceti bassi e cespugli sono stati osservati tre esemplari adulti di *Natrix natrix*, di cui due melanotici.

SROM013 – TORRENTE SAN ROMEDIO

Il sito si trova sul torrente San Romedio, in alta Val di Non, tra il paese di Romeno e quello di Don ad una quota di circa 950 m s.l.m.

La formazione arborea autoctona è composta da faggio (*Fagus sylvatica*), abeti (*Picea abies* e *Abies alba*), nocciolo (*Corylus avellana*), frassino (*Fraxinus exelsior*), carpino nero (*Ostrya carpinifolia*).

Alcune delle specie floristiche presenti lungo gli argini, tipiche degli habitat ad elevata igrometria, sono *Impatiens glandulifera*, *Asplenium trichomanes*, *Petasites album*, *Ranunculus acris*, *Prunella vulgaris*.

Le ricerche non hanno portato all'evidenza di nessuna popolazione anfibia, sebbene l'habitat terrestre sia favorevole a diverse specie come *Bufo bufo* e *Rana temporaria* e la qualità delle acque potrebbe andare bene a *Salamandra salamandra*.

NOVE004 – TORRENTE NOVELLA

Il sito si trova sul Torrente Novella in Val di Non a circa 700 m s.l.m., a monte del Parco Fluviale Novella, che si snoda nel canyon creato dall'acqua all'interno della roccia. La roccia è perlopiù sedimentaria, tuttavia sul greto del torrente non è raro trovare ciottoli di porfido (rocce vulcanica effusiva) e filladi (rocce metamorfiche).

La valle a V creata dal torrente è caratterizzata dalla cosiddetta scaglia (risalente a 100 milioni di anni fa), la quale si presenta in parte rossa e in parte grigia in base alle diverse concentrazioni di ossigeno presenti nell'acqua marina nel periodo della formazione. Più alte concentrazioni di ossigeno sono associate alla parte rossa, minori concentrazioni sono associate alla parte grigia (fonte: Parco Fluviale Novella). La forra più a valle presenta passaggi più stretti ed è caratterizzata dalla dolomia. Questa roccia è una formazione più antica della scaglia, risale infatti a 200 milioni di anni fa. L'erosione della dolomia, che ha portato alla formazione della forra, è opera dell'azione dei fiumi sottoglaciali all'epoca delle ultime glaciazioni e del più recente passaggio impetuoso del torrente Novella.

Nell'area circostante sono presenti coltivi (meleti e vigneti).

Presso questo sito, nessun anfibio è stato trovato, anche se è segnalata la salamandra pezzata (*Salamandra salamandra*) nella forra, tuttavia in questo tratto l'acqua non è raggiungibile per poter verificare la presenza di larve.

Si segnala il ritrovamento di una giovane *Natrix natrix* nascosta sotto materiale edile in una zona umida con acqua debolmente corrente prospiciente il greto del torrente.

BARN025 – TORRENTE BARNES

Il sito è posizionato sul Torrente Barnes dopo il Ponte fonte San Vigilio.

In questo tratto la qualità dell'ambiente fluviale è elevata con un punteggio IFF di livello II su entrambe le sponde.

L'ambiente terrestre circostante in corrispondenza del bosco è caratterizzato da sottobosco a *Oxalis*, *Maianthemum bifolium* e *Paris quadrifolia*, mentre nelle interruzioni, in ambienti scoscesi e umidi sono presenti specie più nitrofile ed eliofile come

ranunculacee (*Aconitum napellus* e *Ranunculus* sp.) e grandi Pteridofite (*Dryopteris filix-mas*). Sono stati trovati alcuni rari cuscinetti di sfagno (*Sphagnum* sp.) in ambiente umido ad elevata pendenza. In sponda sinistra sono presenti il sorbo degli uccellatori (*Sorbus aucuparia*), l'acero montano (*Acer pseudoplatanus*), nocciolo (*Corylus avellana*) e abete rosso (*Picea abies*)

Per quanto riguarda gli anfibi, sono stati trovati tre esemplari di *Rana temporaria*, uno subadulto e due adulti, in ambienti umidi caratterizzati da ruscelli e paludi. Sono stati osservati anche alcuni girini della stessa specie in una pozza creata da un ruscello sulla sponda sinistra del torrente in ambiente caratterizzato da bosco rado e prato.

Si segnala il ritrovamento di un giovane esemplare di lucertola vivipara (*Zootoca vivipara*) sulla sponda destra in un tratto di bosco interessato da taglio raso, quindi soleggiato e ricco di specie erbacee a foglia stretta (Fam. Poaceae).

RABB038 – TORRENTE RABBIES

Il sito si trova lungo un tratto del Torrente Rabbies che non è stato analizzato con il metodo IFF. Esso è posto a valle delle Cascate del Saent, nella conca di Prà Saent, a circa 1784 m s.l.m.

La conca è caratterizzata da una rete di piccoli corsi d'acqua che convergono tutti nel torrente principale, che scorre al centro. La zona è quindi molto ricca d'acqua superficiale che la rende particolarmente interessante dal punto di vista floristico. Il substrato torboso e umido permea la crescita di una gran varietà di briofite e sfagni (*Sphagnum* sp.), piante acidofile come ericacee, piante insettivore come *Pinguicula alpina*, oltre a numerose ciperacee e poacee.

Il gran numero di rivoli e pozze create dagli animali al pascolo della vicina malga rendono l'ambiente adatto ad una consistente popolazione di *Rana temporaria*. Sono state osservate grandi quantità di girini e neometamorfosati, oltre a numerosi adulti e subadulti. Si segnala il ritrovamento, sul bordo del sentiero che sovrasta la conca, di un esemplare adulto di *Rana temporaria* rovesciato sul dorso, apparentemente morto. L'esemplare era in realtà vivo, ma in stato di evidente alterazione motoria e comportamentale, pur non mostrando alcun segno di trauma fisico esterno.

MELE009 – TORRENTE MELEDRIO

Il sito si trova sul Torrente Meledrio, nel tratto che scorre vicino all'abitato di Folgarida, ma in un avvallamento all'interno del bosco.

La qualità dell'ecosistema fluviale è molto buona, con un livello II per entrambe le sponde, attribuitogli con il metodo IFF.

Il bosco circostante contiene soprattutto abete rosso (*Picea abies*), abete bianco (*Abies alba*) e faggio (*Fagus sylvatica*). Il sottobosco, a seconda del gradiente idrico, presenta mirtillo nero (*Vaccinium myrtillus*), erica (*Erica carnea*), orchidee della specie *Listera ovata*, e megaforbie come *Petasites album*.

In un ramo laterale del torrente sono state osservate tre trote, probabilmente ibridi di trota fario (*Salmo trutta fario*) e trota marmorata (*Salmo trutta marmoratus*) in frega. È stato ritrovato un solo anfibio: un esemplare giovane di *Rana temporaria*, a valle del sito.

VERM037 – TORRENTE VERMIGLIANA

Il sito è posto sul Torrente Vermigliana, all'interno della Riserva Naturale Provinciale "Torbiera del Tonale", che si estende su un'area di 15 ha circa a 1800 m s.l.m.

Si tratta di una conca situata sul versante trentino del Passo del Tonale caratterizzata da una notevole diversità di situazioni ambientali, a cui corrispondono una grande varietà di associazioni e specie vegetali. Il biotopo è limitato in modo naturale dal bosco e da cespuglieti d'alta quota. La torbiera del Tonale è una torbiera di tipo "basso" più propriamente una torbiera fontinale, la cui origine è data dalla grande quantità di acque di risorgiva che ha occupato la zona e che è stata in seguito invasa dalla vegetazione palustre, che ha formato il deposito di torba sul quale oggi è impostata l'area protetta. La porzione più igrofila della torbiera è articolata in almeno tre strutture naturali a diverso grado di umidità che si succedono nello spazio in funzione del bilancio idrico.

Si possono riconoscere praterie a minor umidità, con *Molinia caerulea*, *Calluna vulgaris* e *Gagea fistulosa*; praterie mediocrementemente umide con *Allium sibiricum*; una zona più umida nella quale la struttura è caratterizzata da pozze e gibbosità di sfagni. Le pozze di acqua libera sono spesso tappezzate da muschi bruni e da *Utricularia minor* (pianta insettivora sommersa). In zone di torba denudata si rinvencono altre due specie insettivore: *Drosera rotundifolia* e *Pinguicula alpina*.

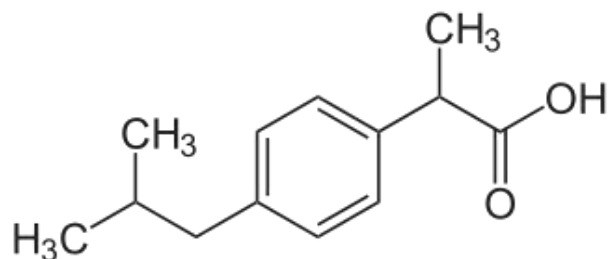
Tutta la porzione più umida della torbiera del Tonale è dunque ricchissima di microsituazioni ambientali che variano con gradiente continuo da zone abbastanza asciutte a veri laghetti in miniatura, e da acque correnti veloci ad acque praticamente immobili. Sulle zone più elevate ed inclinate della conca del Tonale si è instaurato un arbusteto ad ontano verde (*Alnus viridis*). Su quest'area di grande valore ambientale sono state costruite strade, edifici, piste da sci e perfino una pista aeroportuale. Dove sorgono tali manufatti la torbiera è ovviamente stata distrutta in modo irreparabile (Aree protette TN, 2012).

L'ultimo tratto del Torrente Vermigliana scorre dunque in questo contesto.

Presso le pozze di acqua libera, caratterizzate dalla presenza di trifoglio fibrino (*Menyanthes trifoliata*), brasca comune (*Potamogeton natans*) e dell'insettivora *Utricularia minor*, sono stati osservati numerosi girini e neometamorfosati di *Rana temporaria*. Inoltre, in tutto l'ambiente di torbiera sono stati trovati anche adulti della stessa specie

3 Contaminanti emergenti selezionati³

3.1 Ibuprofene



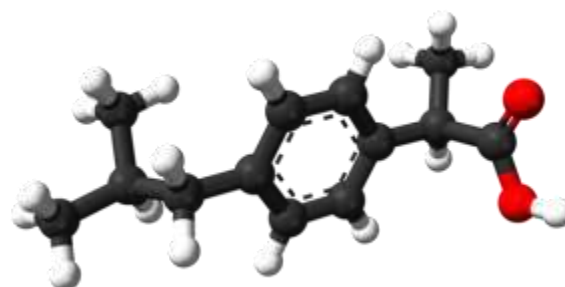
Nomenclatura IUPAC

2-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid

Formula molecolare: $C_{13}H_{18}O_2$

Racemato

(R)-Ibuprofene



Massa molecolare: $206.285 \text{ g mol}^{-1}$

(S)-Ibuprofene

Identificativi

CAS Number: 15687-27-1

KEGG: D00126

PubChem: CID 3672

CHEBI:

IUPHAR/BPS: 2713

ChEMBL:

Codice ATC: C01EB16 / G02CC01 / M01AE01 / M02AA13 / R02AX02

DrugBank: DB01050

ChemSpider: ID3544
5855

UNII: WK2XYI10QM
ChEMBL521

L'ibuprofene è un farmaco antinfiammatorio non steroideo (NSAID) che possiede attività antipiretiche e analgesiche (Bolong et al., 2009). Venne scoperto nel 1961 da Stewart Adams e commercializzato come Brufen (ASHP, 2016). È utilizzato per trattare dolore, febbre, infiammazioni, per alleviare il dolore durante il ciclo mestruale, per emicranie, per artriti reumatoidi e anche per chiudere dotti arteriosi in bambini prematuri. Come l'aspirina ed altri altri NSAID, l'ibuprofene è un inibitore non selettivo delle ciclossigenasi (COX), enzimi coinvolti nella sintesi della prostaglandina nel pathway dell'acido arachidonico, e ne inibisce 2 forme, la COX-1 e la COX-2. L'ibuprofene è un solido cristallino bianco con un punto di fusione compreso tra i 74 e i 77°C, è poco solubile in acqua (21 mg L^{-1}) ma facilmente solubile in solventi organici quali l'etanolo e l'acetone ($\log K_{ow} = 3.97$) (ASHP, 2016). Dal punto di vista ecotossicologico in acque dolci, nonostante presenti un basso potenziale di bioaccumulo ed un'emivita di 20 giorni a causa della biodegradazione, risulta comunque tossico per svariate specie di

³ I CE elencati e descritti in questo capitolo sono stati selezionati sulla base di dati messi a disposizione dall'Università di Trento (Progetto GLOBAQUA <https://www.researchgate.net/project/GLOBAQUA-5?openDialog=followers>) e delle analisi condotte nell'ambito del WP1. Sono stati utilizzati nei test di tossicità acuta, genotossicità, stress ossidativo e comportamentale negli invertebrati (WP3)

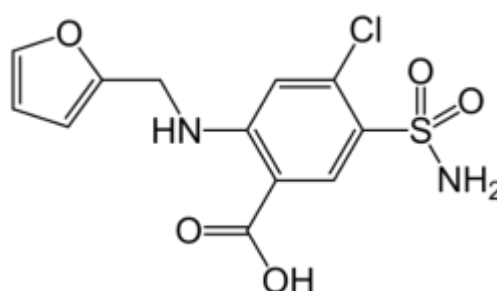
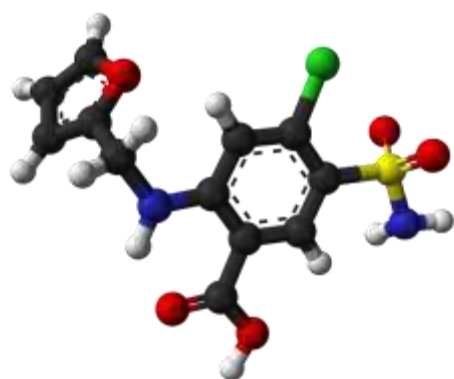
invertebrati (Brun et al., 2006; Cleuvers, 2003; Kim et al., 2009; Knoll/BASF, 1995; Pascoe et al., 2003; Pounds, et al, 2008; Quinn et al., 2008; Tamura et al., 2013).

Fonti:

<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+3099>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3672>

3.2 Furosemide



Nomenclatura IUPAC

4-chloro-2-(furan-2-ylmethylamino)-5-sulfamoylbenzoic acid

Formula molecolare: $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$

molecolare: 330.739 g mol⁻¹

Massa

Identificativi

CAS Number: 54-31-9

KEGG: D00331

Codice ATC: C03CA01

CHEBI: 47426

PubChem: CID 3440

Ch EMBL: ChEMBL35

DrugBank: DB00695

ChemSpider: 3322

UNII: 7LXU5N7ZO5

IUPHAR/BPS: 4839

Il furosemide è un farmaco diuretico, derivato dall'acido sulfamoilantranilico, usato per trattare problematiche mediche come la cirrosi epatica, insufficienze renali e cardiache (ASHP, 2016). Può essere utilizzata per abbassare la pressione sanguigna. Il furosemide, come altri diuretici, agisce inibendo la proteina di trasporto di membrana NKCC2, il simportatore Na-K-2Cl del tratto ascendente dell'Ansa di Henle. Abolisce il gradiente osmotico cortico-midollare e bloccando il movimento libero dell'acqua. Inoltre il furosemide è una molecola antagonista specifica non competitiva per i recettori GABA-A (Hinchcliff et al., 2015; Sullivan & Hinchcliff, 2015). Si presenta come una polvere cristallina bianco-giallastra, insapore e inodore, con scarsa solubilità in acqua ma molto elevata in soluzioni alcaline o solventi organici ($\log K_{ow} = 2.03$). Dal punto di vista ambientale, il furosemide è principalmente adsorbito a livello di solidi sospesi e di sedimento, non è volatile ed è difficilmente idrolizzabile, presentando inoltre un basso potenziale di bioaccumulo per gli organismi acquatici. Dal punto di vista

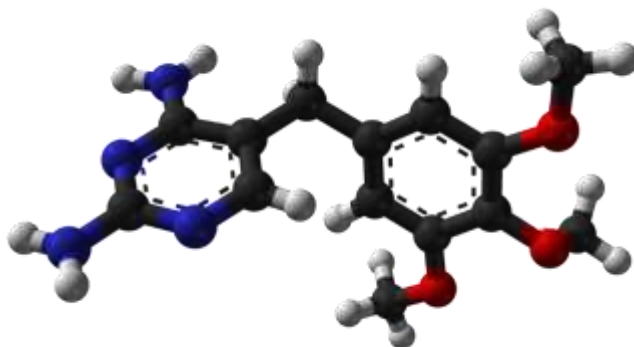
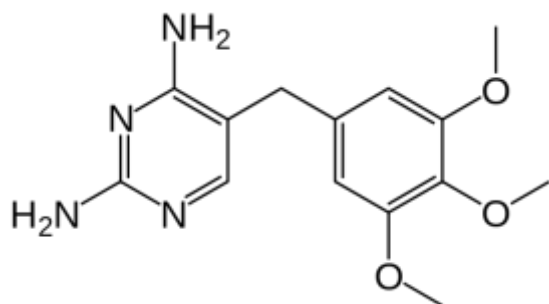
ecotossicologico presenta tossicità per alcuni organismi acquatici con concentrazioni nell'ordine dei milligrammi per litro (Pascoe et al., 2003).

Fonti:

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+3086>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3440>

3.3 Trimethoprim



Nomenclatura IUPAC

5-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methyl]pyrimidine-2,4-diamine

Formula molecolare: C₁₄H₁₈N₄O₃

Massa molecolare:

290.323 g mol⁻¹

Identificativi

CAS Number: 738-70-5

DrugBank: DB00440

KEGG: D00145

ATC code: J01EA01 / QJ51EA01

ChemSpider: 5376

CHEBI: 45924

PubChem: CID 5578

UNII: AN164J8Y0X

Ch

EMBL: CHEMBL22

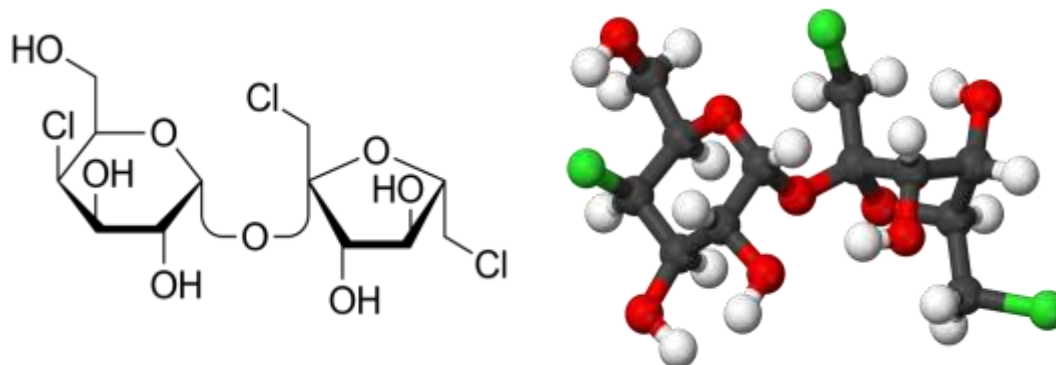
Il trimethoprim (TMP) è un antibiotico e antiprotozoico, correlato alla pirimetamina, in grado di inibire la diidrofollato reduttasi e quindi la produzione di acido tetraidrofolico dall'acido diidrofolico (AG, 2014). Viene usato principalmente nel trattamento di infezioni alle vie urinarie (Tia et al., 1996), all'orecchio medio e per la diarrea del viaggiatore. Il TMP ha meno effetti collaterali dei sulfamidici. Ci sono evidenze di danno potenziale durante la gravidanza in alcuni animali ma non nell'uomo (ASHP, 2015; Masur et al., 2014).

Si presenta come una polvere biancastra inodore e amara, e possiede una limitata solubilità in acqua, maggiore invece in vari solventi organici ($\log K_{ow} = 0.91$). Dal punto di vista ecotossicologico degli ambienti acquatici presenta uno scarso potenziale di bioaccumulo e non viene adsorbito da solidi sospesi e sedimenti, presentando però moderato tempo di persistenza. Gli studi di tossicità acuta su invertebrati acquatici evidenziano una tossicità acuta e cronica nell'ordine dei milligrammi per litro (Kim et al., 2007; Pascoe et al., 2003).

Fonti:

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?db+hsdb:@term+@DOCNO+6781>
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5578>

3.4 Sucralosio



Nomenclatura IUPAC

(1→6)-Dichloro-(1→6)-dideoxy-β-D-fructofuranosyl-4-chloro-4-deoxy-α-D-galactopyranoside

Formula molecolare: C₁₂H₁₉Cl₃O₈

Massa

molecolare: 397.64 g/mol

Identificativi

CAS Number: 56038-13-2

KEGG: C12285

ChemSpider: 64561

ChEBI: 32159

PubChem: CID 71485

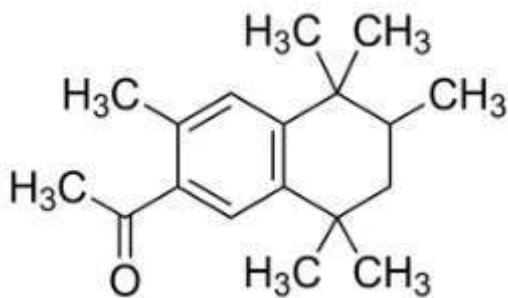
UNII: 96K6UQ3ZD4

Il sucralosio è un dolcificante artificiale impiegato come sostituto dello zucchero. Il suo potere dolcificante è tra 320-1000 volte più elevato del saccarosio, ed è stabile in un ampio intervallo di temperature e di pH, consentendone quindi l'utilizzo in prodotti da forno o che richiedano un prolungato tempo di conservazione. Non risulta digeribile, rendendo essenzialmente nullo l'apporto calorico. È impiegato in prodotti come caramello, barrette energetiche e bibite gassate. Il sucralosio è stato il primo dolcificante artificiale ad essere ritrovato in tracce nell'ambiente. Si presenta come una polvere cristallina bianca, non igroscopica, altamente solubile in acqua ($\log K_{ow} = -1.00$) con un intenso gusto dolce. Il consumo umano è considerato sicuro, in quanto mediamente solo il 2-8% del sucralosio ingerito viene metabolizzato. Più interessante il destino ambientale, in quanto nonostante le normali concentrazioni rilevate non abbiano finora evidenziato effetti ecotossicologici rilevanti, in particolari condizioni è in grado di rilasciare contaminanti organici persistenti quali dibenzo-p-diossine policlorinate. Test cronici su *Daphnia magna* a concentrazioni elevate (1800 mg L⁻¹) non hanno mostrato effetti evidenti su sopravvivenza e riproduzione (Huggett 2011; Wiklund, 2012). Nessun fenomeno di bioconcentrazione è stato segnalato, poi, in organismi a vari livelli trofici (Stolte et al., 2013).

Fonti:

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?db+hsdb:@term+@DOCNO+7964>
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71485>

3.5 Tonalide



Nomenclatura IUPAC

1-(3,5,5,6,8,8-hexamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthalenyl)ethanone

Formula molecolare: C₁₈H₂₆O

Massa

molecolare: 258.405 g/mol

Identificativi

CAS Number: 1506-02-1

ChemSpider: 80719

PubChem: CID 89440

Il tonalide (AHTN) è una fragranza, appartenente al gruppo dei muschi sintetici policiclici, noti anche con il nome generico di muschio bianco. Presenta un aroma fresco e dolce, a cui mancano le note fecali e animalesche caratteristiche dei muschi naturali. È utilizzato nell'industria profumiera come base per molteplici fragranze in commercio, quanto come fragranza per detergenti. È il secondo muschio policiclico più largamente prodotto e utilizzato al mondo dopo il Galaxolide (HHCB) (Villa et al., 2014). Presenta un log K_{ow} di 5.7, si tratta, perciò, di una sostanza estremamente idrofoba che presenta una bassa solubilità in acqua (1.25 mg L⁻¹). Caratteristica è anche la ridotta biodegradabilità che ne determina la persistenza nell'ambiente (Balk, 1999).

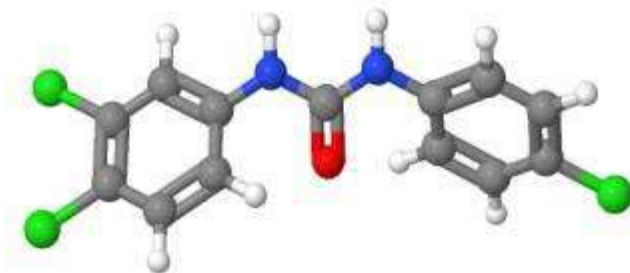
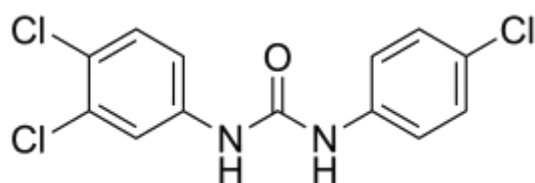
Pur non presentando effetti tossici evidenti per l'uomo, è stato evidenziato come possibile interferente endocrino, presentando un'attività estrogenica *in vitro*. Presenta inoltre interesse dal punto di vista ecotossicologico in quanto, pur non presentando sulla fauna effetti tossici acuti alle concentrazioni ambientali normalmente rilevate, sono possibili effetti a lungo termine su organismi esposti a basse concentrazioni di questo composto per un lungo periodo, con particolare riferimento ai detritivori acquatici (Wüthrich, 1996; Grützner, 1995).

Fonti:

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?db+hsdb:@term+@DOCNO+7515>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/89440>

3.6 Triclocarban



Nomenclatura IUPAC:

1-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)urea

Formula molecolare: C₁₃H₉Cl₃N₂O

Massa

molecolare: 315.578 g mol⁻¹

Identificativi

PubChem: CID 7547

CAS Number: 101-20-2

ChemSpider: 7266

KEGG: D06223

CHEBI: 48347

Ch EMBL: ChEMBL1076347

UNII: BGG1Y1ED0Y

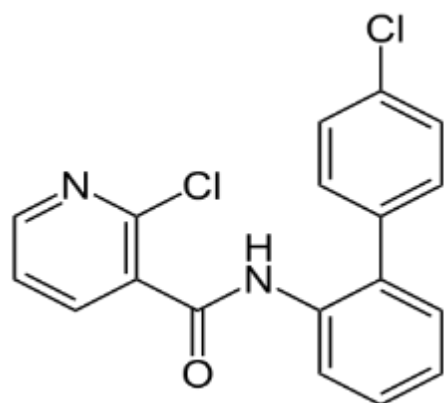
L'antimicrobico triclocarban è un antibatterico policlorinato, analogo del triclosan, in grado di inibire l'attività dell'enoil-(proteina trasportante acil) reduttasi (ACP), largamente distribuita in batteri, funghi e piante. Questo enzima catalizza l'ultimo step di allungamento degli acidi grassi nel sistema della sintasi degli acidi grassi di tipo II, interrompendo la sintesi della membrana cellulare ed inibendo la crescita microbica. È impiegato come additivo in detersivi, cosmetici e prodotti per la cura personale per prevenirne il deterioramento e infezioni batteriche (Dimitrov et al., 2003), come anche in prodotti domestici e per la cura personale, inclusi saponi da bar, detersivi, bagnoschiuma, lozioni detersivi e salviettine per le sue proprietà sanificanti (Chen et al., 2008a). Si presenta come una polvere bianca con bassa solubilità in acqua e un elevato coefficiente logaritmico di partizione ($\log K_{ow}$) di 4.9 (Gledhill, 1975), che comporta un significativo potenziale di assorbimento nei tessuti lipidici degli organismi viventi. Risulta essere tossico, persistente e potenzialmente bioaccumulabile (Gledhill, 1975; Huovinen, 2001; Nolen & Dierckman, 1979). Viene compreso tra gli interferenti endocrini, cioè ha la capacità di alterare le segnalazioni e il funzionamento degli ormoni endogeni (Chen et al., 2008a). Il TCC persiste nei liquami, generati dai processi di depurazione, ed è solo parzialmente mineralizzato nei fanghi attivi (56%) (Puzyn et al., 2008). La trasformazione ambientale del TCC dà aniline mono e diclorinate come prodotti importanti di degradazione (Orsi et al., 2011); questi prodotti sono fonte di preoccupazione vista la loro intrinseca ematossicità, genotossicità, ecotossicità (Gledhill, 1975) e persistenza ambientale (Boehncke et al., 2003). Le industrie che producono TCC etichettano il loro prodotto con le frasi sul rischio R45 e R46, cioè che può provocare il cancro e alterazioni genetiche ereditabili (Chen et al., 2008b; Yueh et al., 2012). Dal punto di vista ecotossicologico manifesta, per svariate specie di invertebrati acquatici, tossicità acuta e cronica con quantità nell'ordine dei microgrammi per litro (De Liguoro et al., 2009; EPA, 2013).

Fonti:

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+5009>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7547>

3.7 Boscalid



Nomenclatura IUPAC

4-chloro-2-(furan-2-ylmethylamino)-5-sulfamoylbenzoic acid

Formula molecolare: C₁₈H₁₂Cl₂N₂O

Massa

molecolare: 343.207 g/mol

Identificativi

CAS Number: 188425-85-6

KEGG: C18547

ChemSpider: 184713

ChEBI: 81822

PubChem: CID 213013

UNII:

32MS8ZRD1V

ChEMBL: ChEMBL1076544

Il boscalid è un fungicida appartenente alla famiglia chimica delle carbossamidi; è sviluppato da BASF e commercializzato a partire dal 2003. È un fungicida di contatto, ed esercita la sua azione in quanto inibitore della succinato-deidrogenasi. Ha proprietà translaminari, è molto attivo nei confronti di numerosi funghi patogeni, inibisce, inoltre, la germinazione delle spore, l'allungamento del tubulo germinativo, la crescita del micelio e la sporulazione. Nella pianta viene assorbito dalle foglie e trasportato per via translaminare, raggiungendo anche la circolazione linfatica consentendo l'azione sull'apice ed i margini fogliari. È utilizzato in vigneti e per coltivazioni di frutta e verdura, oltre che su campi da golf e piante ornamentali.

Si presenta come un solido cristallino bianco, inodore e poco solubile in acqua ($\log K_{ow} = 2.96$). Non risulta irritante per pelle e occhi; presenta tuttavia un potenziale genotossico e citotossico in base a studi *in vitro* su linfociti umani, non però sufficienti a determinarne il rischio di cancerogenicità per l'uomo. Studi presenti in letteratura riguardanti l'ecotossicologia del composto suggeriscono che sebbene si ritenga che l'uso di fungicidi sia a basso rischio per gli organismi acquatici, non sono ancora chiari i possibili effetti a lungo termine. Presenta un elevato grado di tossicità cronica ed acuta nei confronti di *Daphnia*, nell'ordine dei microgrammi per litro (Bundschuh, 2016).

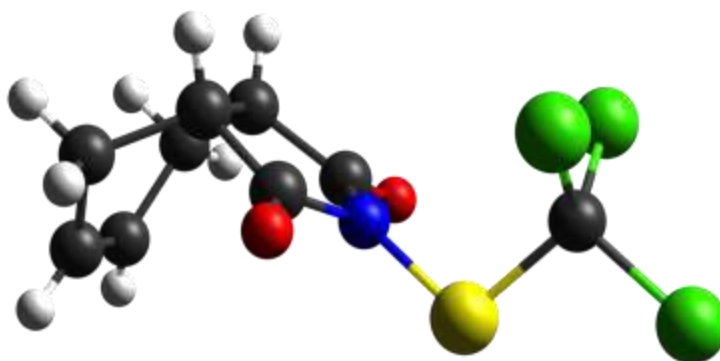
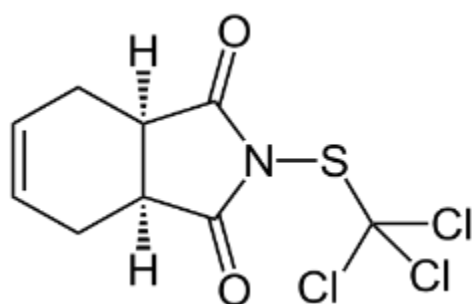
Fonti:

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?db+hsdb:@term+@DOCNO+7499>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/213013>

<https://archive.epa.gov/pesticides/chemicalsearch/chemical/foia/web/pdf/128008/128008-2010-12-23a.pdf>

3.8 Captan



Nomenclatura IUPAC

(3aR,7aS)-2-[(trichloromethyl)sulfanyl]-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-isoin-1,3-dione

Formula molecolare: C₉H₈Cl₃NO₂S

Massa molecolare: 300.59

g/mol

Identificativi

CAS Number: 133-06-2

KEGG: C14438

ChemSpider: 8287

CHEBI: 34608

PubChem: CID 8606

UNII:

EOL5G26Q9F

Ch EMBL: CHEMBL388676

Il captan è un fungicida appartenente alla famiglia della ftalimide, impiegato su frutta, verdura e piante ornamentali. Agisce inibendo la respirazione cellulare in numerose specie di funghi e batteri, probabilmente attraverso la degradazione del composto in tiofosgene, altamente reattivo nei confronti di tioli ed altri gruppi funzionali (Tomlin, 2000; Gordon, 2001). È inoltre in grado di migliorare l'aspetto estetico di molti frutti, facendoli apparire più luminosi e freschi: è infatti spesso impiegato nella produzione delle mele. È inoltre impiegato in prodotti cosmetici e farmaceutici, pitture ad olio, lacche, intonaci, plasticizzanti, polietilene, vinile, stabilizzanti delle gomme e prodotti tessili.

Si presenta sotto forma di polvere bianca, inodore; è scarsamente solubile in acqua ($\log K_{ow} = 2.80$), in cui viene generalmente emulsionato. L'esposizione acuta è in grado di causare nell'uomo irritazione di pelle, occhi, incluse dermatite e congiuntivite, irritazione del sistema respiratorio superiore, visione annebbiata, dispnea, diarrea e vomito. Nonostante in passato fosse classificato dall'EPA nel gruppo B2 dei probabili cancerogeni per l'uomo, è stato riclassificato nel 2004, in quanto i dosaggi in grado di esercitare tale azione cancerogena sono di ordini di grandezza superiori a quelli verosimilmente incontrati nell'impiego della sostanza e nel consumo di prodotti trattati.

Presenta infine un'elevata tossicità acuta nei confronti degli organismi acquatici (USEPA/OPP, 2000; Karmin, 1997; Biestinger, 1973).

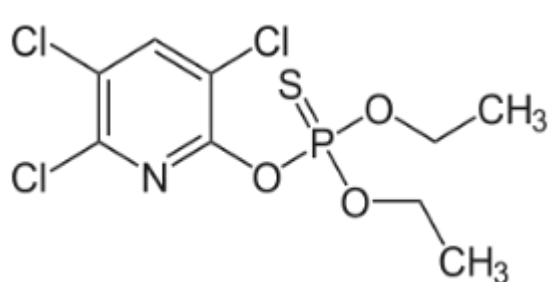
Fonti:

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+951>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8606>

<http://npic.orst.edu/factsheets/archive/captantech.pdf>

3.9 Chlorpyrifos



Nomenclatura IUPAC

O,O-Diethyl *O*-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate

Formula molecolare: C₉H₁₁Cl₃NO₃PS
g/mol

Massa molecolare: 350.59

Identificativi

CAS Number: 2921-88-2

KEGG: D07688

ChemSpider: 2629

ChEBI: 34631

PubChem: CID 2730

UNII: JCS581644W

Ch EMBL: ChEMBL463210

Il chlorpyrifos è un composto organofosforico impiegato come insetticida ed acaricida, in quanto agisce sul sistema nervoso di queste specie come inibitore dell'acetilcolinesterasi. Originariamente introdotto da Dow Chemicals nel 1965, è conosciuto con svariati nomi commerciali, i più noti dei quali sono Dursban e Lorsban. Il chlorpyrifos è ampiamente utilizzato in ambito agricolo ed è stato largamente usato anche a livello domestico: trova infatti impiego per il controllo di blatte, pulci, termiti, zecche e per svariati parassiti delle coltivazioni. Generalmente commercializzato con una concentrazione del 23.5-50%, all'impiego viene applicato in miscele contenenti lo 0.03-0.5% di composto attivo. Si presenta come un solido cristallino bianco con forte odore, irritante per pelle ed occhi, e possedendo una ridotta solubilità in acqua ($\log K_{ow} = 4.96$) e viene generalmente miscelato con liquidi oleosi prima dell'applicazione a colture o animali. Esercita un effetto moderatamente tossico sugli esseri umani, e l'esposizione a questo composto è stata collegata al manifestarsi di effetti neurologici, disturbi persistenti dello sviluppo e malattie autoimmuni. In particolare, un'esposizione durante

la gravidanza può causare un ritardo nello sviluppo mentale dei bambini, ed è stato quindi bandito per la maggior parte degli usi domestici dal 2001. Resta però uno degli insetticidi organofosforici più impiegati in campo agricolo. Presenta interesse dal punto di vista ecotossicologico per l'effetto su svariate specie di acqua dolce (crostacei ed insetti) e per l'elevata tossicità acuta rilevata sulle api (Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life – Chloryrifos, 2008; Schimmel, 1983; USEPA/OPP, 2000; Kersting, 1992).

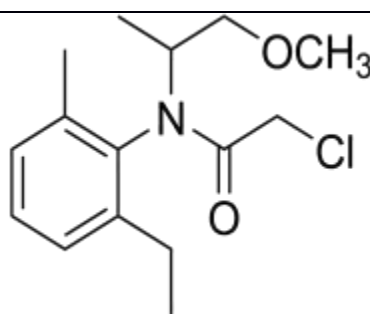
Fonti:

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+389>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2730>

<http://npic.orst.edu/factsheets/archive/chlorptech.html>

3.10 Metolachlor



Nomenclatura IUPAC

(*RS*)-2-Chloro-*N*-(2-ethyl-6-methylmethoxypropan-2-yl)acetamide

phenyl)-*N*-(1-

Formula molecolare:

C₁₅H₂₂ClNO₂

Massa molecolare: 283.80 g/mol

Identificativi

CAS Number: 51218-45-2

KEGG: C10953

ChemSpider: 4025

ChEBI: 6902

PubChem: CID 4169

Ch EMBL:

CHEMBL1884974

Il metolachlor è un derivato dell'anilina comunemente utilizzato come erbicida, appartenente alla famiglia della cloracetanilide. Agisce come inibitore delle elongasi e della geranilgeranil pirofosfato (GGPP) ciclasti, parte del pathway delle gibberelline. È principalmente utilizzato per il controllo delle piante invasive prima della semina o dell'emergenza di mais, cotone, arachide, soia e sorgo, spesso in combinazione con altri erbicidi. È inoltre utilizzato per piante ornamentali.

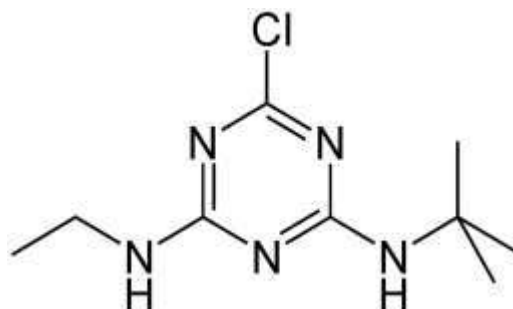
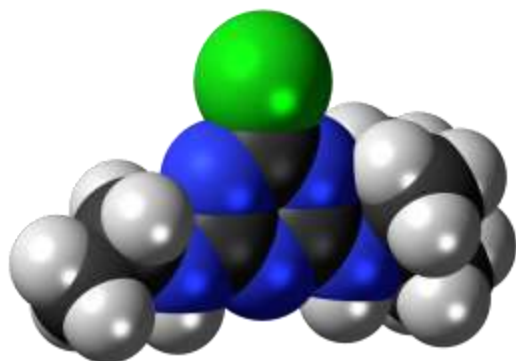
Si presenta come un liquido marrone oleoso, con odore dolciastro. È leggermente solubile in acqua ma più denso, tende quindi ad affondare; è solubile invece nella maggior parte dei solventi organici ($\log K_{ow} = 3.13$). Questa sostanza è stata classificata dall'EPA nella categoria C, che indica un numero limitato di prove di cancerogenicità. Può inoltre causare crampi addominali per ingestione, reazioni allergiche a contatto con la pelle e cefalea, nausea e morte se inalato. Dal punto di vista ecotossicologico è considerato altamente tossico sia a livello acuto che cronico con effetti a lungo termine per gli organismi acquatici (USEPA/OPP, 2000; USEPA/OPP, 2007).

Fonti:

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6706>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4169>

3.11 Terbutilazina



Nomenclatura IUPAC

N-tert-butyl-6-chloro-N'-ethy/L,3,5-triazine-2,4-diamine

Formula molecolare: C₉H₁₆ClN₅

Massa

molecolare: 229.710 g/mol

Identificativi

CAS Number: 5915-41-3

KEGG: C18810

ChemSpider: 20848

ChEBI: 30263

PubChem: CID 22206

UNII: 7LXU5N7ZO5

La terbutilazina è un erbicida ed alghicida selettivo appartenente alla famiglia della clorotriazina. Nelle piante agisce come potente inibitore della fotosintesi, ed è distribuita nell'intero organismo dopo essere stata assorbita attraverso foglie e radici. Largamente impiegata nella coltivazione del granturco, presenta selettività nei confronti di mais, sorgo, patata, pisello, canna da zucchero, vite, alberi da frutta, agrumi, caffè, palma da olio, cacao, olive, caucciù, ed è particolarmente efficace nei confronti di piante dicotiledoni annuali.

Si presenta come un solido biancastro ceroso, con odorazione rancida e putrida e scarsa solubilità in acqua ($\log K_{ow} = 3.40$). Moderatamente irritante per pelle ed occhi, risulta tossico per inalazione ed ingestione, causando difficoltà respiratorie, spasmi muscolari, atassia ed anoressia, oltre ad essere un possibile agente in grado di causare linfoma di tipo non-Hodgkin e cancro polmonare. Presenta elevata tossicità acuta e cronica nei confronti degli organismi acquatici.

Fonti:

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6148>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/22206>

Descrizione dettagliata delle attività di ricerca svolte nell'ambito dei diversi WP dai diversi (periodo di riferimento: ottobre 2015 – gennaio 2018)

Le attività di ricerca del progetto sono suddivise in 6 Work Packages (WP), ciascuno con più obiettivi, secondo un disegno sperimentale che comprende le analisi chimiche, microbiologiche, idrobiologiche, ecotossicologiche, zoologiche e divulgative del progetto (in parentesi il nome del partner responsabile del WP e del ricercatore referente):

WP1 - Determinazione e quantificazione dei CE (UNIMIB; Sara Villa)

WP2 - Diversità e struttura delle comunità procariotiche ed eucariotiche tramite analisi del metagenoma ambientale (UNIBZ; Lorenzo Brusetti)

WP3 – Effetti eco-genotossici sulla comunità dei macroinvertebrati (MUSE; Valeria Lencioni)

WP4 – Effetti genotossici e chitridiomicosi in popolazioni di anfibi (MUSE; Michele Menegon)

WP5 - Danno genotossico in linee cellulari umane provocato da miscele di contaminanti emergenti (CNR-IBF; Gabriella Viero)

WP6 – Divulgazione e sensibilizzazione (MUSE e APSS; Valeria Lencioni e Franco Guizzardi).

Di seguito verrà dettagliata l'attività di ricerca svolta nell'ambito dei diversi WP come da proposta progettuale modificata (Prot. MUSE 7540 P/B.1.2 dell'8/11/2016; Prot. Caritro SG 559/17) da parte dei responsabili scientifici di ciascuno (come da elenco sopra riportato).

L'inizio del progetto è stato anticipato di due settimane (15 ottobre 2015) rispetto alla proposta progettuale che prevedeva l'inizio per l'1 novembre 2015 e si è concluso con proroga di 3 mesi in data 15 gennaio 2018.

3.12 WP1 - Determinazione e quantificazione dei CE (UNIMIB; Sara Villa)

Personale coinvolto: Coordinatore di WP1, dott.ssa Sara Villa (6 mesi/uomo); personale UNIMIB per consulenze scientifiche e tecniche (borsista 4 mesi/uomo), 2 dottorande (6 mesi/uomo ciascuna).

3.12.1 Obiettivo 1.1: Sviluppo di un indice per la classificazione della pericolosità dei CE (novembre 2015-febbraio 2016)

Nell'ambito del WP1.1, l'attività svolta ha avuto come obiettivo lo sviluppo di un sistema di prioritizzazione di alcune categorie di CE (pharmaceutical and personal care products [PPCP] e currently used pesticide [CUP]) potenzialmente rinvenibili nelle acque del torrente Noce (TN) in aree caratterizzate da impatti antropici (presenza di stazioni turistiche e impatto agricolo) e la successiva creazione di due liste di priorità. La prima fa riferimento a CE potenzialmente rinvenibili nel torrente Noce a valle del depuratore del Passo del Tonale legati alla presenza di stazioni sciistiche (farmaci ad uso umano e prodotti per la cura personale), la seconda fa riferimento a principi attivi (p.a.) contenuti in prodotti fitosanitari legati alle pratiche agricole (coltivazioni a melo). Le liste di priorità sono state create ai fini di una programmazione mirata dei piani di monitoraggio successivi.

Prioritizzazione dei prodotti farmaceutici e prodotti per la cura personale (PPCP)

Lo schema di prioritizzazione proposto in questo lavoro, attraverso la creazione di un indice di rischio, segue i principi generali forniti dalle linee guida europee in merito alla valutazione del rischio ambientale di sostanze chimiche nuove ed esistenti (EC, 2003) e per l'autorizzazione al commercio di farmaci ad uso umano (EMA, 2006).

L'approccio metodologico comprende diverse fasi; sinteticamente:

- a. creazione di una banca dati di sostanze attive presenti nei PPCP (Pharmaceutical and Personal Care Products) di maggiore uso nelle aree considerate contenente i dati necessari per lo sviluppo dell'indice (dati di consumo dei principi attivi (p.a.), proprietà chimico-fisiche, dati relativi ai processi di rimozione negli impianti di depurazione delle acque reflue (STP), dati relativi ai tassi di escrezione umana, dati ecotossicologici, etc.);
- b. caratterizzazione della esposizione mediante la stima della concentrazione potenzialmente rinvenibile nelle acque superficiali (PEC_{sw} - Predicted Environmental Concentrations in surface water);
- c. caratterizzazione degli effetti mediante il calcolo delle PNEC (Predicted No Effect Concentration) per gli organismi non target rappresentativi dell'ambiente acquatico (un'alga per il livello trofico dei produttori, un invertebrato, *Daphnia magna*, per il livello trofico dei consumatori primari, un pesce per il livello trofico dei consumatori secondari);
- d. caratterizzazione del rischio attraverso la combinazione dei dati di esposizione e di effetto e prioritizzazione finale.

Al fine di caratterizzare i carichi ambientali sono state stimate le presenze turistiche (presenze certificate in esercizi ricettivi, alloggi privati e seconde case) e il numero di

residenti nella Val di Sole per l'anno 2014 (ISPAT, Istituto di statistica della Provincia di Trento; http://anteprime.provincia.tn.it/pat_statistica_new/dati_online/).

a. Selezione di sostanze attive presenti nei PPCPs

Relativamente ai farmaci ad uso umano, la lista completa con riferimento alle diverse categorie farmaceutiche (analgesici, anti-infiammatori non steroidei (FANS), ansiolitici, psicofarmaci, diuretici, antipertensivi, antibatterici) è stata ottenuta dai dati pubblicati da AIFA (Agenzia Italiana Del Farmaco) per l'anno 2014 (AIFA, 2015). I consumi medi su base nazionale sono stati incrociati con i dati di consumo legati alla realtà trentina (<https://www.apss.tn.it/-/servizio-farmaceutico>) e normalizzati alle presenze turistiche e al numero di residenti per lo stesso anno.

Vitamine, elettroliti, aminoacidi, peptidi, proteine, carboidrati, lipidi e medicinali a base di erbe non sono stati inclusi nella lista, in quanto, per loro natura, è improbabile che possano rappresentare un rischio significativo per l'ambiente.

I carichi ambientali teorici sono stati calcolati dall'ammontare dei farmaci prescritti definiti in termini di dosi definite giornaliere (DDD) per 1000 abitanti [DDD/1000inh/day]). Questi dati sono stati moltiplicati per il valore di DDD per ciascun principio attivo (WHO, http://www.whocc.no/atc_ddd_index/), convertiti in kg consumati in un anno e normalizzati alle presenze nell'area di studio. Dalla lista originaria sono stati, così, selezionati i 70 p.a. più consumati.

Per i prodotti per la cura personale sono stati selezionati 21 p.a. appartenenti a differenti categorie di uso (parabeni, agenti antibatterici, conservanti, surfattanti, composti quaternari di ammonio, repellenti per insetti, fragranze, silossani, filtri UV e dolcificanti artificiali). Per questi ultimi i consumi medi locali sono stati stimati a partire dai consumi medi in Europa desunti da reports e riviste scientifiche internazionali.

b. Caratterizzazione della esposizione

La stima della potenziale esposizione dei PPCP nelle acque superficiali è stata effettuata attraverso il calcolo della Predicted Environmental Concentration (PEC_{sw}) secondo l'equazione 1.

I farmaci vengono escreti dopo avere subito una parziale o completa metabolizzazione nell'organismo umano, per cui il carico di p.a. che raggiunge gli impianti di trattamento viene corretto tenendo conto del tasso di escrezione (Tabella 3).

Tabella 3 - Tassi di escrezione in organismo umano e percentuali di rimozione in impianti di trattamento convenzionali dei PPCP selezionati.

Principi attivi	% di escrezione	% rimozione in impianti di trattamento	Principi attivi	% di escrezione	% rimozione in impianti di trattamento
amoxicillin	80	88	fenofibrate	25	50
bisphenol A	/	85	diethyltoluamide	/	10
levofloxacin	88	58	methylparaben	/	78
clarithromycin	35	8	acetylsalicylic acid	1	81
BAC C12	/	95	decamethylcyclopentasiloxane	/	90

Principi attivi	% di escrezioni	% rimozione in impianti di trattamento	Principi attivi	% di escrezione	% rimozione in impianti di trattamento
ciprofloxacin	70	57	propranolol	0.5	29
triclosan	/	50	furosemide	90	95
cocoamidopropyl betaine	/	90	codeine	70	38
DDAC-C10	/	90	atenolol	90	57
triclocarban	/	39	citalopram	90	5
sulfamethoxazole	30	24	sotalol	90	40
azithromycin	14	11	timololo	90	25
diclofenac	61	18	esomeprazole	20	10
dodecamethylcycl ohexasilane	/	90	venlafaxine	90	5
galaxolide	/	56	metoprolol	30	29
tetracycline	90	40	benzophenone-4	/	62
naproxen	70	47	gemfibrozil	2	46
ibuprofen	27	80	fluoxetina	25	59
trimethoprim	80	31	hydrochlorothiazide	95	31
carbamazapine	61	36	sucralose	98	0.2
caffeine	3	90	metformina butylated	81	98
atorvastatin	5	48	hydroxyanisole	/	83.9
tonalide	/	74	ranitidina	79	90
erythromycin	5	25	valsartan	87	84.1
ketoprofen	81	30	olmesartan	90	19.53
irbesartan	3	6	propylparaben	/	99.7
butylated hydroxytoluene	/	89.2	ethylparaben	/	99.7
benzophenone-3	/	68	losartan	5	55.1
acetaminophen	55	92	butylparaben	/	99.9
bezafibrate	50	30			

Per i prodotti per la cura personale a parte qualche eccezione (es. dolcificanti) è stato adottato un approccio conservativo: cioè si assume che l'intero ammontare di p.a. consumato raggiunge l'impianto di depurazione.

I valori di PEC_{sw} in entrambi i casi sono stati rifiniti tenendo conto della percentuale di rimozione, riportata nella recente letteratura scientifica, in impianti convenzionali di trattamento acque reflue e selezionati secondo l'approccio conservativo di caso peggiore (Tabella 3).

I valori di PEC_{sw} per l'ambiente acquatico su base annuale sono stati ottenuti secondo la seguente equazione:

$$PEC_{sw} = \frac{(C * \% \text{ excr})(100 - R_{STP})}{WW_{inhab} * hab * D * gg * 100} \quad \text{Eq. 1}$$

In cui:

C è l'ammontare di p.a. consumato nell'area di studio in kg in un anno;

% *excr* è la percentuale del composto parentale escreto tal e quale;
 R_{STP} è percentuale di rimozione in un impianto convenzionale di trattamento acque reflue;
 $WWinhab$ rappresenta il volume delle acque reflue pro capite al giorno ($320 \text{ L inh}^{-1} \text{ d}^{-1}$; dati del depuratore del Tonale);
hab è la popolazione considerata nell'area di studio (presenze turistiche più residenti);
 D è il fattore di diluizione dopo lo scarico in acque superficiali (valore di default 10 in EU; EC, 2003);
 gg indica il numero di giorni considerati nel calcolo finale.

I risultati ottenuti hanno consentito la selezione dei 38 p.a. contenuti in prodotti ad uso farmaceutico con i più alti valori di PECsw.
 In Tabella 4 sono riportati i valori di PECsw dei 59 PPCP (38 farmaci e 21 PCP) selezionati.

Tabella 4 - Valori di Concentrazione stimati per le acque superficiali (ng/L) dei PPCP selezionati (risultati riportati secondo ordine alfabetico).

Principi attivi	PECsw	Principi attivi	PECsw	Principi attivi	PECsw
acetaminophen	62.3	codeine	5.29	losartan	2.70
acetylsalicylic acid	96.4	DDAC-C10	1008	metformina	26.5
amoxicillin	315	decamethyl		methylparaben	235.6
atenolol	90.7	cyclopentasiloxae	51.1	metoprolol	98.5
atorvastatin	5.36	diclofenac	65.7	naproxen	46.4
azithromycin	27.3	diethyltoluamide	84.7	olmesartan	51.4
BAC C12	504	dodecamethylcyclohe		propranolol	0.58
benzophenone-3	247.1	xasilane	51.1	propylparaben	0.54
benzophenone-4	651.0	erythromycin	1.17	ranitidina	18.5
bezafibrate	6.56	esomeprazole	22.6	sotalol	78.6
bisphenol A	2020	ethylparaben	0.54	sucralose	458.5
butylated		fenofibrate	18.0	sulfamethoxazole	42.8
hydroxyanisole	4.08	fluoxetina	0.90	tetracycline	16.9
butylated		furosemide	13.5	timololo	26.2
hydroxytoluene	59.9	galaxolide	1412	tonalide	209.3
butylparaben	0.0008	gemfibrozil	0.81	triclocarban	105
caffeine	375	hydrochlorothiazide	19.8	triclosan	417
carbamazepine	183	ibuprofen	1.10	trimethoprim	13.8
ciprofloxacin	56	irbesartan	18.3	valsartan	87.4
citalopram	25.7	ketoprofen	114	venlafaxine	90.8
clarithromycin	272	levofloxacin	110		
cocoamidopropyl					
betaine	9224				

c. Caratterizzazione degli effetti

Per la selezione delle molecole da monitorare il criterio basato sui consumi o sulla potenziale concentrazione rinvenibile nelle acque superficiali rappresenta sicuramente un criterio logico; tuttavia alcune sostanze attive possono risultare estremamente tossiche per la vita acquatica già a basse concentrazioni per cui può risultare utile ricercarne la presenza a discapito delle sostanze più abbondanti ma i cui effetti sono trascurabili. Per tale motivo in questo lavoro sono state combinate, per ciascun p.a., le informazioni sulla potenziale esposizione con le informazioni sugli effetti tossici esercitati sugli organismi acquatici secondo le indicazioni delle linee guida ufficiali dell'Unione Europea sulla valutazione del rischio ambientale posto in essere da sostanze chimiche e farmaci ad uso umano EC, 2003; EMA 2006).

In questa fase, per i 59 p.a. classificati sulla base della esposizione ambientale (PEC_{sw}) è stata effettuata una caratterizzazione degli effetti tossici (es. NOEC; L(E)C50) esercitati sugli organismi non target rappresentativi dei principali livelli trofici del compartimento acquatico (alghe, *Daphnia magna*, pesci). La caratterizzazione degli effetti è stata eseguita attraverso la definizione dei valori di Predicted No-Effect Concentration (PNEC) secondo le indicazioni delle linee guida ufficiali (EC, 2003; EMA 2006).

La PNEC viene definita come la concentrazione di una sostanza chimica dalla quale non ci si aspetta nessun effetto tossico per gli organismi del comparto ambientale considerato e per qualsiasi durata di esposizione. Laddove presenti, i valori di PNEC sono stati direttamente ottenuti da dati disponibili in letteratura; in alternativa sono stati calcolati a partire dai dati di tossicità sperimentale, selezionando il più basso valore di NOEC e/o di L(E)C50 a cui è stato applicato un appropriato fattore di assestamento (AF). In accordo con le procedure ufficiali di valutazione del rischio ambientale di prodotti chimici il fattore di assestamento ha lo scopo di coprire diversi tipi di incertezza: l'incertezza dovuta alla necessità di estrapolare i dati ecotossicologici dal laboratorio al campo, le incertezze dovute ad una variabilità inter- e intra- specifica nei risultati ottenuti, le differenze in sensibilità tra le specie etc.

In mancanza di dati sperimentali, la tossicità acuta è stata stimata mediante le equazioni QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) per i composti a comportamento narcotico non polare (baseline toxicity) e narcotico polare. Secondo queste equazioni, la tossicità di un composto viene espressa in funzione della sua idrofobicità attraverso l'uso del coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}).

Per ciascun p.a. è stato selezionato il più basso valore di PNEC tra i tre livelli di organismi acquatici indicati sopra (Tabella 5) in quanto si assume che proteggendo la specie più sensibile viene assicurata la protezione della struttura e della funzione dell'intero ecosistema.

Tabella 5 - Valori di PNEC ($\mu\text{g/L}$) ottenuti per l'ambiente acquatico per i PPCP selezionati (risultati riportati secondo ordine alfabetico).

Principi attivi	PNEC	Principi attivi	PNEC	Principi attivi	PNEC
acetaminophen	2.04	codeine	0.98	losartan	175.3
acetylsalicylic acid	6.4	cyclopentasiloxane		metformina	64.0
amoxicillin	0.0022	DDAC-C10	0.38	methylparaben	15
atenolol	20	decamethyl	4.4	metoprolol	61.5

Principi attivi	PNEC	Principi attivi	PNEC	Principi attivi	PNEC
atorvastatin	0.086	diclofenac	0.05	naproxen	0.33
azithromycin	0.019	diethyltoluamide	5.2	olmesartan	600
BAC C12	0.04	dodecamethylcycloh		Principi attivi	PNEC
benzophenone-3	6.0	exasilane	0.07	propranolol	0.05
benzophenone-4	570	erythromycin	0.02	propylparaben	20.0
bezafibrate	0.23	esomeprazole	10.2	ranitidina	66.0
bisphenol A	0.06	ethylparaben	23.0	sotalol	26.39
butylated		fenofibrate	0.78		
hydroxyanisole	10.0	fluoxetina	1.02	sucralose	930
butylated					
hydroxytoluene	1.4	furosemide	1.56	sulfamethoxazole	0.027
butylparaben	20.0	galaxolide	6.8	tetracycline	0.09
caffeine	5.2	gemfibrozil	0.90	timololo	9.0
carbamazepine	2.5	hydrochlorothiazide	34.4	tonalide	3.5
ciprofloxacin	0.005	ibuprofen	0.01	triclocarban	0.058
citalopram	8.0	irbesartan	0.354	triclosan	0.05
clarithromycin	0.02	ketoprofen	2.0	trimethoprim	0.16
cocoamidopropyl					
betaine	3.0	levofloxacin	0.0079	valsartan	850
				venlafaxine	47.58

d. Caratterizzazione del Rischio e prioritizzazione finale.

La lista finale di priorità dei PPCP è stata ottenuta quantificando il rischio associato all'esposizione ambientale tramite il confronto tra le PECsw e le PNEC calcolate (PECsw/PNEC) (Tabella 6 e Figura 9). Si sospetta un rischio non accettabile per l'ambiente quando la concentrazione prevista per ciascun p.a. supera o eguaglia la concentrazione predetta di non effetto per la vita acquatica ($PECsw/PNEC \geq 1$). In accordo con i risultati di studi di precedenti autori (Hernando et al., 2006) il livello di rischio è stato classificato come basso per valori del rapporto PECsw/PNEC compresi tra 0.01 e 0.1; medio per valori compresi tra 0.1 e 1 ed elevato per valori maggiori di 1.

Tabella 6 - Livello di Rischio (PEC/PNEC) per l'ambiente acquatico per i PPCP selezionati (risultati riportati secondo ordine alfabetico).

Principi attivi	PEC/ PNEC	Principi attivi	PEC/ PNEC	Principi attivi	PEC/ PNEC
acetaminophen	3.1E-02	cocoamidopropyl betaine	3.1E+00	metformina	4.1E-04
acetylsalicylic acid	1.5E-02	codeine	5.4E-03	methylparaben	1.6E-02
amoxicillin	1.4E+02	DDAC-C10	2.7E+00	metoprolol	1.6E-03
atenolol	4.5E-03	Decamethyl cyclopentasiloxane	1.2E-02	naproxen	1.4E-01
atorvastatin	6.2E-02	diclofenac	1.3E+00	olmesartan	8.6E-05
azithromycin	1.4E+00	diethyltoluamide	1.6E-02	propranolol	1.2E-02

BAC C12	1.3E+01	Dodecamethyl cyclohexasilane	7.3E-01	propylparaben	2.7E-05
benzophenone-3	4.1E-02	erythromycin	5.9E-02	ranitidina	2.8E-04
benzophenone-4	1.1E-03	esomeprazole	2.2E-03	sotalol	3.0E-03
bezafibrate	2.9E-02	ethylparaben	2.3E-05	sucralose	4.9E-04
bisphenol A	3.4E+01	fenofibrate	2.3E-02	sulfamethoxazole	1.6E+00
butylated hydroxyanisole	4.1E-04	fluoxetina	8.8E-04	tetracycline	1.9E-01
butylated hydroxytoluene	4.3E-02	furosemide	8.7E-03	timololo	2.9E-03
butylparaben	3.8E-08	galaxolide	2.1E-01	tonalide	6.0E-02
caffeine	7.2E-02	gemfibrozil	9.0E-04	triclocarban	1.8E+00
carbamazapine	7.3E-02	ibuprofen	1.1E-01	triclosan	8.3E+00
ciprofloxacin	1.1E+01	idroclorotiazide	5.8E-04	trimethoprim	8.6E-02
citalopram	3.2E-03	irbesartan	5.2E-02	valsartan	1.0E-04
clarithromycin	1.4E+01	ketoprofen	5.7E-02	venlafaxine	1.9E-03
		levofloxacin	1.4E+01		

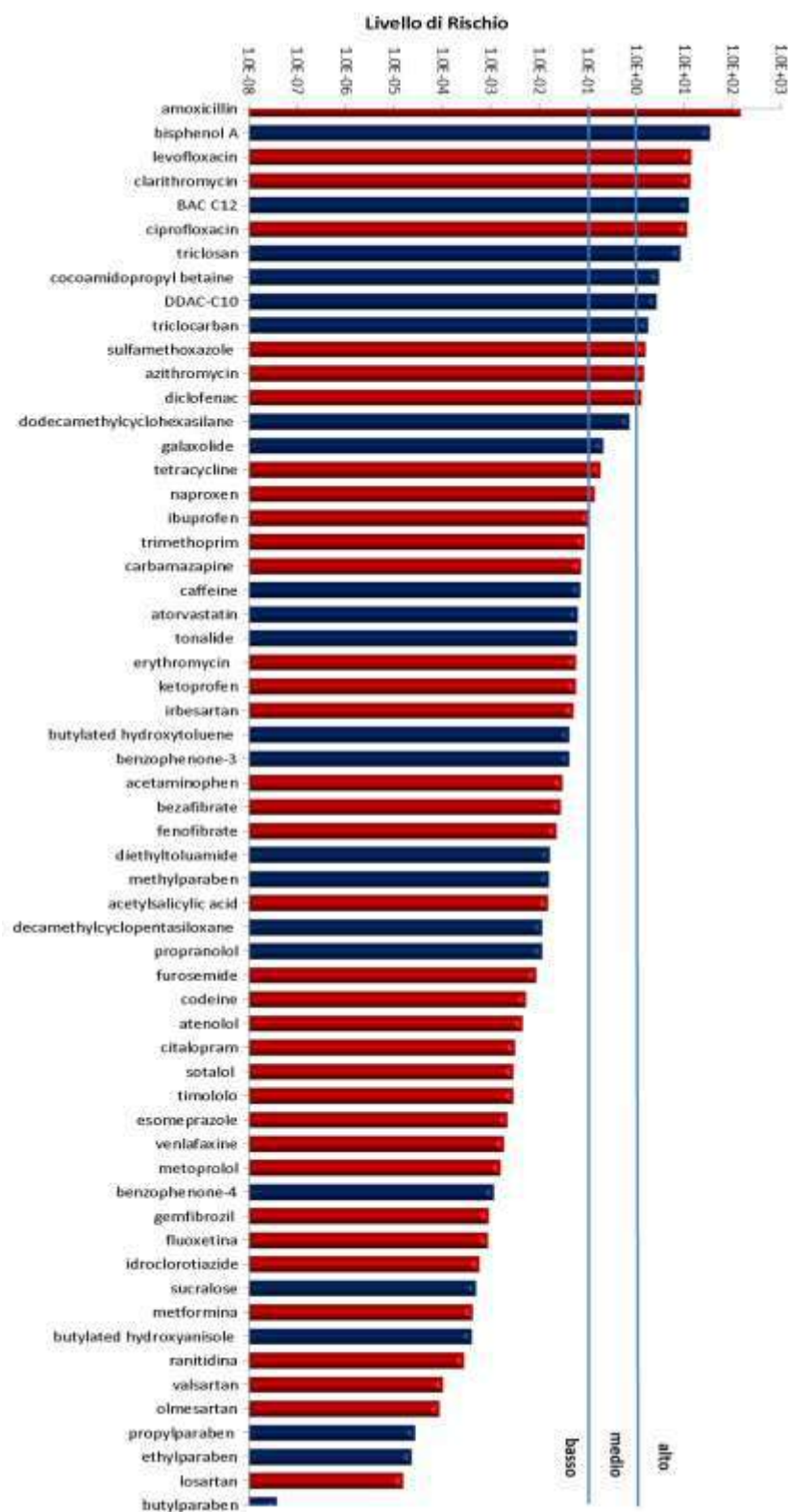


Figura 9 - Ranking dei PPCP in funzione del rischio per l'ambiente acquatico in esame.

Tra i 37 farmaci presenti nella lista finale di priorità ottenuta nel corso del primo anno del progetto (WP1), 22 sono stati ricercati nelle acque superficiali a valle del depuratore di Passo del Tonale e tra questi, 17 e 16 sono stati ritrovati nei campioni di acqua prelevati rispettivamente in inverno (febbraio) e in estate (giugno) 2016. Al fine di effettuare una corretta prioritizzazione dei composti chimici, l'ordine della classificazione basata sul rischio è rilevante in quanto la lista di priorità finale viene solitamente utilizzata per la selezione dei composti su cui concentrare ulteriori sforzi gestionali. Per questo motivo, la classificazione del rischio legato alla presenza di farmaci ad uso umano nell'area di studio ottenuta sulla base delle concentrazioni predette (PEC) per le stagioni invernale ed estiva è stata confrontata con quella ottenuta utilizzando i valori misurati (MEC) negli stessi periodi (Figura 10 e Figura 11). Il valore di MEC dei prodotti farmaceutici ritrovati nel torrente a concentrazione inferiore al limite di quantificazione dello strumento (LOQ) (bezafibrate, erythromicina, gemfibrozil, metformina, sulfametoxazole) è stato indicativamente fissato al LOQ. Da questo confronto è stato escluso per la stagione invernale l'antidiabetico metformina in quanto il LOQ (253 ng/L) è risultato essere ben al di sopra del valore di concentrazione stimato ($PEC_{sw} = 19,8 \text{ ng/L}$; inverno); quindi nulla può essere detto, in questo caso, sull'accuratezza della stima del carico ambientale.

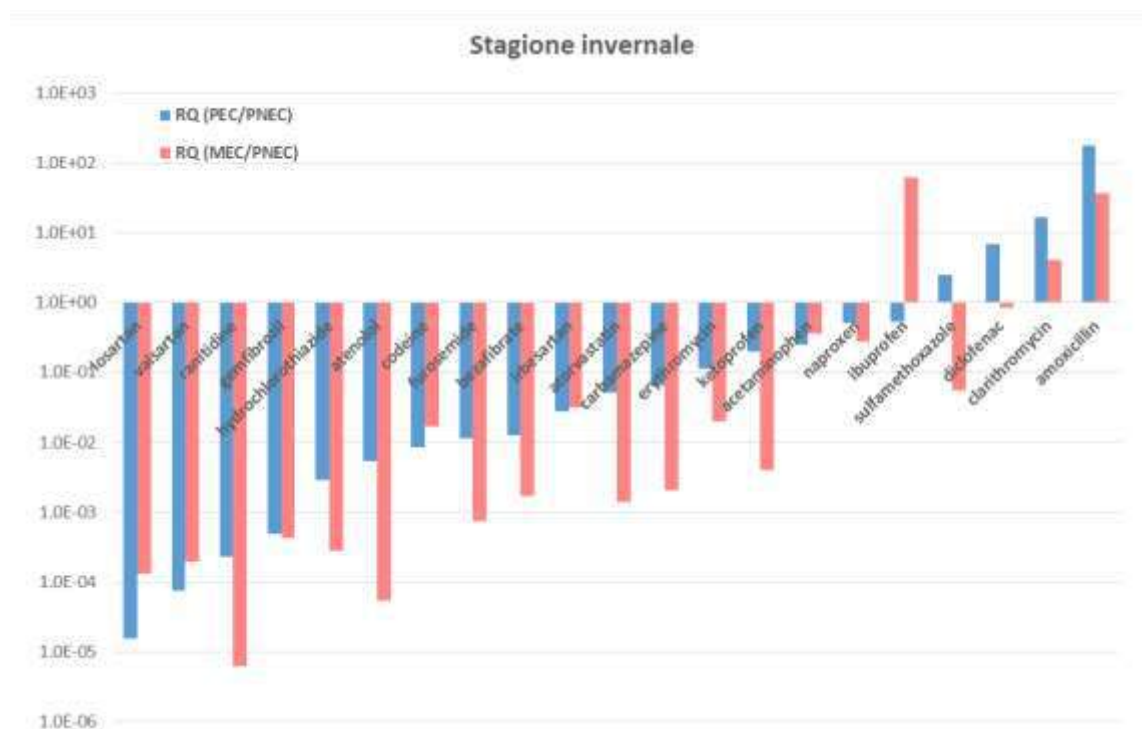


Figura 10 - Confronto della classificazione del rischio ottenuta dai quozienti di rischio (RQ) basati sulla concentrazione ambientale predetta (PEC) (in blu) e misurata (MEC) (in rosso) per il torrente Vermigliana a valle del depuratore di Passo del Tonale (stagione invernale).

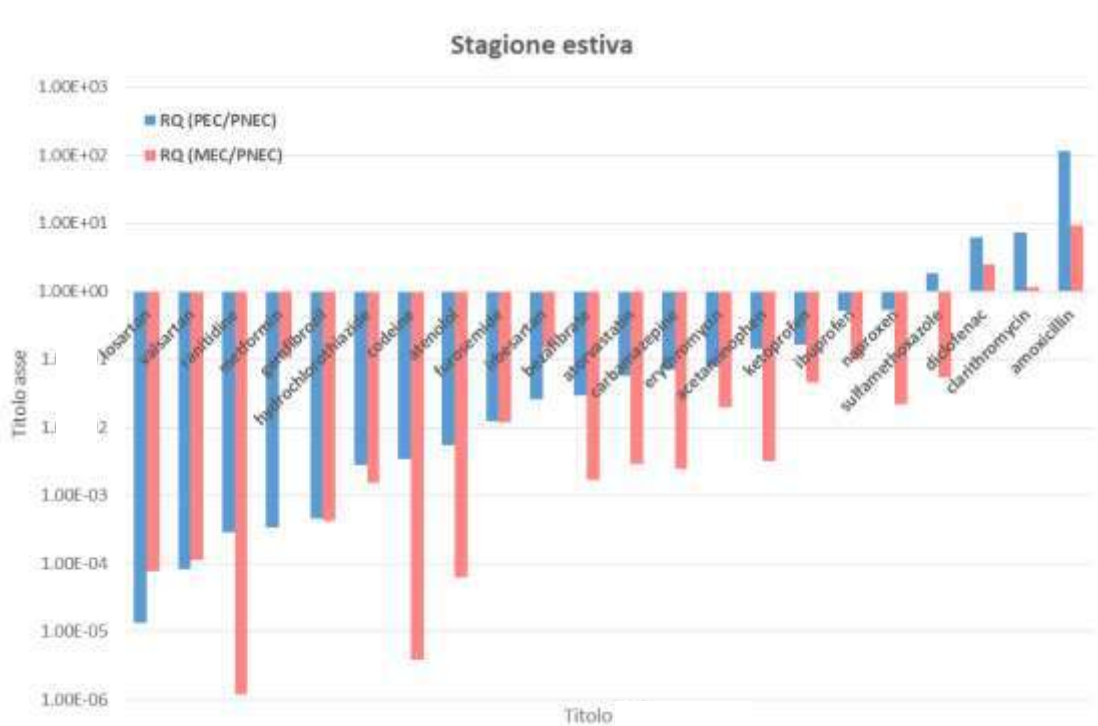


Figura 11 - Confronto della classificazione del rischio ottenuta dai quozienti di rischio (RQ) basati sulla concentrazione ambientale predetta (PEC) (in blu) e misurata (MEC) (in rosso) per il torrente Vermigliana a valle del depuratore di Passo del Tonale (stagione estiva).

Da questo confronto risulta che per la stagione invernale è stata rispettata la classe di rischio ecologico per la quasi totalità delle sostanze: i composti individuati come preoccupanti per l'ambiente acquatico nell'area di studio sulla base dei valori di MEC sono sostanzialmente gli stessi che erano stati individuati come a rischio sulla base dei valori di PEC, e quelli classificati come a basso rischio sulla base dei valori di MEC erano classificati come a basso rischio usando le PEC (Figura 10), con qualche eccezione rappresentata principalmente dall'antibiotico sulfamethoxazole, e dagli anti-infiammatori ibuprofene e ketoprofene.

Sulla base dei valori misurati, il sulfamethoxazole e il ketoprofene sono stati identificati come farmaci che non presentano un rischio inaccettabile per il comparto acquatico in quanto non ritrovati fino al valore LOQ (sulfamethoxazole) o ritrovati a bassa concentrazione (ketoprofene). In questi casi, i modelli applicati per il calcolo PEC hanno prodotto una sovrastima dell'effettivo carico ambientale. Al contrario, una significativa sottostima della concentrazione ambientale è stata prodotta per l'ibuprofene che è risultato essere il composto a più alto rischio ($MEC/PNEC > 1$) in quanto ritrovato a concentrazioni molto elevate ($MEC = 619 \text{ ng/L}$).

Occorre sottolineare che i valori di concentrazione ambientale misurata rappresentano spesso valori istantanei o giornalieri associati a uno specifico periodo di campionamento che in alcuni casi possono essere rappresentativi di episodi cruciali o possono mancarli (Guillén et al., 2012). Inoltre, alcune discrepanze potrebbero essere anche dovute allo specifico protocollo di campionamento adottato per le misure analitiche e/o ad errori/incertezze relativi ai metodi di misurazione che possono influenzare l'accuratezza delle determinazioni MEC (Ort et al., 2010). Per questi motivi, valori differenti di MEC possono essere registrati per lo stesso sito di studio. Al contrario, i modelli per la stima

delle PEC forniscono valori di concentrazione mediati nel tempo (ad esempio un anno o una stagione) e nello spazio (sulla base dell'area considerata per la stima dei consumi). Ad ogni modo, diversi possibili fattori di discrepanza tra i valori di MEC e di PEC possono essere strettamente correlati a ciascuno dei singoli termini dell'equazione utilizzata per il calcolo PEC; altri possono riferirsi a specifiche proprietà chimico-fisiche delle sostanze che guidano il loro destino ambientale una volta scaricati in ambiente acquatico. Un primo importante fattore di discrepanza tra i valori PEC e MEC si riferisce al reale trend dei consumi stimati per l'area di studio. I consumi potrebbero essere molto diversi rispetto alle stime effettuate, specialmente a livello locale e considerando uno specifico periodo di campionamento. Nel nostro studio, i dati sui consumi (compresi i farmaci da banco) sono stati estrapolati dai dati di vendita su base mensile e su scala regionale (dati di vendita per tutta la provincia di Trento. APPA, 2012) e normalizzati al numero di residenti e di turisti presenti per l'intera Val di Sole. Questa può essere considerata una stima accettabile. Ad ogni modo, alcuni dati di consumo potrebbero non essere registrati per la Provincia di Trento; per esempio, alcuni farmaci per automedicazione potrebbero essere stati acquistati altrove dai turisti e portati in vacanza causando una sottostima delle previsioni effettuate.

Fattori significativi di variabilità per le predizioni ambientali sono legati alla scelta del tasso di escrezione nel corpo umano per i farmaci e alla efficienza di rimozione negli impianti di depurazione. L'ampia variabilità dei dati esistenti in letteratura rende difficile calcolare con precisione il valore di PEC per le acque superficiali. Nel nostro studio, in accordo al principio di precauzione, è stato adottato lo scenario di caso peggiore nella selezione dei dati da letteratura. In alcuni casi, i valori scelti potrebbero essere troppo conservativi, portando a una stima più elevata delle concentrazioni ambientali rispetto a quelle reali. La reale efficienza di rimozione in un impianto specifico di depurazione come quello di Passo del Tonale potrebbe essere molto diversa da quella estrapolata in quanto le prestazioni possono spesso essere strettamente correlate alla specifica configurazione e alla modalità operativa dell'impianto di trattamento (Sui et al., 2011).

Per quanto riguarda la stagione estiva si osserva una variabilità maggiore nei valori di RQ ottenuti usando le concentrazioni misurate. Tuttavia, anche in questo caso i composti classificati con un rischio potenziale elevato sulla base delle PEC risultano ad alto rischio anche considerando le MEC (amoxicillina, diclofenac, clarythromicina). La principale eccezione anche in questo caso è rappresentata dall'antibiotico sulfamethoxazole ancora una volta non ritrovato nelle acque del torrente durante la campagna di campionamento estivo. Per quanto riguarda i composti per i quali era stato predetto un potenziale rischio medio per l'area di studio (naproxen, ibuprofen, acetaminophen e ketoprofene), a parte l'ibuprofen, le predizioni hanno fornito una sovrastima delle concentrazioni ambientali. Sovrastima che in molti casi rientra nel normale range di variabilità legato all'approccio di caso peggiore seguito nello studio. In generale per la stagione estiva le concentrazioni misurate risultano più basse rispetto alla stagione invernale. Questo risultato oltre ad essere dovuto alla minore presenza turistica registrata, può essere verosimilmente ascrivito alla maggiore diluizione presente nei corsi d'acqua nelle aree di alta montagna nei mesi estivi, dovuto allo scioglimento della neve. Maggiore diluizione che porta a una generale minore concentrazione dei composti ritrovati nei corpi idrici. In alcuni casi, in dipendenza delle specifiche proprietà chimico-fisiche delle molecole in oggetto, le maggiori temperature estive potrebbero favorire anche i naturali processi di degradazione ambientale (idrolisi, foto degradazione, biodegradazione, ecc.) di specifici composti. Tuttavia è possibile affermare che, sia pure

con qualche eccezione e in accordo al principio precauzionale adottato, le concentrazioni predette e osservate presentano un trend simile anche in estate. Per la corretta stima del carico ambientale dei contaminanti la possibilità di accedere alle informazioni legate ai consumi locali inclusi i cosiddetti over-the-counter (farmaci da banco) risulta di fondamentale importanza. Da letteratura è stato più volte dimostrato che la mancata inclusione di questa categoria di farmaci nella stima dei carichi ambientali può portare a una severa discrepanza tra dati misurati e predetti (Burns et al., 2017). Ulteriori indagini sono necessarie per l'antibiotico sulfametoxazole il cui carico è risultato sempre sovrastimato. La causa della discrepanza va ricercata in uno dei dati in input utilizzati nell'applicazione del modello matematico utilizzato.

Una stima affidabile delle PEC rappresenta un punto cruciale ai fini di una corretta classificazione di rischio dei composti chimici, pertanto la selezione di parametri che abbiano una rilevanza predittiva sito-specifica risulta fondamentale per un corretto uso dello strumento di classificazione del rischio a scopi gestionali. In questa indagine lo strumento di previsione del rischio proposto ha prodotto risultati simili al reale rischio associato alle concentrazioni ritrovate in entrambe le stagioni, pertanto lo stesso risulta validato per la realtà in studio.

In conclusione da queste indagini emerge che la presenza di antibiotici e anti infiammatori nell'area di studio rappresenta un rischio reale per la vita acquatica nel medio e lungo periodo. L'elevato carico è associato alla elevata pressione turistica e alle limitate capacità depurative di un impianto di trattamento che non è progettato per sopportare i picchi di contaminanti scaricati nelle alte stagioni. La presenza di antibiotici in ambiente acquatico di alta montagna inoltre rappresenta un problema da non sottovalutare in quanto capace di promuovere la selezione di geni resistenti nelle comunità autoctone dei torrenti alpini.

Prioritizzazione dei prodotti fitosanitari attualmente in uso (CUP)

L'approccio seguito per ottenere la lista di priorità dei CUP è basato sulle informazioni richieste dall'allegato VI della direttiva 414/91/CE relativa alla immissione in commercio dei prodotti fitosanitari (Principi Uniformi). In aggiunta alle informazioni richieste dai Principi Uniformi, per questo lavoro sono stati presi in considerazione anche i dati di tossicità sul batterio *Aliivibrio fischeri* allo scopo di includere anche gli organismi decompositori nella caratterizzazione degli effetti.

Selezione delle sostanze attive presenti nei CUP

Sulla base dei dati di uso del territorio, la superficie maggiore nel bacino del T. Noce è coltivata a melo. Gli ettari totali nella Val di Sole sono di circa 350. A questo scopo sono stati selezionati gli 11 p.a contenuti in prodotti fitosanitari più venduti per le coltivazioni di melo (rapporto AAF Trento, 2012). L'elenco è riportato in Tabella 8.

Caratterizzazione della esposizione

Per i p.a. individuati sono state calcolate le concentrazioni predette nelle acque superficiali (PEC_{sw}) per mezzo dell'utilizzo di modelli predittivi di destino ambientale elaborati dai gruppi di lavoro FOCUS (FORum for the Co-ordination of pesticide fate models and their USE). Nello specifico i modelli FOCUS, applicati in fase di autorizzazione all'uso dei pesticidi, sono stati utilizzati per effettuare delle simulazioni relativamente alle principali vie di ingresso dei p.a. nei corpi idrici: ovvero deriva (modello

SWASH), run-off (modello PRZM) e relativamente al destino ambientale finale in acqua (modello TOXSWA). Tutti questi modelli vengono integrati dal modello SWASH che funziona da database per le proprietà chimico fisiche dei p.a. e per i dati di uso per le coltivazioni di melo necessari alle simulazioni (Tabella 7, Tabella 8).

Tabella 7 - Proprietà chimico fisiche dei prodotti fitosanitari selezionati per il calcolo delle PECsw.

Principio attivo	Peso molecolare (g/mol)	Solubilità (mg/L)	Tensione di vapore (PA)	Koc (L/Kg)	1/n
Boscalid	343.21	4.6	7.20E-07	808.5	0.864
Captan	300.6	5.2	4.20E-06	200	default
Chlorantraniliprole	483.15	0.88	6.30E-12	362	0.95
Chlorpyrifos	350.59	1.05	1.43E-03	8151	default
Cyprodinil	225.29	13	5.10E-04	2277	0.888
Difenoconazole	406.26	15	3.33E-07	3760	0.87
Dithianon	296.33	0.22	1.00E-09	3627	default
Imidacloprid	259.69	610	4.00E-09	225	0.802
Methoxyfenozide	368.47	3.3	1.48E-05	402	N.T.
Pendimethalin	281.3	0.33	1.94E-03	17581	0.969
Pyraclostrobin	387.82	1.9	2.60E-07	9304	0.83

Principio attivo	LogKow	DT suolo	DT50 acqua/sedimento	DT50 acqua	DT50 sedimenti
Boscalid	2.96	118	342	3	66
Captan	2.5	3.7	1	0.6	1000
Chlorantraniliprole	2.86	204	170	23.5	343
Chlorpyrifos	4.7	21	36.5	5	33.5
Cyprodinil	4	45	142	12.5	275
Difenoconazole	4.36	85	315	3	1000
Dithianon	3.2	35	0.44	0.505	1000
Imidacloprid	0.57	174	129	30	1000
Methoxyfenozide	3.72	68	N.T.	7.9	1000
Pendimethalin	5.2	90	16	1000	16
Pyraclostrobin	3.99	32	28	2	9

Tabella 8 - Dati applicazione prodotti fitosanitari per le coltivazioni a melo (da etichette banca dati prodotti fitosanitari; Ministero della Salute, http://www.fitosanitari.salute.gov.it/fitosanitariwsWeb_new/FitosanitariServlet).

principio attivo	rata di applicaz. kg/ha	n. max di applicaz.	intervallo di applicaz. (d)	periodo di applicaz.	giorno giuliano	% crop
Boscalid	0.188	3	12	BBCH70	106	70
Captan	1.6	6	16	BBCH50	121	65
Chlorantraniliprole	0.06	2	14	BBCH 70	156	70
Chlorpyrifos	0.96	1	0	BBCH 51	122	65
Cyprodinil	0.38	4	6	BBCH09	105	50

Difenoconazole	0.075	4	10	BBCH61	137	65
Dithianon	0.5	6	16	BBCH30	112	65
Imidacloprid	0.18	1	0	BBCH 70	156	70
Methoxyfenozide	0.14	3	14	BBCH 55	128	65
Pendimethalin	1.32	1	1	BBCH 09	105	50
Pyraclostrobin	0.10	3	12	BBCH 50	121	65

Per lo studio in esame, si è deciso di effettuare simulazioni che hanno tenuto conto delle realistiche combinazioni di caratteristiche climatiche, pedologiche e colturali (scenari rappresentativi dei casi “peggiori” di aree agricole europee elaborati dai gruppi FOCUS) dell’area trentina. Anche in questo caso, laddove era previsto un range di dosi e/o di numero di applicazioni è stato scelto il caso rappresentativo dello scenario peggiore.

I dati delle concentrazioni ambientali previste per gli 11 p.a. sono riportati in Tabella 9.

Tabella 9 - Valori di Concentrazione (µg/L) di CUP stimati per le acque superficiali (in ordine di valori decrescenti di PECsw).

principio attivo	PECsw	principio attivo	PECsw
Captan	38.78	Methoxyfenozide	4.08
Chlorpyrifos	37.93	Pyraclostrobin	2.8
Dithianon	33.11	Difenoconazole	1.96
Cyprodinil	26.12	Chlorantraniliprole	1.92
Imidacloprid	6.96	Pendimethalin	0.71
Boscalid	5.32		

Caratterizzazione degli effetti

Da letteratura è stata effettuata una ricerca di dati sperimentali di tossicità acuta (L(E)C50) per alghe, *Daphnia magna*, pesci e *A. fischeri*. Laddove questi erano mancanti i dati di tossicità sono stati stimati mediante l’uso delle equazioni QSAR. I più bassi valori di tossicità selezionati per i 4 livelli trofici. sono riportati in Tabella 10.

Tabella 10 - Dati di tossicità acuta (L(E)C50) (µg/L) selezionati per il compartimento acquatico.

	EC50 alghe	EC50 D. magna	LC50 pesci	EC50 A. fischeri
Boscalid	3750	5330	2700	230800*
Captan	1180	7100	186	150
Chlorantraniliprole	39300*	12	73000*	403000*
Chlorpyrifos	480	0.1	1.3	2840
Cyprodinil	2600	220	2410	230000
Difenoconazole	32	770	1100	13200*
Dithianon	90	260	70	120
Imidacloprid	4052000*	85000	161000	61900*
Methoxyfenozide	4130*	3700	10300*	47800*

	EC50 alghe	EC50 D. magna	LC50 pesci	EC50 A. fischeri
Pendimethalin	6	280	140	225000
Pyraclostrobin	2340*	16	6	28100*

* valori calcolati con equazioni QSAR

Caratterizzazione del Rischio e prioritizzazione finale

I rapporti TER (Toxicity- Exposure Ratio) sono stati calcolati mettendo in relazione i dati di tossicità per gli organismi rappresentativi di ciascun livello trofico considerato (alghe; *Daphnia magna*, pesci e *A. fischeri*) con i valori di PECsw calcolati (EC50/PECsw alga; EC50/PECsw *Daphnia magna*; LEC50/PECsw pesce; EC50 *A. fischeri*).

Attribuzione di pesi e punteggi

Sono state utilizzate le classi di intervallo, i punteggi e i pesi utilizzati nel lavoro di Finizio et al. (2001) sul sistema di valutazione e classificazione del rischio associato all'uso di prodotti fitosanitari in diversi ecosistemi incluse le acque superficiali, come evidenziato in Tabella 11.

Tabella 11 - Intervalli di classificazione del Rischio, Punteggi e Pesì per organismi non target nei sistemi di acque superficiali.

alghe (A)		D. magna (B)		Pesci (C)		A. fischeri (D)	
(EC50/PEC)	Score	(EC50/PEC)	Score	(LEC50/PEC)	Score	(IC50/PEC)	Score
>10000	0	>10000	0	>10000	0	>10000	0
10000-1000	1	10000-1000	1	10000-1000	1	10000-1000	1
1000-100	2	1000-100	2	1000-100	2	1000-100	2
100-10	4	100-10	4	100-10	4	100-10	4
10-2	6	10-2	6	10-2	6	10-2	6
<2	8	<2	8	<2	8	<2	8
W = 3		W = 4		W = 5,5		W = 1,5	

(Modificato da Finizio et al. 2001)

Sono stimati gli ettari potenzialmente trattati con ciascun p.a. rapportando i volumi di vendita ai volumi massimi applicati su ettaro di terreno. Infine alle classi ottenute di ettari sono stati assegnati dei punteggi (Tabella 12).

Tabella 12 - Classi ettari di potenzialmente trattati e relativi punteggi attribuiti.

ha potenz. tratt.	Score
<300	1
301-1000	2
1001-3000	3
3001-6000	4
>6000	5

Alla fine applicando l'algoritmo creato (RANKPEST) è stata ottenuta la lista di priorità finale per i prodotti fitosanitari selezionati (eq. 2).

$$RANKPEST = \left\{ \sum \left[score \left(\frac{L(E)C50}{PEC_{sw}} \right)_{nto} * W_{nto} \right] \right\} * score \text{ ha pot. trat.} \quad \text{Eq. 2}$$

In cui

$score \left(\frac{L(E)C50}{PEC_{sw}} \right)_{nto}$ è il punteggio attribuito alle classi di valori EC50/PEC individuati per ciascun organismo non target (nto) (alga, *D. magna*, pesce, *A. fischeri*) secondo la Tabella 12;

W_{nto} è il peso attribuito al livello trofico considerato secondo la Tabella 12;

$score \text{ ha pot. trat}$ è il punteggio attribuito alle classi di ettari di terreno potenzialmente trattati.

Il risultato del ranking finale è riportato in Figura 12.

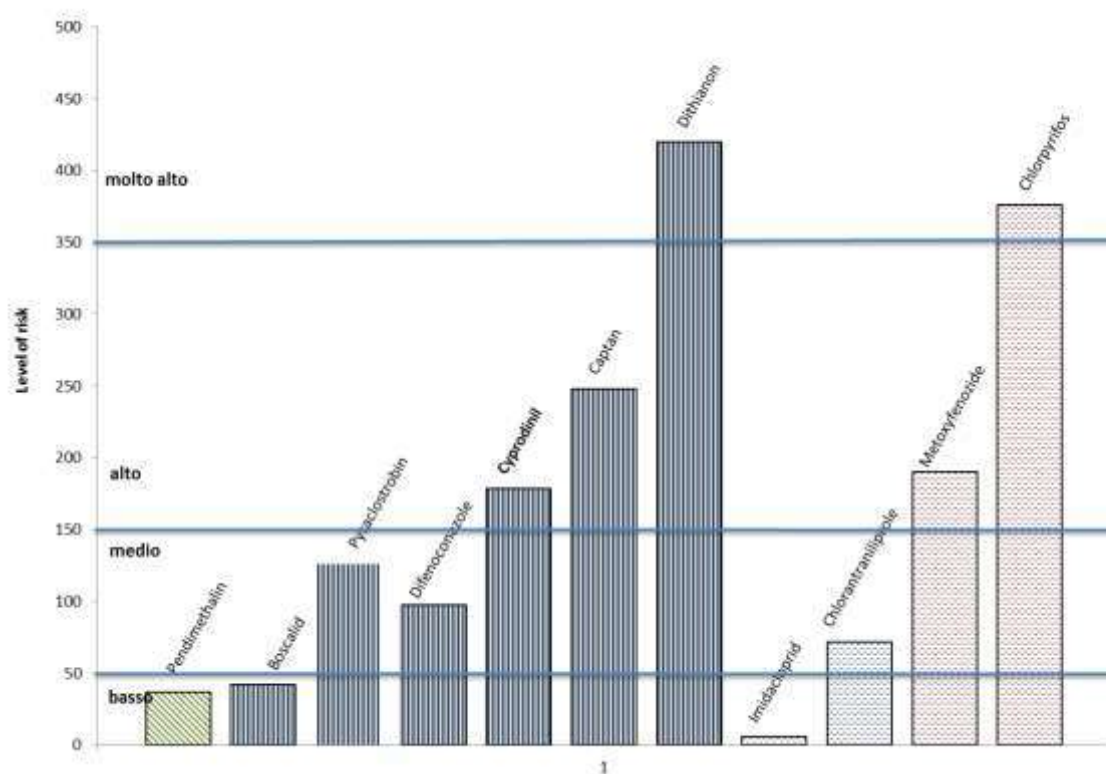


Figura 12 - Classificazione di Rischio per il compartimento acquatico dei CUP usati su melo.

Applicazione del modello “The OECD Pov& LRTP Screening Tool” per la previsione del trasporto atmosferico a media/lunga distanza dei CUP

Per la valutazione dell'impatto della coltivazione del melo sulle aree remote montane, è stato necessario valutare il potenziale trasporto in atmosfera. Per la sua quantificazione è stato applicato il modello “The OECD Pov& LRTP Screening Tool” (Wegmann et al., 2009).

I risultati ottenuti fanno riferimento alla persistenza complessiva (*overall persistence, Pov*), alla distanza di trasporto caratteristica (*Characteristic Travel Distance, CTD*) e all'efficienza di trasferimento (*transfer efficiency, TE*).

L'*overall persistence (Pov)*, espresso in giorni, fornisce una misura della scala di tempo necessaria per la degradazione di una sostanza chimica nell'intero ambiente.

Il *CTD*, espresso in km, quantifica la distanza tra il punto di rilascio ed il punto nel quale la concentrazione della sostanza scende al di sotto del 37% rispetto al valore iniziale.

Il *TE*, espresso in %, è un indicatore della potenzialità di *Long Range Atmospheric Transport*.

A differenza del *CTD* che fornisce indicazioni su quanto lontano può essere trasportata una sostanza, il *TE* esprime la quantità di sostanza che può raggiungere un sito ad una certa distanza.

Per il calcolo di questi indicatori di persistenza e del potenziale di long range transport, il modello richiede i seguenti parametri di *input*: peso molecolare della sostanza, logaritmo del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ($\log K_{ow}$), logaritmo del coefficiente di ripartizione aria/acqua ($\log K_{aw}$), tempi di emivita stimati nel suolo, in acqua e in aria (espressi in ore).

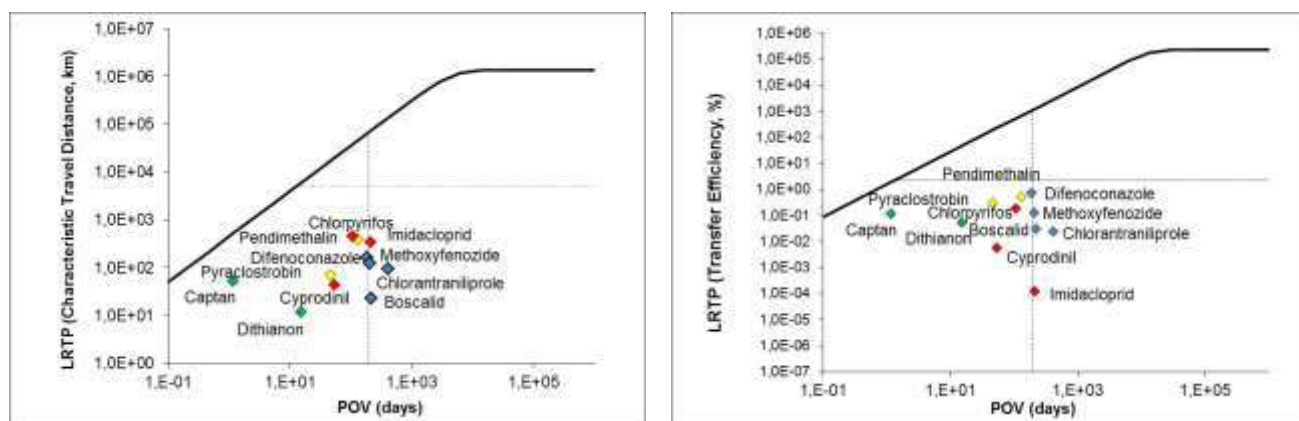


Figura 13 - Rappresentazione grafica dei risultati del modello: I valori di POV sono plottati in funzione del L RTP, espresso come CDT (sinistra) o TE (destra). I principi attivi sono colorati diversamente in funzione dei quantitativi venduti nella Provincia di Trento nell'anno 2012. Scala dei colori: verde > di 10.000 kg, 1.000 < rosso < 10.000 kg; 500 < verde < 1000 kg e giallo < 500 kg.

Sulla base dei risultati del modello (Figura 13) e dei carichi ambientali (kg di p.a. venduto nella zona) sono stati selezionati i seguenti p.a.:

- pendimethalin: con altissima TE, elevata CTD e un carico ambientale molto basso;
- chlorpyrifos: con alta TE, elevata CTD e un carico ambientale medio alto;
- captan e dithianon: con bassa TE, bassa CTD e un carico ambientale molto alto.

Questa lista è stata arricchita di altri 2 p.a. (terbutilazina e metholachlor) e il principale metabolita della terbutilazina (desethyl-terbutilazina). È noto che questi erbicidi, molto impiegati nel diserbo del mais nella Pianura Padana, subiscono un efficace trasporto a medio raggio in atmosfera (Ferrario et al., 2017). La loro inclusione nasce dall'esigenza di valutare sia il contributo delle attività agricole locali sia quelle a scala geografica più ampia.

3.12.2 Obiettivo 1.2: Messa a punto di una metodica analitica (marzo 2016-luglio 2016)

Sulla base dei risultati ottenuti nel punto 4.1.1 alcuni p.a. sono stati scelti come traccianti per le analisi chimiche delle acque di fusione glaciale e del Torrente Noce a monte ed a valle degli scarichi del depuratore del Tonale e di Campodенно.

Le metodiche sono state messe a punto mediante l'analisi di campioni di acqua MilliQ fortificata con concentrazioni note delle sostanze ricercate.

Le percentuali di recupero per tutte le molecole selezionate sono state superiori all'80%. Per tale motivo i valori di concentrazione riportati nel presente report non sono stati corretti.

Metodica per l'analisi dei farmaci nell'acqua del Torrente Noce in collaborazione con Istituto Farmacologico Mario Negri Milano ⁴

I campioni sono stati sottoposti a doppia filtrazione per eliminare il particolato sospeso, la prima filtrazione è avvenuta mediante filtri in microfibra di vetro GF/A con porosità di 1.6 µm (Whatman, Kent, U.K) e la seconda mediante filtri di nitrocellulosa con porosità di 0.45 µm (Millipore, Bedford, MA, USA).

La determinazione di farmaci e droghe d'abuso è stata effettuata mediante metodi messi a punto e validati precedentemente dal nostro gruppo di ricerca (Castiglioni et al., 2005; Castiglioni et al., 2006; Riva et al., 2015). Diverse aliquote dei campioni sono state preparate per l'estrazione su fase solida, 25 mL per i campioni in entrata ai depuratori e 100 mL per i campioni in uscita ai depuratori e quelli di acqua di superficie (Torrente Noce). I campioni sono stati acidificati a pH 2.0-2.5 con HCl (37%) e sono state aggiunte quantità note di alcuni composti marcati da usare come standard interni per la quantificazione. Le aliquote sono state sottoposte a estrazione su fase solida con cartucce a fase inversa apolare OASIS MCX con 60 mg di fase (Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA). Le cartucce sono state pre-condizionate con 6 ml di metanolo e 3 ml di acqua Milli-Q, portate a secco sotto flusso d'azoto ed eluite con 2.5 ml di metanolo e 2.5 ml di idrossido d'ammonio al 2% in metanolo. Gli eluati sono stati fatti evaporare sotto flusso d'azoto e poi risospesi in 100 µl di acqua Milli-Q.

Aliquote di 1 mL di ciascun campione sono state destinate all'analisi dell'etilsolfato, sono state centrifugate a 2500 rpm per 5 minuti e sono stati prelevati 190 µL per analisi diretta in HPLC, dopo l'aggiunta di opportuni standard marcati.

L'analisi dei campioni è stata effettuata mediante cromatografia liquida abbinata a spettrometria di massa in tandem. Il sistema HPLC utilizzato per l'analisi è costituito da due pompe cromatografiche Perkin-Elmer, Serie 200 e da un autocampionatore Perkin-Elmer, Serie 200 abbinati ad uno spettrometro di massa API5500 (AB Sciex, Thornhill, Ontario, Canada). In base ai composti da analizzare è stata adottata una modalità di ionizzazione sia positiva, sia negativa.

L'analisi quantitativa dei composti è stata effettuata utilizzando la modalità di analisi MRM (multiple reaction monitoring) che permette di analizzare le due principali transizioni ione precursore/ione frammento più abbondanti per ciascun composto. La

⁴ Analisi condotte dalla Dott.ssa Sara Castiglioni

quantificazione delle sostanze è stata effettuata applicando il metodo della diluizione isotopica creando rette di calibrazione esterne aggiungendo concentrazioni crescenti di ogni analita e rapportandole ad una concentrazione costante di standard interni marcati. Specifici criteri sono stati utilizzati per il riconoscimento di ciascun composto secondo le vigenti direttive (EC, 2002).

L'obiettivo principale dell'attività svolta è stato analizzare la presenza ed il destino ambientale di alcune classi di contaminanti emergenti in acque reflue e superficiali mediante spettrometria di massa. I campioni di acque reflue sono stati raccolti in entrata ed uscita ai depuratori di Passo del Tonale e di Campodенно e i campioni di acqua di superficie nel torrente Noce a monte e valle del depuratore situato al Passo del Tonale. Gli scopi principali del lavoro sono stati:

- identificare e quantificare farmaci, droghe d'abuso e alcool in campioni di acque reflue e superficiali per valutarne la presenza e il destino ambientale;
- stimare il consumo di droghe d'abuso e alcool nella popolazione a partire dall'analisi di metaboliti urinari in acque reflue non trattate.

I farmaci analizzati sono stati selezionati tra i più utilizzati a livello nazionale ed appartengono a differenti categorie terapeutiche, come antibiotici, antitumorali, anti-infiammatori, broncodilatatori, cardiovascolari, urologici, ad azione sul sistema nervoso, diuretici, gastrointestinali, ipolipemizzanti, ormoni naturali, sintetici ed alcuni metaboliti (Tabella 13).

Tabella 13 - Elenco dei farmaci analizzati.

FARMACI	CLASSE TERAPEUTICA
Acetaminofene	Analgesico/antipiretico
Amoxicillina	Antibiotico - penicillina
Atenololo	Betabloccante/antipertensivo
Atorvastatina	Regolatore lipidico
Bezafibrato	Regolatore lipidico
Carbamazepina	Antiepilettico
Ciprofloxacina	Antibiotico - chinolone
Claritromicina	Antibiotico - macrolide
Diazepam	Ansiolitico
Diclofenac	FANS
Enalapril	ACE inibitore
Eritromicina	Antibiotico - macrolide
Furosemide	Diuretico
Gemfibrozil	Ipolipemizzante
Idroclorotiazide	Diuretico/antipertensivo
Ibuprofene	FANS
Irbesartan	Antipertensivo
Ketoprofene	FANS
Lansoprazolo	Inibitore di pompa protonica
Lincomicina	Antibiotico - macrolide
Losartan	Antipertensivo
Metformina	Antidiabetico
Naprossene	FANS

FARMACI	CLASSE TERAPEUTICA
Ofloxacina	Antibiotico - chinolone
Oxitetraciclina	Antibiotico veterinario
Paroxetina	Antidepressivo
Ramipril	ACE inibitore
Ranitidina	Antistaminico
Rosuvastatina	Regolatore lipidico
Salbutamolo	Agonista beta-adrenergico
Simvastatina	Regolatore lipidico
Sulfametossazolo	Antibiotico - sulfamidico
Valsartan	Antipertensivo
ORMONI ESTROGENICI	
Estrone	Estrogeno naturale e semisintetico
Estradiolo	Estrogeno naturale e semisintetico
Etinil-Estradiolo	Estrogeno naturale e semisintetico
METABOLITI	
Deidroeritromicina	
Dimetil-Diazepam	Ansiolitico
Enalaprilat	ACE inibitore
Ramiprilat	ACE inibitore

Le droghe d'abuso analizzate sono state scelte tra quelle più utilizzate, includendo ove possibile i metaboliti urinari specifici (Tabella 14). E' stato inoltre incluso nella lista un farmaco opiaceo, la codeina, largamente utilizzato nella popolazione come sedativo della tosse.

Tabella 14 - Elenco delle droghe d'abuso e metaboliti analizzati.

DROGHE	METABOLITI
Cocaina	Benzolecgonina
	Norbenzolecgonina
	Norcocaina
	Cocaetilene
Amfetamina	
Metamfetamina	
MDMA (Ecstasy)	MDA
Codeina	6-acetilcodeina
Eroina	6-acetilmorfina
Morfina	Morfina-3 β -D-glucuronide
	Morfina-6 β -glucuronide
Metadone	EDDP
THC	THC-COOH
	OH-THC
Ketamina	Norketamina
	Deidronorketamina
Mefedrone	

Le stime dei consumi di droghe d'abuso, relativi alla popolazione afferente ai due depuratori, sono state effettuate mediante l'applicazione di un metodo innovativo, messo a punto dall'Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" di Milano, che prevede l'analisi di specifici metaboliti urinari in acque reflue non trattate. Il consumo di droghe d'abuso è stato valutato per le classi di droghe più utilizzate, tra cui cannabis, cocaina, eroina, amfetamina, metamfetamina ed ecstasy. Lo stesso metodo è stato inoltre applicato per stimare il consumo di alcool analizzando un metabolita secondario ma esclusivo dell'alcool, l'etilsolfato.

Metodica per l'analisi dei prodotti per la cura personale nell'acqua del Torrente Noce

La determinazione dei prodotti per l'igiene personale è stata effettuata mediante metodica messa a punto e validata in studi precedenti (Villa et al., 2012) oppure con metodi messi a punti e validati per questo progetto di ricerca.

I campioni, scongelati al buio, sono stati successivamente filtrati con filtri in fibra di vetro GF/A (Whatman, diametro 0.47 mm e porosità 1.6 µm). Aliquote da 250 mL sono state preparate per l'estrazione su fase solida.

Gli analiti presenti nella fase disciolta sono stati estratti dalla matrice acquosa tramite cartucce OASIS HLB (Oasis HLB, 6 cc/500 mg, LP Extraction cartridge, 60µm; Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA), attivate con 5 ml di metanolo e 5 ml di acqua MilliQ.

Al termine della filtrazione, per il recupero degli analiti trattenuti nella cartuccia, le SPE sono state eluite con 10 mL di metanolo (per il recupero di DEET e sucralosio) e con 10 ml di metanolo più 5 mL di acetato di etile (per il recupero delle fragranze tonalide e galaxolide).

Gli eluati così ottenuti sono stati concentrati fino al volume di 50 µl sotto flusso d'azoto.

Nel caso del sucralosio, prima dell'analisi al GC-MS è stata necessaria una derivatizzazione. I solventi estratti dalle eluizioni sono stati fatti evaporare completamente sotto flusso debole di azoto, successivamente sono stati aggiunti 200 µL di piridina, e 100 µL di derivatizzante N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (SIGMA-ALDRICH >98.5%). Questa soluzione è stata miscelata per 5 minuti su piastra rotante per favorire la derivatizzazione dell'analita di interesse. Dopo una ulteriore e totale evaporazione sotto flusso d'azoto, il derivatizzato è stato risospeso in 0.5 mL di diclorometano.

Identificazione e quantificazione degli analiti di interesse

Dopo l'aggiunta di uno standard interno (PCB40), ciascun campione è stato iniettato in un gascromatografo (Agilent Technologies 6890N Network GC System), interfacciato ad uno spettrometro di massa (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector).

Il campione viene prima fatto evaporare in una camera di vaporizzazione, mantenuta ad una temperatura costante di 250°C, e successivamente iniettato in una colonna capillare (Zebron Capillary GC Column, ZB-Semivolatiles GUARDIAN) con lunghezza di 30 metri e diametro interno di 0.25 mm. Nella colonna il gas di trasporto è costituito da elio (flusso costante di 1 ml/min), mentre la fase stazionaria è spalmata in modo uniforme sulla superficie interna della colonna, dove forma un film di spessore costante (0,25 µm).

Il programma del forno, individuato per la separazione dei prodotti fitosanitari di interesse, prevede: temperatura iniziale di 80°C; aumento di 20°C/min fino alla temperatura di 160°C; aumento di 8°C/min fino alla temperatura di 168°C, mantenuta costante per 7,50 minuti; aumento di 4°C/min fino alla temperatura di 184°C; aumento di 1°C/min fino alla temperatura di 190°C; aumento di 10°C/min fino alla temperatura di 210°C; aumento di 30°C/min fino alla temperatura di 280°C, mantenuta costante per 9 minuti.

Per l'identificazione degli analiti sono stati considerati i tempi di ritenzione nella colonna capillare, gli ioni caratteristici (m/z) ed i rapporti tipici tra i due frammenti più abbondanti.

Controllo qualità

Le eventuali contaminazioni durante le fasi analitiche sono state controllate eseguendo delle prove di bianco, i cui risultati sono stati utilizzati per correggere le concentrazioni

Metodica per l'analisi dei CUP nell'acqua di fusione glaciale

I campioni sono stati scongelati al buio e successivamente filtrati con filtri in fibra di vetro GF/A (Whatman, diametro 0.47 mm e porosità 1.6 µm).

Gli analiti presenti nella fase disciolta sono stati estratti dalla matrice acquosa tramite cartucce OASIS HLB (Oasis HLB, 6 cc/500 mg, LP Extraction cartridge, 60µm; Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA), attivate con 5 ml di metanolo e 5 di acqua MilliQ. Su ogni cartuccia è stato filtrato un volume di 750 ml di acqua di fusione glaciale con un flusso di ca. 20-30 ml/min. Al termine della filtrazione, per il recupero degli analiti trattenuti nella cartuccia, le SPE sono state eluite con metanolo e una miscela di esano ed acetone in proporzione 80:20 (15 ml in totale). L'eluato è stato concentrato fino al volume di 50 µl sotto flusso d'azoto.

Identificazione e quantificazione degli analiti di interesse

Dopo l'aggiunta di uno standard interno (PCB40), ciascun campione è stato iniettato in un gascromatografo (Agilent Technologies 6890N Network GC System), interfacciato ad uno spettrometro di massa (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector).

Il campione viene prima fatto evaporare in una camera di vaporizzazione, mantenuta ad una temperatura costante di 250°C, e successivamente iniettato in una colonna capillare (Zebron Capillary GC Column, ZB-Semivolatiles GUARDIAN) con lunghezza di 30 metri e diametro interno di 0.25 mm. Nella colonna il gas di trasporto è costituito da elio (flusso costante di 1 ml/min), mentre la fase stazionaria è spalmata in modo uniforme sulla superficie interna della colonna, dove forma un film di spessore costante (0,25 µm).

Il programma del forno, individuato per la separazione dei prodotti fitosanitari di interesse, prevede: temperatura iniziale di 80°C; aumento di 20°C/min fino alla temperatura di 160°C; aumento di 8°C/min fino alla temperatura di 168°C, mantenuta costante per 7,50 minuti; aumento di 4°C/min fino alla temperatura di 184°C; aumento di 1°C/min fino alla temperatura di 190°C; aumento di 10°C/min fino alla temperatura di 210°C; aumento di 30°C/min fino alla temperatura di 280°C, mantenuta costante per 9 minuti.

Per l'identificazione degli analiti sono stati considerati i tempi di ritenzione nella colonna capillare, gli ioni caratteristici (m/z) ed i rapporti tipici tra i due frammenti più abbondanti.

Controllo qualità

Le eventuali contaminazioni durante le fasi analitiche sono state controllate eseguendo delle prove di bianco, i cui risultati sono stati utilizzati per correggere le concentrazioni.

3.12.3 Obiettivo 1.3: Analisi chimica dei campioni (settembre 2016-febbraio 2017)

I PPCP nel torrente Noce

Valutazione del destino ambientale

Il destino ambientale e la rimozione di farmaci e droghe durante il processo di trattamento dei reflui sono stati valutati confrontando i quantitativi di ciascuna sostanza che entrano giornalmente nei depuratori ed i corrispondenti quantitativi, misurati nei reflui in uscita. Tali quantitativi sono stati calcolati per ciascun composto misurato nelle acque reflue moltiplicando la concentrazione della sostanza (ng/L) per la portata media giornaliera dell'impianto ($m^3/giorno$). I carichi ($g/giorno$) di ciascun composto sono stati calcolati in entrata e in uscita ai depuratori analizzati ed è stata calcolata per ogni sostanza la percentuale di rimozione da parte dei processi di trattamento nei depuratori. Le concentrazioni dei contaminati emergenti misurate nel Torrente Noce sono state utilizzate per valutare l'impatto dei reflui trattati nelle acque di superficie e l'eventuale presenza di scarichi aggiuntivi.

Stima dei consumi di droghe ed alcool

Il consumo di droghe d'abuso e alcool è stato stimato mediante l'analisi dei residui metabolici dei composti presenti nelle acque reflue non trattate in entrata ai depuratori di Passo del Tonale e di Campodенno. Per la cocaina è stato utilizzato il principale metabolita urinario, la benzoilecgonina; per amfetamina, metamfetamina ed ecstasy sono stati utilizzati i composti stessi; per la cannabis è stato scelto il suo principale metabolita, il THC-COOH, ed infine per l'eroina è stato scelto uno dei metaboliti principali, la morfina. Tuttavia la morfina in acque reflue è anche un indicatore dell'uso terapeutico di morfina e codeina e le stime devono pertanto essere corrette opportunamente (Zuccato et al., 2008).

Le concentrazioni dei metaboliti misurate nelle acque reflue (ng/L) moltiplicate per la portata giornaliera dei reflui in entrata al depuratore ($m^3/giorno$), sono state utilizzate per calcolare i carichi ($mg/giorno$) delle sostanze che raggiungono l'impianto stesso giornalmente. I carichi dei metaboliti o delle sostanze parentali selezionati sono stati poi moltiplicati per opportuni fattori di correzione basati sulla percentuale media di sostanza escreta e sono state ottenute le stime del consumo per ciascuna sostanza. I consumi stimati sono stati poi normalizzati per la popolazione servita dal depuratore ed espressi come carichi in $mg/giorno/1000$ abitanti.

Per la stima del consumo di alcool è stato considerato l'etilsolfato, metabolita minore ma esclusivo dell'etanolo. Le concentrazioni di etilsolfato misurate sono state moltiplicate per la portata del depuratore ($m^3/giorno$) per ottenere le quantità escrete

giornalmente (g/giorno) e sono state normalizzate per la popolazione totale afferente all'impianto di depurazione. Infine, uno specifico fattore di correzione, calcolato considerando la frazione di alcool escreta attraverso le urine come etilsolfato è stato utilizzato per stimare le quantità di alcool consumato (kg EtOH/1000 persone/giorno) (Rodríguez-Álvarez et al., 2015).

Risultati

Le analisi hanno consentito di monitorare la presenza di diversi contaminanti emergenti, nelle acque reflue in entrata e in uscita ai depuratori e nelle acque del torrente Noce.

Presenza di farmaci in acque reflue e di superficie

Trenta farmaci appartenenti a differenti categorie terapeutiche e l'ormone naturale estrone sono stati rilevati nelle acque reflue in entrata ed uscita ai depuratori di Passo del Tonale e di Campodenno e nel torrente Noce a monte e valle del depuratore di Passo del Tonale. Le tabelle Tabella 15 e

Tabella 16 riportano le concentrazioni di tutti i farmaci ed ormoni analizzati (ng/L) e i relativi limiti di quantificazione (LOQ) calcolati per ciascun composto.

Tabella 15 - Concentrazioni di farmaci (ng/L) misurate nelle acque reflue e di superficie presso il Passo del Tonale.

	Febbraio				Giugno				
Campioni	PTin (ng/L)	PTout (ng/L)	PTm (ng/L)	PTv (ng/L)	PTin (ng/L)	PTout (ng/L)	PTm (ng/L)	PTv (ng/L)	LOQ (ng/L)
Salbutamolo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,035
Atenololo	12,919	1,795	1,357	1,099	4,934	1,201	< LOQ	1,263	0,035
Demetildiazepam	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,56
Ranitidina	23,9	2,32	< LOQ	0,405	4,921	0,244	< LOQ	0,08	0,025
Enalapril	19,01	1,02	0,85	1,66	4,81	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,053
Omeprazolo-sulfide	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,6
Lincomicina	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2
Amoxicillina	< LOQ	< LOQ	172,5	79,7	1,64	9,98	< LOQ	20,65	1,53
Carbamazepina	37,55	79,33	1,32	5,14	7,62	7,95	< LOQ	6,05	0,56
Diidrocarbamazepina	71,8	102,63	2,11	6,85	44,55	33,94	< LOQ	24,31	0,56
Eritromicina	< LOQ	10,25	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,4
Deidroeritromicina	190,34	216,5	4,64	37	5,8	6,45	< LOQ	7,25	0,4
Claritromicina	680,6	293,7	23,06	80,37	39,1	16,4	< LOQ	23,21	0,4
Ramipril	4,02	2,88	0,53	0,66	2,84	1,79	< LOQ	1,83	0,5
Ramiprilato	48,15	53,83	2,95	6,34	37,88	27,73	< LOQ	19,46	0,5
Enalaprilato	34,89	3,26	1,46	1,66	6,32	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,5
Irbesartan	55,04	45,05	5,4	11,11	43,37	62,92	< LOQ	52,98	0,24
Losartan	119,4	73,07	9,28	23,28	42,5	16,55	< LOQ	13,52	0,24
Valsartan	296	87,5	67,85	163,8	384,7	70,93	< LOQ	94,3	0,24
Sulfametossazolo	66,89	22,1	< LOQ	< LOQ	27,36	7,26	< LOQ	< LOQ	1,48
Paracetamolo	7308	< LOQ	576,3	744	203,6	4,9	< LOQ	6,63	1,98

	Febbraio				Giugno				
Campioni	PTin (ng/L)	PTout (ng/L)	PTm (ng/L)	PTv (ng/L)	PTin (ng/L)	PTout (ng/L)	PTm (ng/L)	PTv (ng/L)	LOQ (ng/L)
Metformina	14799	3524	< LOQ	< LOQ	12541	8121	< LOQ	6736	253
Ketoprofene	166	61,5	8,18	7,96	11,04	< LOQ	65,24	90,7	1
Ibuprofene	1179	255	327	619	31,1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1
Naprossene	268	380	19,9	91,25	4,69	13	< LOQ	7,27	1
Diclofenac	65,2	350	63,7	41,9	22,6	87,1	< LOQ	124	1
Furosemide	12,1	20,3	< LOQ	1,16	8,17	23,9	< LOQ	18,74	0,37
Bezafibrato	0,6	8,42	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,39
Gemfibrozil	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,39
Idroclorotiazide	21,9	70,6	11,7	9,54	13,6	55,9	< LOQ	51,7	0,56
Rosuvastatina	5,96	17,4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,02
Atorvastatina	0,81	2,42	< LOQ	0,12	0,41	0,34	< LOQ	0,25	0,02
Estrone	10,9	3,53	3,67	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2,7
TOT ng/L	25498	5688	1304	1934	13495	8570	65	7300	

Tabella 16 - Concentrazioni di farmaci (ng/L) misurate nelle acque reflue di Campodenno.

	Febbraio		
Campioni:	MLin (ng/L)	MLout (ng/L)	LOQ (ng/L)
Salbutamolo	22,156	28,196	0,035
Atenololo	178,71	37,383	0,035
Demetildiazepam	4,447	3,887	0,56
Ranitidina	23,4	2,515	0,025
Enalapril	57,58	2,62	0,053
Omeprazolo-sulfide	3,49	1,9	1,6
Lincomicina	44,49	73,2	2
Amoxicillina	< LOQ	6,68	1,53
Carbamazepina	269,3	286,3	0,56
Diidrocarbamazepina	715,5	787,4	0,56
Eritromicina	< LOQ	< LOQ	0,4
Deidroeritromicina	84,3	55,7	0,4
Claritromicina	1001,5	548,9	0,4
Ramipril	20,96	11,7	0,5
Ramiprilato	253,5	195,42	0,5
Enalaprilato	111,6	11,16	0,5
Irbesartan	393,5	234,4	0,24
Losartan	121,5	59,1	0,24
Valsartan	2407,5	1259	0,24
Sulfametossazolo	191,9	< LOQ	1,48
Paracetamolo	7658	< LOQ	1,98
Metformina	43403	8837	253
Ketoprofene	311	197	1
Ibuprofene	606	284	1
Naprossene	171	214	1
Diclofenac	184	289	1
Furosemide	125,6	57,4	0,37
Bezafibrato	65,6	159	0,39
Gemfibrozil	< LOQ	3,29	0,39
Idroclorotiazide	110	178	0,56
Rosuvastatina	17,1	54,9	0,02
Atorvastatina	2,48	8,37	0,02
Estrone	39,1	4,3	2,7
TOT ng/L	58598	13892	

Nei campioni prelevati presso Passo del Tonale la maggior parte dei farmaci è stata quantificata in concentrazioni nell'ordine dei nanogrammi per litro, mentre alcuni composti sono risultati inferiori ai limiti di quantificazione. Antibiotici, antipertensivi e anti-

infiammatori sono stati rilevati in concentrazioni superiori a 100 ng/L nei reflui in entrata al depuratore a febbraio. Ibuprofene (1180 ng/L), paracetamolo (7300 ng/L) e l'antidiabetico metformina (14800 ng/L) sono i tre composti con le concentrazioni maggiori. Anche nelle acque reflue in entrata al depuratore nel mese di giugno, valsartan, paracetamolo e metformina sono stati misurati in concentrazioni maggiori di 100 ng/L.

La somma delle concentrazioni di tutti i farmaci identificati nelle acque del torrente Noce a monte del depuratore nel febbraio 2016 è risultata pari a 1304 ng/L, valore simile a quello riscontrato nello stesso periodo a valle del depuratore (1943 ng/L). Ciò indica la presenza di fonti di sversamento non identificati nel torrente Noce a monte del depuratore dovuti probabilmente all'alta affluenza turistica. Durante la stagione estiva infatti la somma delle concentrazioni rilevate nel torrente Noce a monte del depuratore risultano pressoché nulle, mentre si ritrova un'elevata concentrazione solo a valle (7300 ng/L).

Nei campioni di acque reflue in entrata e in uscita al depuratore di Campodenno tutti i composti sono stati quantificati in concentrazioni nell'ordine dei nanogrammi, ad eccezione di eritromicina, amoxicillina e gemfibrozil risultati inferiori al limite di quantificazione (

Tabella 16). Nelle acque reflue in entrata al depuratore solo 12 composti sono risultati inferiori a 100 ng/L, a differenza degli altri farmaci, tutti superiori a questa concentrazione. Le sostanze caratterizzate a concentrazioni maggiori sono claritromicina (1000 ng/L), valsartan (2400 ng/L), paracetamolo (7660 ng/L) e metformina (43000 ng/L).

Presenza di droghe d'abuso in acque reflue e di superficie

Nella Tabella 17 sono riportate le concentrazioni (ng/L) delle droghe d'abuso identificate nei campioni di acque reflue e nelle acque del torrente Noce, presso Passo del Tonale e i valori di LOQ (ng/L) di ogni composto.

Tabella 17 - Concentrazioni di droghe d'abuso e metaboliti (ng/L) misurate nelle acque reflue e di superficie presso il Passo del Tonale.

	Febbraio				Giugno				
Campioni:	PTin (ng/L)	PTout (ng/L)	PTm (ng/L)	PTv (ng/L)	PTin (ng/L)	PTout (ng/L)	PTm (ng/L)	PTv (ng/L)	LOQ (ng/L)
Metamfetamina	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,03
MDMA	6,56	3,97	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3,12
Benzoilecgonina	250,2	97,9	3,03	9,79	40,4	11,3	< LOQ	8,9	0,82
Norbenzoilecgonina	8,32	4,66	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,45
Cocaina	93,2	2,51	1,37	1,83	1,16	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,59
Cocaetilene	2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,86
Morfina	14,7	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3,16
Codeina	78,8	6,62	15	16,3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3,96
EDDP	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,45
Metadone	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,09
THC-COOH	50,76	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3,97
TOT ng/L	504,5	115,7	19,4	27,9	41,6	11,3	-	8,9	

Nel depuratore di Passo del Tonale nel mese di febbraio sono stati rilevati MDMA, benzoilecgonina, norbenzoilecgonina, cocaina, cocaetilene, morfina, codeina e THC-COOH, mentre sono risultate inferiori ai limiti di quantificazione metamfetamina, EDDP e metadone. Benzoilecgonina e cocaina sono le sostanze quantificate nelle acque reflue in entrata al depuratore con le concentrazioni maggiori, rispettivamente di 250 ng/L e di 93 ng/L. Codeina e THC-COOH sono stati trovati in concentrazioni superiori ai 50 ng/L, le restanti sostanze sono state trovate in tracce.

Nelle acque reflue in entrata al depuratore nel mese di giugno quasi tutte le droghe, eccetto benzoilecgonina e cocaina, sono risultate al di sotto dei limiti di quantificazione, dimostrando una minore presenza.

A febbraio nelle acque del torrente Noce già a monte del depuratore sono presenti droghe in concentrazioni di qualche decina di ng/L. Questo indica, come per i farmaci, la presenza di fonti sconosciute di sversamento di queste sostanze nel torrente a monte

del depuratore. Subiscono un forte impatto soprattutto le acque del torrente a valle del depuratore, le quali ricevono le acque trattate dall'impianto, con alcuni residui di droghe, potenziali contaminanti.

Dai valori riportati nella Tabella 17 si può notare che a febbraio ci sono le concentrazioni maggiori di sostanze d'abuso dovute probabilmente all'alta affluenza turistica. Al contrario, a giugno, stagione non turistica, le concentrazioni risultano inferiori.

Nella Tabella 18 sono riportate le concentrazioni (ng/L) di droghe d'abuso identificate nelle acque reflue del depuratore di Campodenno e i valori di LOQ (ng/L) di ogni composto.

Tabella 18 - Concentrazioni di droghe d'abuso e metaboliti (ng/L) misurate nelle acque reflue di Campodenno.

	Febbraio		
Campioni:	MLin (ng/L)	MLout (ng/L)	LOQ (ng/L)
Metamfetamina	2,24	1,91	1,03
MDMA	13	4,38	3,12
Benzoilecgonina	139,6	9,46	0,82
Norbenzoilecgonina	2,72	1,96	1,45
Cocaina	37,7	0,77	0,59
Cocaetilene	2,08	< LOQ	0,86
Morfina	37,5	< LOQ	3,16
Codeina	178,3	77,8	3,96
EDDP	9,64	3,36	0,45
Metadone	3,76	4,58	0,09
THC-COOH	51	< LOQ	3,97
TOT ng/L	477,5	104,2	

Nelle acque reflue in entrata al depuratore di Campodenno (Tabella 18) sono state individuate tutte le droghe analizzate. Escludendo la codeina, che, pur avendo la concentrazione più elevata, non è una droga, ma un sedativo della tosse appartenente alla classe degli oppioidi, anche in questo caso la benzoilecgonina è la droga presente in concentrazioni maggiori (140 ng/L), seguita da cocaina e morfina con le medesime concentrazioni (37 ng/L). Le altre sostanze sono state rilevate in concentrazioni minori e alcune solo in tracce. Nelle acque reflue in uscita al depuratore cocaetilene, morfina e THC-COOH sono risultati inferiori ai limiti di quantificazione, mentre le altre sostanze sono state quantificate in concentrazioni generalmente inferiori a quelle in entrata, ad eccezione del metadone. Si può notare come le concentrazioni nelle acque reflue in entrata al depuratore di Passo del Tonale siano superiori rispetto a quelle di Campodenno. Ciò indica un maggior utilizzo di sostanze d'abuso da parte della popolazione turistica presente al Passo del Tonale.

Presenza di additivi alimentari e per la cura personale nelle acque del torrente Noce
Entrambe le fragranze sintetiche selezionate (AHTN e HHCB) sono state ritrovate in concentrazioni dell'ordine, rispettivamente, delle decine o centinaia di ng/L. Queste concentrazioni sono paragonabili, come ordine di grandezza, a quelle rinvenute nel torrente Molgora (Villa et al., 2012) nelle zone dell'alta pianura Padana, dove scaricano

depuratori di media dimensione. La mancanza di variabilità che si osserva tra le stazioni e tra i due mesi indagati è riferibile alla loro continua emissione legata al costante utilizzo dei prodotti per l'igiene personale (es. detersivi).

Il dolcificante sintetico sucralosio, invece, presenta concentrazioni più elevate nelle zone più montane nel periodo di massima affluenza turistica (febbraio al Passo del Tonale), mentre più a valle, dove la popolazione è più costante nell'arco dell'anno, le concentrazioni nei due mesi indagati sono molto simili (Tabella 19). I valori di concentrazione ritrovati nel torrente Noce sono paragonabili per ordine di grandezza quelli riferibili alle acque superficiali di diversi stati dell'Europa occidentale (Loos et al., 2009).

Tabella 19 - Concentrazioni espresse in microg/L dei principi attivi ritrovati nelle acque ai depuratori del Passo del Tonale e di Mezzolombardo.

Campioni	PTm Febbraio	PTv Febbraio	ML Febbraio	PTm Giugno	PTv Giugno	ML Giugno
DEET	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HHCB	210	350	350	410	490	360
AHTN	20	17	17	25	23	22
Sucralosio	400	600	120	35	280	190

In Figura 14 e Figura 15 sono sintetizzati graficamente i risultati ottenuti dalle analisi delle acque a monte e a valle del depuratore del Tonale.

In dati sono ancora in fase di elaborazione, ma si può osservare che la contaminazione cambia sia in termini quantitativi che in termini qualitativi dalla stagione invernale a quella di inizio estate. Nella prima la contaminazione risulta essere dominata da farmaci di banco quali il paracetamolo e l'ibuprofene assieme al sucralosio e alla fragranza galaxolide (HHCB), mentre a giugno la contaminazione è dominata dagli additivi alimentari (sucralosio) e dalle fragranze sintetiche (HHCB). Rimane da approfondire l'elevata concentrazione dei alcuni analiti nel tratto di torrente a monte dello scarico del depuratore in studio soprattutto nel periodo invernale (vedi Figura 14).

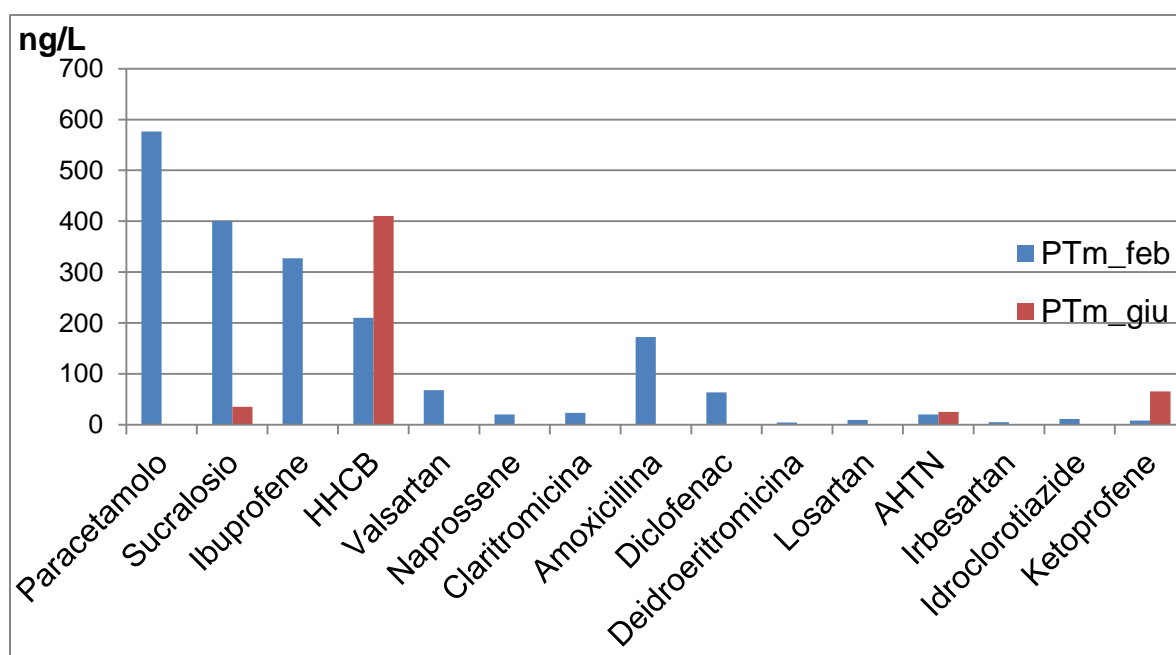


Figura 14 - Rappresentazione grafica delle concentrazioni di CE (esprese in ng/L) ritrovate a febbraio (in blu) e a giugno (in rosso) nelle acque del torrente Noce a monte del depuratore del Tonale.

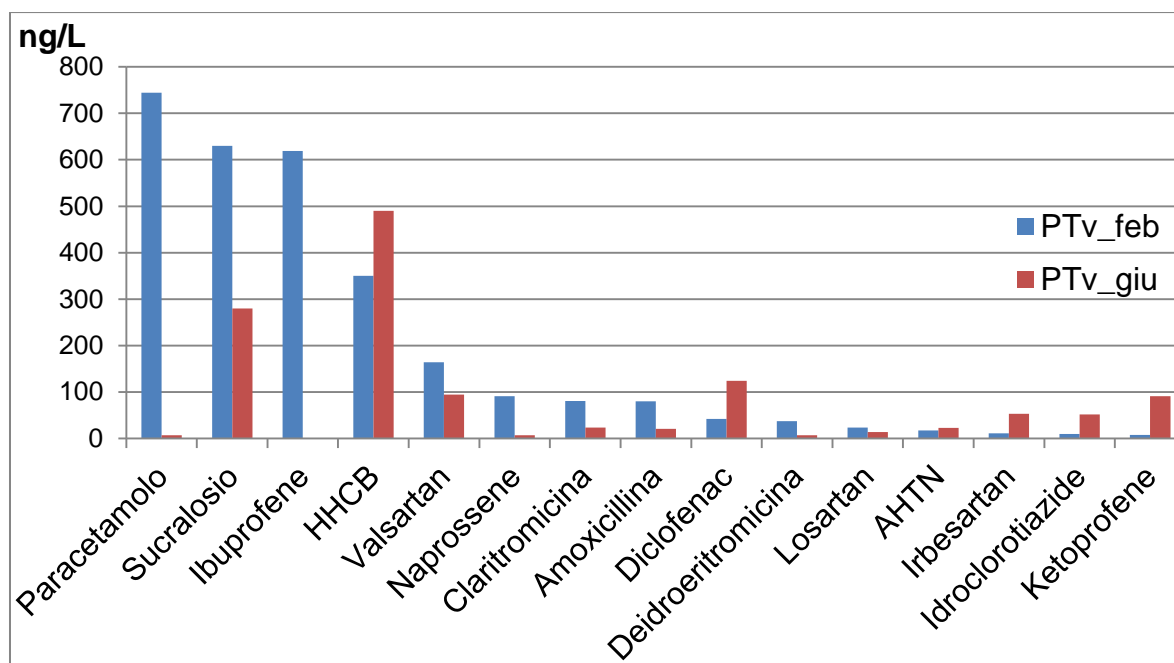


Figura 15 - Rappresentazione grafica delle concentrazioni di CE (esprese in ng/L) ritrovate a febbraio (in blu) e a giugno (in rosso) nelle acque del torrente Noce a valle del depuratore del Tonale.

Carichi e rimozione dei farmaci

Tabella 20 - Carichi (mg/d) di ciascun farmaco in entrata e in uscita al depuratore di Passo del Tonale e di Campodenno nei mesi di febbraio e giugno e percentuali di rimozione in seguito ai trattamenti di depurazione.

	Passo del Tonale						Campodenno		
	Febbraio			Giugno			Febbraio		
Campioni:	Carichi in entrata (mg/d)	Carichi in uscita (mg/d)	% rimozione	Carichi in entrata (mg/d)	Carichi in uscita (mg/d)	% rimozione	Carichi in entrata (mg/d)	Carichi in uscita (mg/d)	% rimozione
Salbutamolo	-	-	-	-	-	-	31,1	39,6	0
Atenololo	23,7	3,3	86,1	7,0	1,7	75,7	250,8	52,5	79,1
Demetildiazepam	-	-	-	-	-	-	6,2	5,5	12,6
Ranitidina	43,8	4,3	90,3	7,0	0,3	95,0	32,8	3,5	89,3
Enalapril	34,9	1,9	94,6	6,8	-	100,0	80,8	3,7	95,4
Omeprazolo-sulfide	-	-	-	-	-	-	4,9	2,7	45,6
Lincomicina	-	-	-	-	-	-	62,4	102,7	0
Amoxicillina	-	-	-	2,3	14,1	0,0	-	9,4	-

	Passo del Tonale						Campodenno		
	Febbraio			Giugno			Febbraio		
Campioni:	Carichi in entrata (mg/d)	Carichi in uscita (mg/d)	% rimozione	Carichi in entrata (mg/d)	Carichi in uscita (mg/d)	% rimozione	Carichi in entrata (mg/d)	Carichi in uscita (mg/d)	% rimozione
Carbamazepina	68,9	145,5	0,0	10,8	11,3	0,0	377,9	401,8	0
Diidrocarmazepina	131,7	188,2	0,0	63,1	48,1	23,8	1004,2	1105,1	0
Eritromicina	-	18,8	-	-	-	-	-	-	-
Deidroeritromicina	349,0	397,0	0,0	8,2	9,1	0,0	118,3	78,2	33,9
Claritromicina	1248,0	538,6	56,8	55,4	23,2	58,1	1405,6	770,4	45,2
Ramipril	7,4	5,3	28,4	4,0	2,5	37,0	29,4	16,4	44,2
Ramiprilato	88,3	98,7	0,0	53,7	39,3	26,8	355,8	274,3	22,9
Enalaprilato	64,0	6,0	90,7	9,0		100,0	156,6	15,7	90,0
Irbesartan	100,9	82,6	18,2	61,5	89,2	0,0	552,3	329,0	40,4
Losartan	218,9	134,0	38,8	60,2	23,5	61,1	170,5	82,9	51,4
Valsartan	542,8	160,4	70,4	545,2	100,5	81,6	3378,8	1766,9	47,7
Sulfametossazolo	122,7	40,5	67,0	38,8	10,3	73,5	269,3	-	100,0
Paracetamolo	13400,5	-	100,0	288,5	6,9	97,6	10747,6	-	100,0
Metformina	27136,6	6461,9	76,2	17772,0	11508,4	35,2	60913,9	12402,3	79,6
Ketoprofene	304,4	112,8	63,0	15,6	-	100,0	436,5	276,5	36,7
Ibuprofene	2161,9	467,6	78,4	44,1	-	100,0	850,5	398,6	53,1
Naprossene	491,4	696,8	0,0	6,6	18,4	0,0	240,0	300,3	0
Diclofenac	119,6	641,8	0,0	32,0	123,4	0,0	258,2	405,6	0
Furosemide	22,2	37,2	0,0	11,6	33,9	0,0	176,3	80,6	54,3
Bezafibrato	1,1	15,4	0,0	-	-	-	92,1	223,1	0
Gemfibrozil	-	-	-	-	-	-	-	4,6	-
Idroclorotiazide	40,2	129,5	0,0	19,3	79,2	0,0	154,4	249,8	0
Rosuvastatina	10,9	31,9	0,0	-	-	-	24,0	77,0	0
Atorvastatina	1,5	4,4	0,0	0,6	0,5	17,1	3,5	11,7	0
Estrone	20,0	6,5	67,6	-	-	-	54,9	6,0	89,0
TOT (g/d)	46,8	10,4	77,7	19,1	12,1	36,5	82,2	19,5	76,3

La Tabella 20 riporta i carichi (mg/d) dei farmaci, calcolati moltiplicando la concentrazione dei composti per la portata giornaliera dei depuratori. In entrambi gli impianti i carichi in uscita sono inferiori ai carichi in entrata, grazie all'efficacia dei trattamenti di depurazione.

Per quanto riguarda Passo del Tonale nel mese di febbraio i carichi in entrata risultano maggiori di quelli di giugno a causa dell'elevata affluenza di turisti che consumano farmaci durante la stagione invernale.

Nella Tabella 20 sono riportate le percentuali di rimozione, che consentono di valutare la persistenza e il destino ambientali di questi composti. Esse risultano abbastanza elevate per entrambi i depuratori, infatti superano il 75% e considerando le percentuali di rimozione dei singoli composti si può notare come diversi farmaci, tra cui paracetamolo e ibuprofene, siano rimossi completamente e numerose altre sostanze abbiano percentuali di rimozione superiori all'80%. Tuttavia ci sono composti con percentuali di rimozione inferiori al 50% o addirittura nulle, che indicano la persistenza di sostanze come carbamazepina, diidrocarbamazepina, naprossene, diclofenac, bezafibrato, idroclorotiazide e rosuvastatina.

La Tabella 21 riassume il quadro relativo ai carichi totali in entrata e in uscita ai depuratori con le rispettive percentuali totali di rimozione dei farmaci. Poiché le analisi hanno mostrato carichi assai elevate di metformina che influenzano i carichi totali farmaci dei depuratori e le relative percentuali di rimozione, è stato ritenuto opportuno calcolare carichi e percentuali di rimozione sia includendo che escludendo la metformina.

Tabella 21 - Carichi totali in entrata e in uscita ai depuratori e relative percentuali totali di rimozione, calcolati con e senza metformina.

	TOT Carichi in entrata (g/d)	TOT Carichi in uscita (g/d)	TOT % Rimozione	TOT Carichi in entrata (g/d)	TOT Carichi in uscita (g/d)	TOT % Rimozione
Passo del Tonale	Con metformina			Senza metformina		
Febbraio	46,8	10,4	78	19,6	4	80
Giugno	19,1	12,1	37	1,4	0,6	53
Campodenno						
Febbraio	82,2	19,5	76	21,3	7,1	67

Escludendo la metformina si evince una diminuzione significativa dei carichi in entrata e in uscita ad entrambi i depuratori e un incremento delle percentuali totali di rimozione nel depuratore di Passo del Tonale.

Carichi e rimozione delle droghe

Anche per le droghe d'abuso sono stati calcolati i carichi (mg/d) in entrata e in uscita ai depuratori in entrambe le località, moltiplicando le concentrazioni delle sostanze per la portata giornaliera degli impianti. Sono state inoltre calcolate le percentuali di rimozione dei composti. I valori ottenuti sono riportati in Tabella 22 e

Tabella 23.

Tabella 22 - **Carichi (mg/d) di droghe d'abuso** e metaboliti in entrata e in uscita ai depuratori di Passo del Tonale e di Campodенno nei mesi di febbraio e giugno e percentuali di rimozione in seguito ai trattamenti di depurazione.

Campioni:	Tonale febbraio			Tonale giugno		
	Carichi in entrata (mg/d)	Carichi in uscita (mg/d)	% rimozione	Carichi in entrata (mg/d)	Carichi in uscita (mg/d)	% rimozione
Metamfetamina	-	-	-	-	-	-
MDMA	12,0	7,3	39,5	-	-	-
Benzoilecgonina	458,8	179,5	60,9	57,3	16,0	72,0
Norbenzoilecgonina	15,3	8,5	44,0	-	-	-
Cocaina	170,9	4,6	97,3	1,6	-	100,0
Cocaetilene	3,7	-	100,0	-	-	-
Morfina	27,0	-	100,0	-	-	-
Codeina	144,5	12,1	91,6	-	-	-
THC-COOH	93,1	-	100,0	-	-	-
TOT (g/d)	0,925	0,212	77,1	0,059	0,016	72,8

Tabella 23 - Carichi (mg/d) di **droghe d'abuso e metaboliti in entrata e in uscita ai depuratori** di Passo del Tonale e di Campodенno nei mesi di febbraio e giugno e percentuali di rimozione in seguito ai trattamenti di depurazione.

Campioni:	Campodенno febbraio		
	Carichi in entrata (mg/d)	Carichi in uscita (mg/d)	% rimozione
Metamfetamina	3,1	2,7	14,7
MDMA	18,2	6,1	66,3
Benzoilecgonina	195,9	13,3	93,2
Norbenzoilecgonina	3,8	2,8	27,9
Cocaina	52,9	1,1	98,0
Cocaetilene	2,9	-	100,0
Morfina	52,6	-	100,0
Codeina	250,2	109,2	56,4
EDDP	13,5	4,7	65,1
Metadone	5,3	6,4	0,0
THC-COOH	71,6	-	100,0
TOT (g/d)	0,670	0,146	78,2

I carichi complessivi di droghe d'abuso e metaboliti che entrano giornalmente nei due impianti risultano inferiori a quelli dei farmaci mostrati precedentemente. Nel depuratore di Passo del Tonale il carico in entrata a febbraio è maggiore di quello in entrata a giugno e di quello di Campodенno. Questo indica un maggior consumo di droghe da parte dei turisti che si trovano al Tonale durante la stagione invernale, più sovraffollata rispetto a giugno. Le percentuali di rimozione di queste sostanze sono abbastanza elevate, infatti sono tutte superiori al 70%. Alcuni composti vengono completamente rimossi dai trattamenti dei depuratori, infatti cocaetilene, morfina, THC-COOH hanno una percentuale di rimozione del 100% nei due depuratori nel mese di febbraio. Nel depuratore di Passo del Tonale a giugno la cocaina è totalmente rimossa. Nel depuratore di Campodенno il metadone è l'unica sostanza con rimozione nulla.

Le analisi hanno permesso di rilevare, nell'ordine dei ng/L, la presenza di farmaci, droghe e metaboliti nelle acque reflue presso i depuratori di Passo del Tonale e di Campodенno e di determinare i composti più abbondanti. Attraverso il calcolo dei carichi e delle percentuali di rimozione è stato valutato il destino ambientale di questi composti. Tra di essi alcuni sono stati ritrovati in quantitativi elevati e altri in tracce nel torrente Noce che riceve i reflui trattati, dimostrando la loro permanenza nell'ambiente acquatico, nonostante la buona capacità dei trattamenti di depurazione.

Consumi di alcool e droghe

Sono stati valutati i consumi di MDMA, cocaina, eroina, THC e metamfetamina attraverso l'analisi dei reflui in ingresso ai depuratori di Passo del Tonale e di Campodенno. Per ogni sostanza d'abuso è stato calcolato il consumo, espresso in milligrammi al giorno, moltiplicando il carico di composto parentale per un fattore di correzione, specifico per ogni sostanza. I valori ottenuti sono stati normalizzati per la popolazione servita dal depuratore, per permettere i confronti tra le due località e sono stati espressi in milligrammi al giorno ogni 1000 abitanti.

Il consumo di alcool è stato calcolato considerando il carico di etilsolfato in entrata al depuratore, moltiplicato per un opportuno fattore di correzione. Da questa moltiplicazione è stato ottenuto il consumo di alcool, espresso in grammi al giorno. Il valore ricavato è stato normalizzato per la popolazione afferente all'impianto, al fine di ottenere i grammi di alcool consumati giornalmente ogni 1000 abitanti.

La

Tabella 24 mostra il consumo delle droghe d'abuso e di alcool nella popolazione afferente ai depuratori di Passo del Tonale e di Campodeno.

Tabella 24 - Consumo delle principali droghe (mg/d/1000ab) e di alcool (g/d/1000ab) nella popolazione afferente ai depuratori di Passo del Tonale e di Campodeno.

Sostanza	Passo del Tonale		Campodeno
Consumo mg/d/1000 ab	Febbraio	Giugno	Febbraio
MDMA (Ecstasy)	1,8	-	1,4
Cocaina	106,9	0,13	22,8
Eroina	8,3	-	8,1
THC	1414,8	-	543,9
Sostanza	Passo del Tonale		Campodeno
Consumo mg/d/1000 ab	Febbraio	Giugno	Febbraio
Metamfetamina	-	-	0,36
Consumo g/d /1000 ab			
Alcool	8883,7	328,2	2159,5

La sostanza con il consumo maggiore è l'alcool, seguita tra le droghe d'abuso da THC e cocaina, mentre il consumo di eroina, ecstasy e metamfetamina è risultato inferiore. I consumi nella popolazione afferente all'impianto di Passo del Tonale sono risultati maggiori durante la stagione turistica invernale per tutte le sostanze analizzate, mentre a giugno risultano pressoché nulli. Il consumo di alcool a Passo del Tonale a febbraio (8890 g/d/1000ab) risulta inoltre 4 volte maggiore di quello di Campodeno (2160 g/d/1000ab) nello stesso periodo. Anche il consumo di cocaina a Passo del Tonale (106 mg/d/1000 ab) risulta superiore a quello di Campodeno (23 mg/d/1000 ab). Consumi analoghi sono stati rilevati invece per eroina (8 mg/d/1000 abitanti) ed ecstasy (1.4-1.8 mg/d/1000 ab).

L'applicazione di questa metodologia ha permesso di rilevare evidenti differenze nel pattern di consumo di droghe d'abuso ed alcool in differenti località e periodi dell'anno. Si evidenzia quindi l'alta potenzialità di questo metodo per fornire importanti informazioni a livello locale che possono completare i dati epidemiologici generalmente disponibili a livello più ampio, per esempio statistiche nazionali o regionali.

I CUP nel Ghiacciaio del Presena

Nei mesi di luglio e settembre 2016 sono stati prelevati campioni di acque di fusione del ghiacciaio Presena.

Delle molecole utilizzate su melo e selezionate per il monitoraggio nelle acque di fusione glaciale, solo il chlorpyrifos è stato ritrovato in concentrazioni quantificabili (vedi Tabella 25).

Tabella 25 - Concentrazioni espresse in ng/L dei principi attivi ritrovati nelle acque di fusione del Ghiacciaio del Presena.

	PRO luglio(ng/L)	PRO settembre (ng/L)
chlorpyrifos (CPF)	6,13	6,83
metolachlor (MET)	4,62	n.d.
terbutilazina (TER)	1,50	n.d.
desethyl-terbutilazina	n.d.	4,9

n.d.=not detected

Per la sua collocazione geografica il Ghiacciaio Presena, oltre a poter ricevere i contaminanti di origine agricola emessi nelle aree geograficamente limitrofe, è area soggetta a deposizione umida e secca di quei contaminati, che hanno le potenzialità di essere trasportati in atmosfera a medio raggio, ovvero dalle aree di utilizzo nella Pianura Padana.

Nelle acque di fusione raccolte in luglio sono stati rinvenuti anche i due erbicidi selezionati (terbutilazina e metholachlor) a seguito dell'utilizzo primaverile come trattamento diserbante autorizzato per diverse colture seminate.

Le acque di settembre invece sono contaminate da CPF e dal principale metabolita di TBZ.

Per comprendere meglio i risultati osservati nelle acque del ghiacciaio del Presena, questi sono stati messi a confronto con le concentrazioni degli stessi p.a. ritrovati nelle acque di fusione di altri ghiacciai dell'arco alpino (aree di studio selezionate per il progetto DELTA "Dynamics of Emerging and Legacy conTaminants in the Alpine glacial environment and their impact on water resource" fondo quota competitiva Unimib): il ghiacciaio del Lys del gruppo del Monte Rosa, il ghiacciaio del Morteratsch del massiccio del Bernina in Svizzera, il ghiacciaio del Forni (Gruppo dell'Ortles) e il ghiacciaio del Tuckett (Dolomiti di Brenta), il ghiacciaio del Gogo Alto (Val Senales) nel gruppo Ortles-Cevedale. I dati dei p.a. selezionati per le analisi nelle acque di fusione dei ghiacciai alpini sono riportati in Figura 16. Per mancanza di acqua di fusione nel mese di settembre 2016, non ci sono dati relativi al ghiacciaio del Tuckett.

L'analisi congiunta dei dati ottenuti nelle indagini del progetto RACE-TN e DELTA ci permette di affermare che:

- L'insetticida organofosforico CPF è presente in tutti i campioni prelevati nell'arco Alpino italiano, con concentrazioni anche estremamente alte (ghiacciaio dei Forni, luglio 2016);
- Gli erbicidi TBZ e MET sono maggiormente frequenti all'inizio del periodo estivo;
- Il p.a. TBZ è presente solamente nelle acque di fusione di ghiacciai prossimi alla Pianura Padana (Lys, Presena e Tuckett). Queste catene montuose sembrano fungere da aree di deposizione di tale contaminante presente nelle masse d'aria che provengono dalle zone di pianura, fungendo così da barriera "protettiva" dei ghiacciai più interni (Morteratsch, Forni e Gogo);
- Il metabolita desethyl-TBZ, come il suo parentale, è stato rinvenuto solo nei campioni raccolti a fine estate nelle acque dei ghiacciai più meridionali;
- Il MET presenta una distribuzione spaziale particolare, con elevate concentrazioni nel ghiacciaio del Gogo Alto della Val Senales. L'analisi dei dati relativi a CDT

(pari a 90 km) e EF (pari a 0.05%) fa ipotizzare maggiormente per un suo uso/emissione locale e non per un trasporto dalle aree coltivate in pianura.

Tali risultati sembrano evidenziare che le attività legate alle produzioni agricole trentine compromettano poco la qualità delle acque in alta quota. L'ampia diffusione spaziale dell'insetticida CPF non permette di identificare con ragionevole certezza le aree geografiche da cui trae origine la contaminazione.

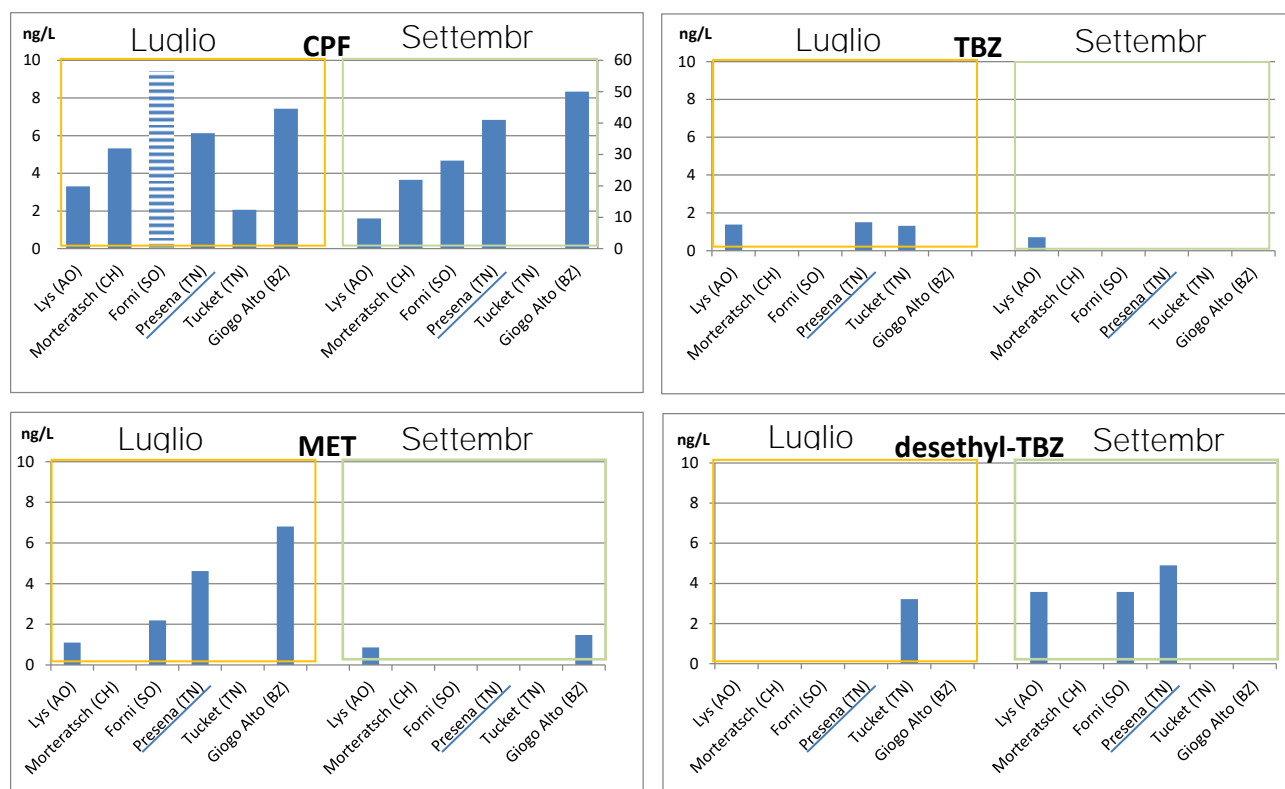


Figura 16 - Rappresentazione grafica delle concentrazioni (esprese in ng/L) ritrovate in luglio (nel box giallo) e in settembre (nel riquadro verde) nelle acque di fusione dei ghiacciai in studio.

3.12.4 Analisi del mercurio totale nei sedimenti (novembre 2016) (analisi eseguite dalla dott.ssa Laura Marziali, CNR-IRSA Istituto di Ricerca Sulle Acque, S.S. Brugherio, MB)

Tra le analisi non inserite nella proposta originale ma inserite nel corso del progetto, vi è l'analisi del mercurio nei sedimenti raccolti nei tre siti di studio dPTm, dPTv e ML nell'inverno 2016. Le analisi sono state eseguite dalla dott.ssa Laura Marziali in collaborazione con la dott.ssa Lucia Valsecchi presso il CNR-IRSA Istituto di Ricerca Sulle Acque, S.S. Brugherio (MB).

I campioni di sedimento sono stati raccolti dai ricercatori del MUSE a febbraio 2016, in bottiglie di plastica da 1L, e trasportati a 4 °C al laboratorio del CNR nell'arco di 24 ore. In laboratorio i campioni sono stati pesati e liofilizzati a freddo sotto vuoto spinto per 48 ore. Al termine della liofilizzazione è stato determinato il peso secco ed è stata effettuata una setacciatura per separare la frazione più fine (< 63 µm), nella quale i contaminanti tendono ad essere accumulati.

La determinazione del mercurio totale è stata effettuata mediante un analizzatore AMA-254 (*Automated Mercury Analyzer*, FKV). Le analisi sono state effettuate in triplo direttamente su aliquote di materiale solido, opportunamente omogeneizzato mediante micromulino a biglie.

Le aliquote sono state pesate all'interno di una navicella in nichel mediante bilancia analitica, e introdotte direttamente nello strumento. Le quantità analizzate sono state di circa 50 mg di materiale. Con la quantità indicata è stato generalmente possibile avere una buona intensità del segnale del campione rispetto al bianco. La procedura è stata condotta seguendo il metodo EPA 7473 (US-EPA, 1998). Il metodo si basa sull'essiccamento e sulla successiva decomposizione termica (750 °C) del campione in corrente di ossigeno (in presenza di un catalizzatore per la rimozione selettiva degli alogenuri e degli ossidi di azoto e zolfo). I vapori di mercurio liberati sono raccolti su di un amalgamatore in oro e quindi misurati per via spettrofotometrica a 256,65 nm. Il campo di applicazione del metodo è 0,05–600 ng Hg, lavorando con due range distinti (0,05–50 ng Hg, basso range, e 50–600 ng Hg, alto range).

Il controllo della performance del metodo è stato effettuato mediante: 1) lettura di bianchi (clean) prima dell'analisi e dopo una sequenza di 3 repliche del materiale in esame; 2) lettura in triplo dei campioni: sono stati considerati accettabili i valori con coefficiente di variazione $\leq 5\%$; 3) lettura in triplo del materiale certificato per i sedimenti GBW07305 del *National Standard Centre of China* prima dell'analisi e dopo una sequenza di 9 letture dei campioni: la concentrazione di mercurio è risultata compresa nel range del valore certificato.

I risultati non evidenziano sostanziali differenze di concentrazione di mercurio tra le stazioni esaminate. Pur non essendo noti i valori di fondo per i bacini esaminati, questo potrebbe denotare l'assenza di influenze antropiche significative nei punti esaminati. Se confrontati con Standard di Qualità per i sedimenti ampiamente utilizzati in letteratura scientifica e in normative extra-europee, i valori si attestano al di sotto della *Threshold Effect Concentration* (cb-TEC) di MacDonald et al. (2000), ossia la soglia al di sotto della quale non sono attesi effetti tossici sugli organismi bentonici: tale valore per il mercurio è di 0,18 mg/kg p.s.. Le concentrazioni rilevate attestano verosimilmente l'assenza di rischi tossici per gli organismi acquatici legati alla presenza di mercurio.

Campione	Data di campionamento	Hg mg/kg p.s.
dPT_m	17/02/2016	0.052
dPT_v	17/02/2016	0.053
ML	17/02/2016	0.031

3.13 WP2 (I anno) - Diversità e struttura delle comunità procariotiche ed eucariotiche tramite analisi del metagenoma ambientale (UNIBZ; Lorenzo Brusetti)

Il WP2 studia le comunità microbiche come bioindicatori della presenza di contaminanti emergenti. La struttura e la diversità genetica della comunità microbica sono, infatti, utili strumenti per monitorare lo stato ecologico delle acque e dei sedimenti fluviali.

Personale coinvolto (con relativi mesi uomo consumati dal 15 novembre 2015 al 6 ottobre 2016)

Lorenzo Brusetti, coordinatore WP2 (3 mesi/uomo); Sonia Ciccazzo, postdoc (2 mesi/uomo); Luigimaria Borruso, postdoc (0, 5 mesi/uomo); Francesco Bellamoli (3 mesi/uomo)

3.13.1 Obiettivo 2.1-2.3: Setup della metodologia di campionamento (novembre 2015-dicembre 2015; campionamento febbraio e luglio 2016)

Materiali e Metodi

In totale sono stati raccolti: 10 campioni in inverno e 10 in estate nel Torrente Noce a Mezzolombardo, di cui metà sulla riva destra e metà sulla riva sinistra; 6 campioni in estate e 6 in inverno nel torrente Vermigliana, metà a monte e metà a valle del depuratore di Passo Tonale; 6 campioni in estate e 6 in inverno nel Rio Presena alcune decine di metri a valle della fronte dell'omonimo ghiacciaio.

Il disegno sperimentale preve l'estrazione del DNA metagenomico, l'analisi della struttura delle comunità batteriche dei sedimenti tramite tecnica ARISA, l'identificazione e quantificazione di alcuni geni collegati a processi di inquinamento da contaminanti emergenti tramite Next Generation Sequencing basati su tecnologie Illumina e Real Time PCR.

I metodi di campionamento microbiologico possono essere molto diversi a seconda della matrice ambientale da prelevare. La scelta dipende dalla natura del substrato, dalla granulosità del sedimento, dalla presenza di alghe, ecc. Diverse prove sono state operate utilizzando il letto del torrente Talvera a Bolzano, per la cui lunghezza è possibile trovare sedimenti con caratteristiche affini ai luoghi di campionamento. L'efficienza di campionamento è stata calcolata con il massimo numero di unità formanti colonia dopo piastramento delle cellule batteriche su terreno non selettivo LB. In aggiunta si sono utilizzati anche il terreno LB addizionato degli antibiotici penicillina, tetraciclina e cloramfenicolo. Infine si è usato anche il terreno Pikovskaya specifico per fosfato solubilizzatori, relativamente comuni in substrati ricchi di minerali. Il protocollo utilizzato fa riferimento alla direttiva statunitense SESDPROC200R3 "Sediment Sampling" pubblicato dalla US EPA in data 21 agosto 2014 (US-EPA, 2014). Sono stati prelevati 22 campioni durante l'anno 2016, solo parzialmente analizzati (si vedano i paragrafi successivi).

Risultati e Discussione

La Tabella 26 mostra le cariche batteriche nei sedimenti del torrente Talvera, calcolate su 5 repliche. Le UFC su LB risultano essere in logaritmo 7, un valore nella norma nei

sedimenti fluviali alpini. Lo stesso protocollo può dunque essere adottato per i campionamenti previsti.

Tabella 26 - Carica batterica su Pikoskaya agar, ed LB agar con o senza antibiotici effettuata sui sedimenti del torrente Talvera per testare la bontà del metodo di campionamento.

	LB	LB + Pen	LB + Tet	LB + Clor	Pik
Media	3.72E+07	8.00E+05	0.00E+00	2.00E-01	2.76E+06
DS	4.82E+07	1.46E+06	0.00E+00	3.65E-01	3.32E+06

3.13.2 Obiettivo 2.2: Setup delle metodologie di laboratorio (novembre 2015-febbraio 2016) ed Estrazione del DNA metagenomico (Obiettivo 2.4) (marzo e settembre 2016)

Materiali e Metodi

La matrice scelta nell'analisi è il sedimento umido di torrenti e fiumi di montagna provenienti da matrici geologiche di tipo minerale acido.

L'estrazione del DNA è stata operata con due diversi kit commerciali (DNEASY, Qiagen; PowerSoil MoBio). La frammentazione del sedimento è stata operata con tre strumenti diversi, un mulino, un vortex e una ruota miscelatrice, in modo da consentire il distacco delle cellule batteriche dai biofilm, aumentarne la quantità nelle soluzioni di lisi e permettere il recupero di una maggiore quantità di DNA.

Il fingerprinting ARISA è stato utilizzato per stabilire il metodo estrattivo migliore in termini di ricchezza della comunità batterica. La tecnica ARISA è stata eseguita come descritto da Cardinale et al. (2004), con il set di primers ITSF / ITSREub. Il primer è stato dimostrato essere universale, amplificando rappresentanti di tutti i phyla batterici. I frammenti ARISA sono stati amplificati e controllati su gel di agarosio. La separazione elettroforetica e la sua visualizzazione sono state ottenute in prima istanza mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.5%. Tale concentrazione è caratterizzata da un potere di risoluzione adatto a separare frammenti da 100 a 1500 bp. I prodotti denaturati risultati positivi alla reazione sono stati inviati a STAB-Vida Inc per la separazione elettroforetica capillare. I dati sono stati analizzati con Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems), utilizzando una soglia di 40 unità fluorescenti è stata utilizzata, corrispondente a due volte il picco più alto rilevato durante la corsa di un controllo negativo. La matrice di uscita è stata ottenuta come da Rees et al. (2004, Antonie van Leeuwenhoek).

Risultati e Discussione

Le analisi ARISA mostrano chiaramente che tramite l'uso del kit PowerSoil MOBIO è possibile ottenere un DNA più abbondante e pulito in modo da poter osservare più picchi ARISA (Figura 17). Mulino e ruota hanno dato risultati simili con una presenza più significativa ($p < 0.05$) di picchi rispetto all'uso del vortex (Figura 18). Il mulino alla fine è stato preferito poiché il mulino è uno strumento più veloce della ruota miscelatrice.

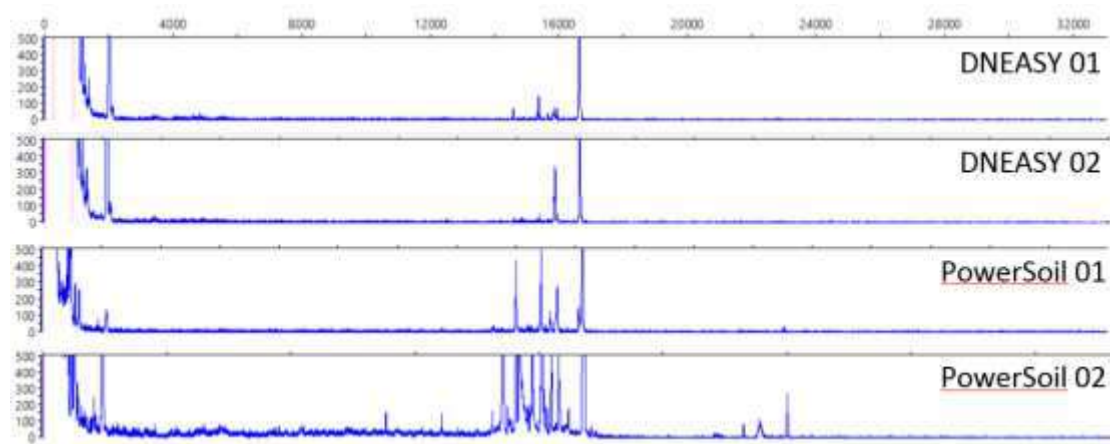


Figura 17 - Risultati dell'analisi ARISA di due campioni dei sedimenti del torrente Presena, estratti rispettivamente con i kit DNEASY Qiagen e PowerSoil Mobio.

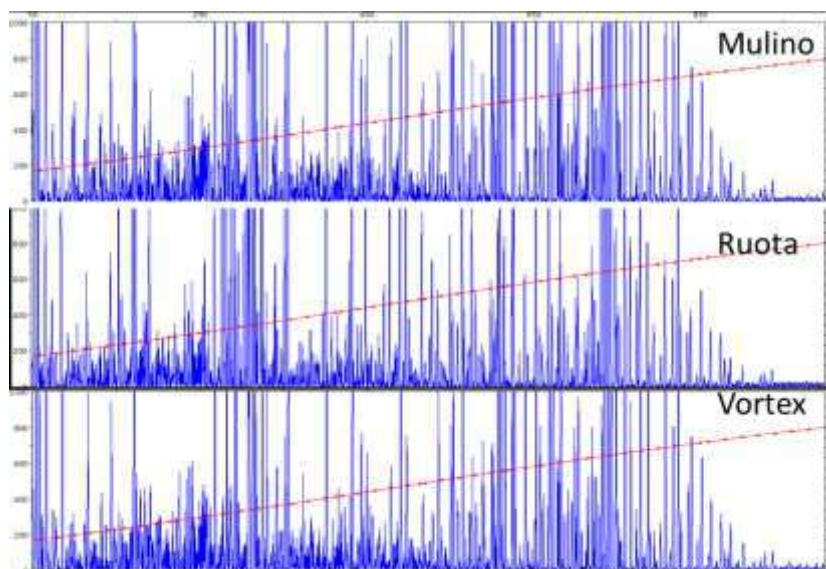


Figura 18 - Confronto tra gli elettroferogrammi ARISA della struttura delle comunità batteriche di sedimenti di un campione di prova, il cui DNA è stato estratto con il kit PowerSoil preceduto da step di lisi del biofilm tramite (i) mulino, (ii) ruota miscelatrice, (iii) vortex.

L'estrazione del DNA tramite il protocollo adottato ha dato risultati buoni, eccetto per alcuni campioni, nonostante l'incremento di sedimento di partenza per aumentarne la resa (Figura 19). Tuttavia la quantità di DNA non è pregiudizievole per le analisi successive, poiché un DNA abbondante potrebbe non essere analizzabile a causa di un'alta concentrazione di inibenti, mentre un DNA scarso potrebbe essere molto pulito e quindi rendere agevoli le successive analisi.

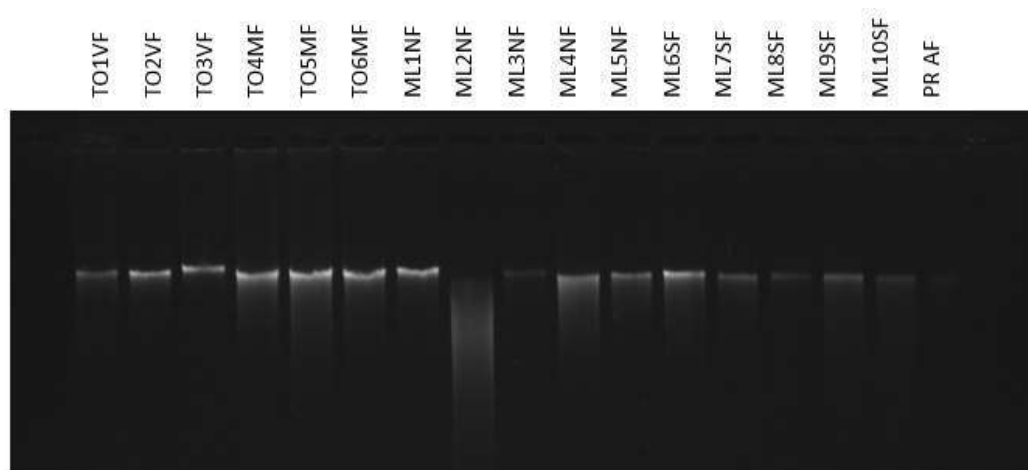


Figura 19 - Esempio di Gel d'elettroforesi in agarosio del DNA totale estratto da alcuni campioni: TO = Tonale; ML = Mezzolombardo; PR = Presena; F indica il campionamento di febbraio.

3.13.3 Obiettivo 2.5: Fingerprinting ARISA (marzo-maggio 2016 e settembre-ottobre 2016)

Materiali e Metodi

La metodologia di laboratorio è descritta in punto 3.13.2. Gli elettroferogrammi sono stati analizzati con il software Peak Scanner (Applied Biosystems). Le matrici con i picchi corrispondenti ai profili ARISA sono state sottoposte ad analisi NMDS. Una matrice quantitativa è stata creata sulla base della assenza o la presenza di bande di DNA e sulla base delle altezze relative dei picchi, normalizzate. Le analisi NMDS e degli indici di diversità sono state effettuate con i software PAST ed R. ARISA eseguito, analisi quasi completata.

Risultati e Discussione

L'analisi ARISA delle tre tipologie di sedimento raccolte (Presena, Tonale e Mezzolombardo) ha dato ottimi risultati, con una quantità di picchi per sito che variava tra 288 e 420 (Figura 20).

Ogni picco rappresenta la presenza di una specie o sottospecie batterica, mentre l'altezza è funzione della sua quantità nel campione. In alcuni campioni sono stati raggiunti numeri superiori a 400 picchi, valore che si avvicina alla massima risoluzione della tecnica pari a circa 500 picchi). Le analisi della riproducibilità delle repliche e l'analisi statistica dei dati non sono state completate.

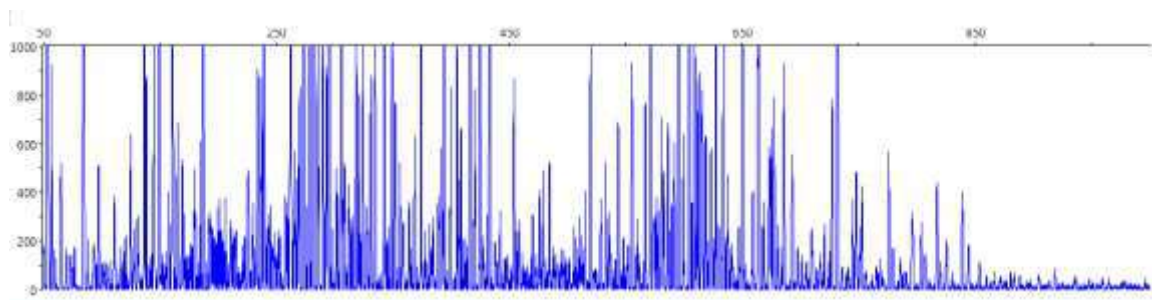


Figura 20 - Esempio di elettroferogramma. In ordinata le unità di fluorescenza. Per unità maggiori di 20, il picco è considerato reale e denota la presenza di una specie o sottospecie batterica. In ascissa la distribuzione dei picchi in paia di basi.

Tra loro i siti mostrano comunità batteriche profondamente diverse (Figura 21). Ciò è un dato atteso sulla base delle differenze chimico-fisiche dell'acqua (WP3) e dei sedimenti. L'analisi ARISA è risultata essere una tecnica predittiva in quanto un ipotetico campione di provenienza sconosciuta e prelevato in uno dei tre siti, può essere identificato a seguito delle analisi. Inoltre osservando l'NMDS non è possibile identificare sottogruppi più specifici. Questo è importante per il sito di Tonale, poiché le differenze tra monte e valle del depuratore sono di molto inferiori delle differenze tra i tre siti. Per cui le variabili ambientali e chimiche che differenziano Presena da Tonale e Mezzolombardo da Tonale sono più forti delle eventuali differenze chimiche che si hanno nei sedimenti a monte e a valle del depuratore di Tonale.

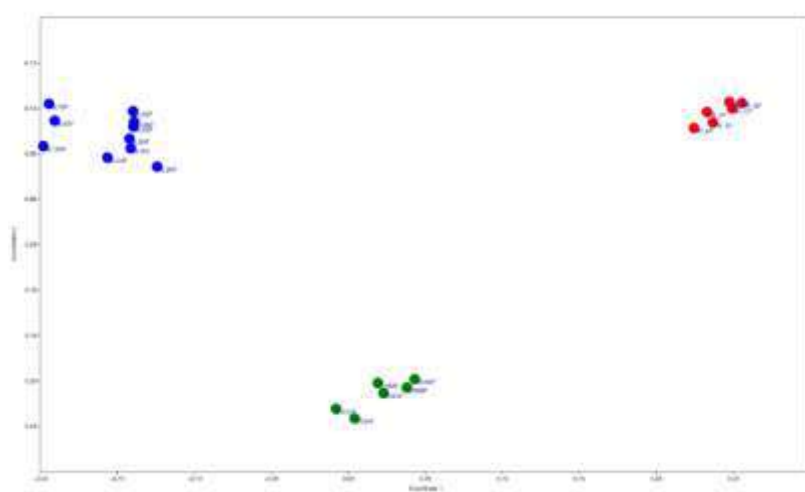


Figura 21 - NMDS degli ARISA dei campioni di febbraio. In blu: Mezzolombardo, in verde Tonale, in rosso Presena.

Sito di Mezzolombardo

Il sito di Mezzolombardo presenta una ricchezza di specie batteriche molto elevata con un numero di picchi che va da 390 a 420 (Figura 22).

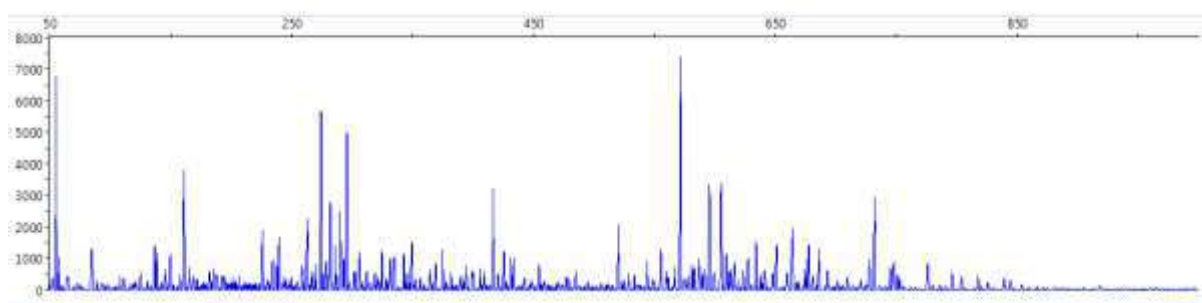


Figura 22 - Un esempio di elettroferogramma proveniente da Mezzolombardo (sample 4 July). Ordinata: Unità di fluorescenza a 8000.

Questo dato mostra che i sedimenti del torrente Noce sono particolarmente ricchi dal punto di vista microbiologico e questa condizione generalmente determina competizione per le risorse con conseguente stress ecologico. La presenza di molte specie batteriche è correlata in microbiologia con un'alta reattività cometabolica, ossia produzione di antibiotici naturali, sviluppo di resistenze, trasferimento genetico orizzontale di informazioni genetiche vantaggiose in alta densità cellulare, meccanismi di quorum sensing e quorum quencing, ed altri meccanismi.

Le analisi NMDS mostrano che vi è una differenza tra la struttura delle comunità batteriche nei sedimenti della riva destra, rispetto alla riva sinistra (Figura 23), evidente in luglio e poco significativa in febbraio.

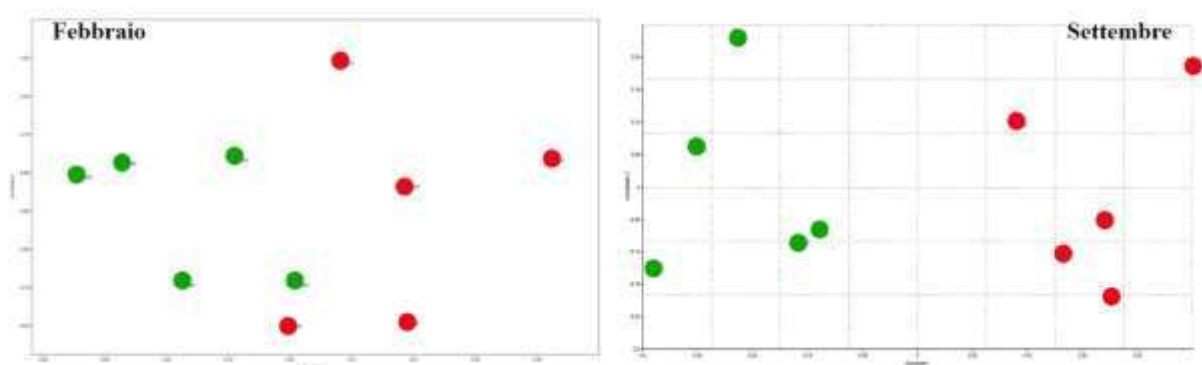


Figura 23 - NMDS degli ARISA di Mezzolombardo in febbraio e luglio. Verde: riva nord; rosso: riva sud.

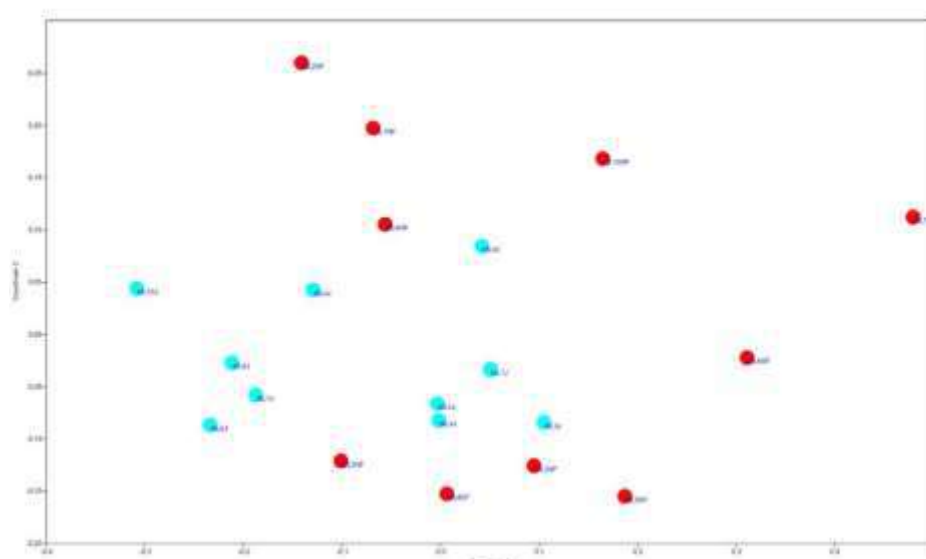


Figura 24 - NMDS degli ARISA di Mezzolombardo plottando tutti i campioni. In rosso febbraio, in azzurro luglio.

La Figura 24 mostra che a Mezzolombardo la stagionalità è un fattore più importante del chimismo delle due rive, in quanto plottando tutti i dati tra loro, si mostra un rimescolamento complessivo dei campioni, non più separati né per stagione, né per riva. La stagionalità quindi è un fattore di disturbo che uniforma le comunità batteriche. Pertanto l'eventuale fattore chimico che a luglio determinava la separazione delle rive, risulta essere più debole dei fattori stagionali.

Sito del Tonale

Anche il sito di Tonale, indipendentemente dal fatto che i campioni siano stati presi a monte o a valle del depuratore, mostra una ricchezza di specie notevole, seppur leggermente inferiore al fiume Noce a Mezzolombardo (picchi tra 288 e 419 (Figura 25).

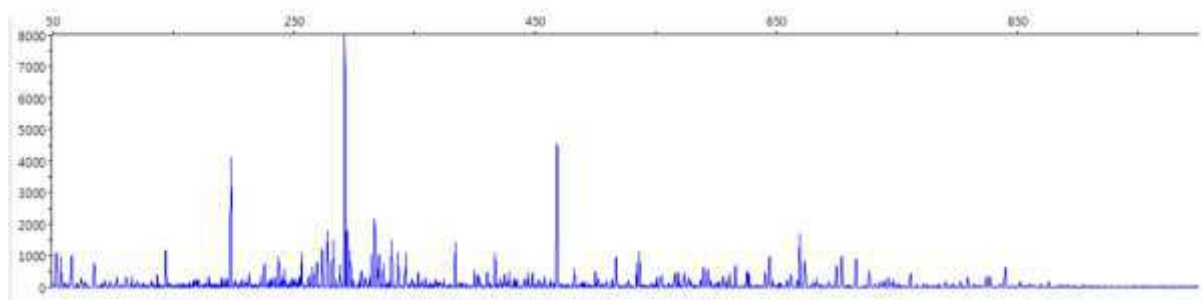


Figura 25 - Un esempio di elettroferogramma proveniente da Tonale valle (sample 5, July). Ordinata: Unità di fluorescenza a 8000.

Le analisi NMDS (Figura 26) mostrano che a febbraio vi è una marcata separazione tra comunità batteriche a monte e a valle del depuratore (influenza del turismo stagionale?), mentre tale separazione risultava meno netta a luglio. Analisi statistiche approfondite sono tuttora in corso.

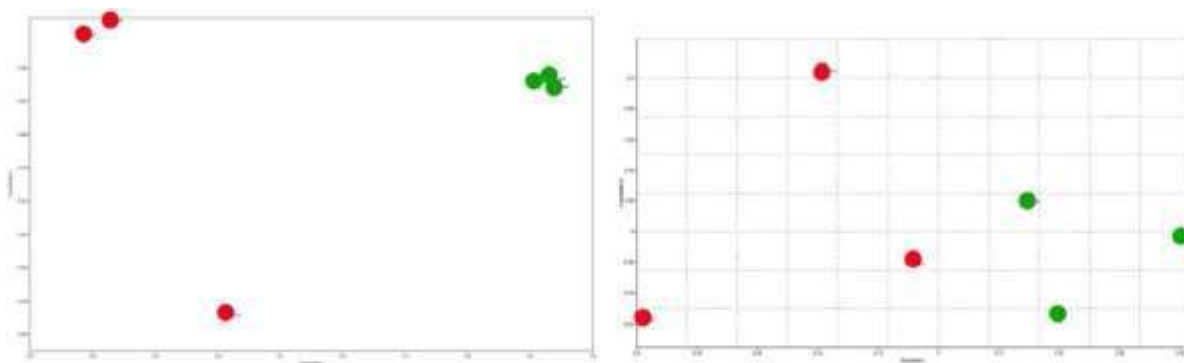


Figura 26 - NMDS dei campioni del Tonale; verde stazioni a monte; rosso stazioni a valle.

L'NMDS (Figura 27) evidenzia una netta separazione stagionale, e il mantenimento della separazione tra i siti a monte e a valle in entrambe le stagioni. La separazione è più marcata a febbraio, segno che nella stagione invernale l'influenza delle emissioni del depuratore sono più marcate che in estate. Questo risultato rende particolarmente interessanti le indagini metagenomiche in queste stazioni. Ciò può essere dovuto a particolari fattori chimici, quali la diversa concentrazione di composti del carbonio o dell'azoto, oppure la presenza di microinquinanti organici o inorganici. Saranno a tal proposito essenziali i dati che ci forniranno le altre UR per comprendere quali fattori possano portare a questa differenza tra le due stazioni.

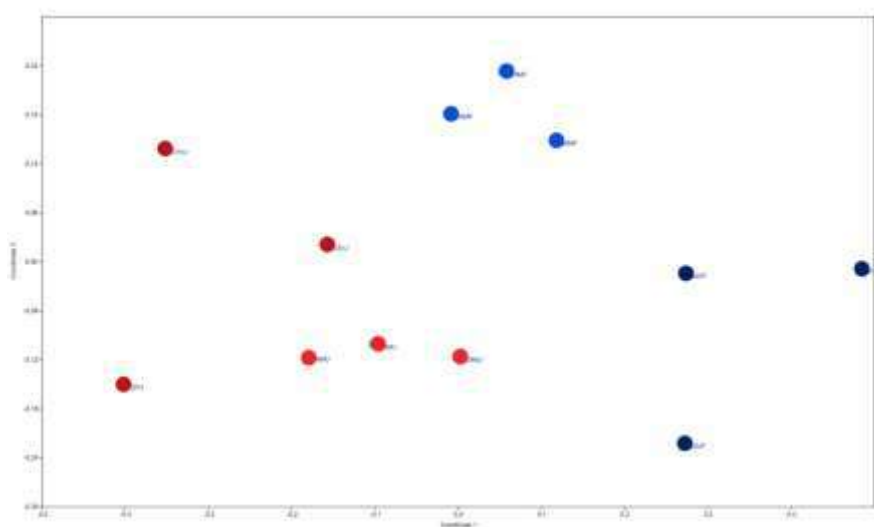


Figura 27 - NMDS degli ARISA di Tonale plottando tutti i campioni. In blu chiaro Monte febbraio; blu scuro Valle febbraio; rosso chiaro Monte febbraio; rosso scuro Monte luglio.

Sito di Presena

Il sito del ghiacciaio di Presena (Figura 28) è stato campionato in febbraio in condizioni di innevamento (3 metri di neve) e di sedimento congelato. Ciò nonostante la presenza di batteri (269-368 picchi) è paragonabile ai siti del Tonale e questo conferma quanto visto dal nostro gruppo di ricerca e da altri gruppi sulla alta diversità di batteri presente sui fronti morenici glaciali.

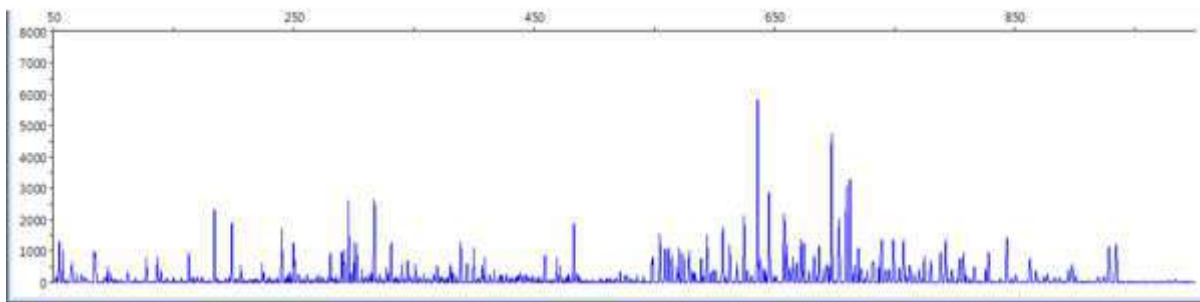


Figura 28 - Un esempio di elettroferogramma proveniente da Presena (sample B, July). Ordinata: Unità di fluorescenza a 8000.

L'NMDS (Figura 29) mostra una marcata separazione dei campioni sulla base delle due stagioni, mentre all'interno delle singole stagioni non si osservano differenze tra siti di campionamento. La ragione di questa divisione potrebbe essere dovuta allo stato fisico dei sedimenti (congelati o non congelati), oppure alle attività antropiche che vengono effettuate nei pressi del sito oggetto di analisi (costruzione di strutture sportive). Sono in corso da parte della UR di Bolzano ulteriori analisi statistiche.

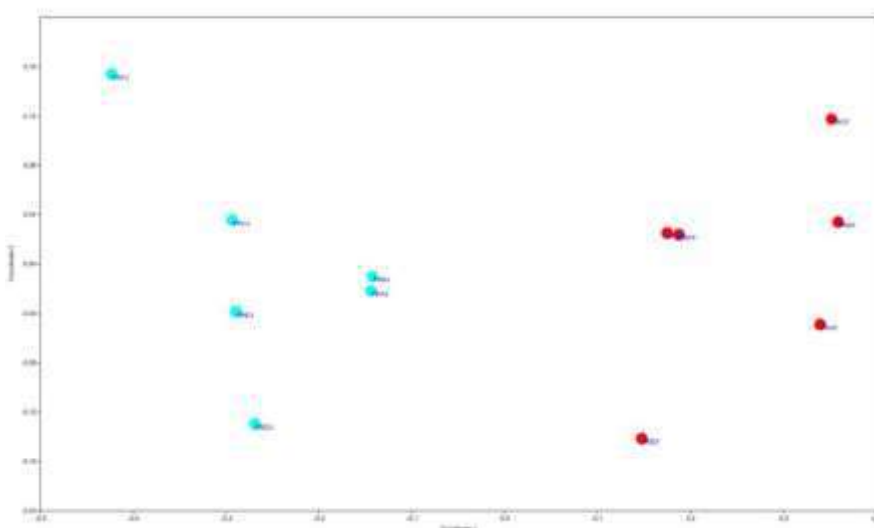


Figura 29 - NMDS degli ARISA di Tonale plottando tutti i campioni. In rosso Febbraio, in azzurro Luglio.

3.13.4 Obiettivo 2.6: Shotgun Metagenome Sequencing (ottobre 2016)

Materiali e Metodi

In attesa di operare le reazioni legate all'NGS, si è scelto di studiare specifici geni collegati all'inquinamento da antibiotici. Abbiamo scelto in particolare la distribuzione degli integroni di classe 1, classe molto studiata nella ricerca di batteri antibiotico-resistenti. La distribuzione è stata valutata tramite rilevazione della presenza del gene dell'integrasi (int1) nei campioni di sedimento. Poiché tale tecnica è innovativa e poco studiata a livello globale, è stato necessario mettere a punto il setup sperimentale per il

DNA proveniente da sedimenti minerali. Al fine di impostare la procedura analitica e per verificare la sua efficienza, in primo luogo abbiamo utilizzato campioni di DNA di uno specifico ceppo di *Salmonella enterica* sierotipo Typhimurium 490. In particolare, abbiamo valutato il funzionamento di una reazione di PCR per l'amplificazione della regione *intI1*, utilizzando un ceppo specifico di *S. enterica* che mostra sempre nella sua sequenza di DNA la regione *intI1* altamente conservata. Questa peculiarità è frequente in una notevole quantità di ceppi ambientali di questo batterio. Abbiamo quindi applicato la reazione di PCR su campioni di DNA già estratti da microcosmi contenenti batteri coltivati su catrame. Il protocollo di riferimento è stato quello usato da Borruso et al., (2016) su campioni di rizosfera di canneti naturali.

Dopo la messa a punto del metodo, la tecnica è stata applicata ai campioni. Le PCR sono ancora in fase di esecuzione.

Risultati e Discussione

Il settaggio su catrame (tar) biodegradato è stato positivo. La scelta è dovuta al fatto che *intI1* è ospitato su trasposoni che facilmente vengono selezionati in ambienti estremamente inquinati. Per cui ci si aspettava che in tali microcosmi *intI1* fosse presente, almeno in alcuni campioni. La Figura 30 mostra che diverse bande sono visibili: sono presenti più prodotti perché la lunghetta di *intI1* è molto variabile e può essere presente sottoforma di polimorfismi di lunghezza nel genoma batterico.

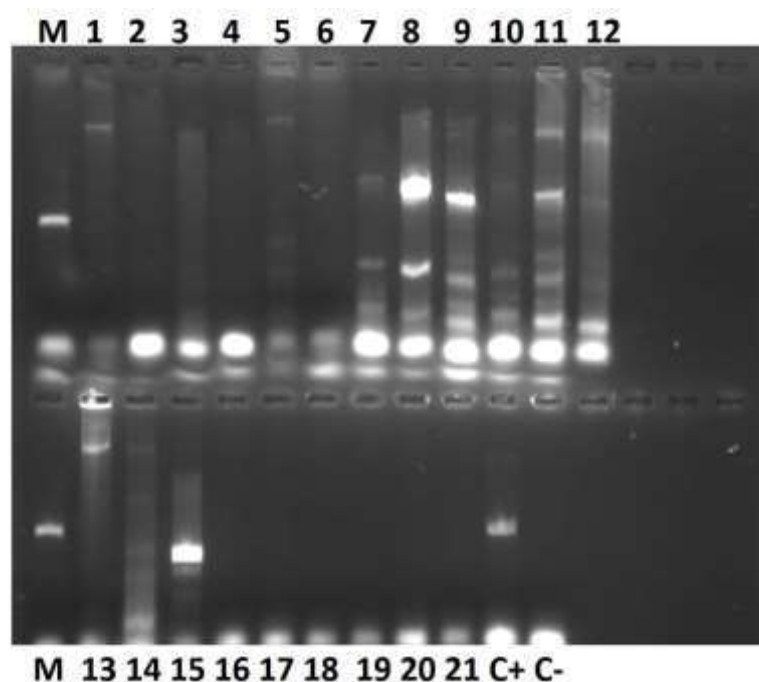


Figura 30 - Esempio di integroni *IntI1* amplificati durante il processo di settaggio. M = Marker dell'altezza del C+; C+: *S. enterica*; 1-21 campioni di catrame biodegradato da batteri.

La tecnica è poi stata applicata sui nostri campioni, sebbene le amplificazioni non sono ancora state terminate. Non sono state rilevate amplificazioni positive a dimostrare che i campioni di sedimento sono caratterizzati, se presenti, da quantità del gene *int1* sotto il limite di rilevabilità (Figura 31).



Figura 31 - Gel d'elettroforesi con i risultati della detection dell'integrone *int1* da campioni di Mezzolombardo in febbraio. In grigio è la griglia in cui eventuali segnali positivi devono essere presenti.

3.13.5 Obiettivo 2.8: Real Time PCR per quantificazione carica batterica (marzo 2016-ottobre 2016)

Materiali e Metodi

La RT-PCR è una tecnica che fornisce una quantificazione degli acidi nucleici presenti in miscele di estrazioni derivanti da campioni ambientali a composizione biologica ignota. Tale tecnica supera i limiti della tradizionale tecnica di PCR permettendo la quantificazione sia assoluta, sia relativa degli ampliconi prodotti. La RT-PCR si basa sull'utilizzo di un fluorocromo SYBR-Green che lega ad alta affinità e in modo non specifico il DNA a doppia elica. Presenta un massimo di eccitazione a $\lambda=497/584$ nm e di emissione a $\lambda=520/612$ nm.

Nello stato non legato il fluorocromo mostra bassa fluorescenza. Tuttavia, quando si intercala con il doppio filamento di DNA (dsDNA) prodotto durante la fase di amplificazione, la fluorescenza aumenta enormemente. Rispetto alla PCR tradizionale, il prodotto di amplificazione della qPCR deve essere più corto, rendendo l'amplificazione più efficiente. Utilizzando il grafico della curva di amplificazione, l'operatore deve stabilire un valore di soglia (threshold) al quale verranno calcolati i threshold cycle (Ct). Normalmente si utilizza un valore situato nella fase esponenziale del grafico.

Per poter quantificare il DNA presente nei campioni in esame bisogna utilizzare uno standard di riferimento che nel nostro caso è un plasmide diluito serialmente contenente una singola copia del gene bersaglio in esso clonata. Gli standard ci sono stati gentilmente offerti dal laboratorio del Dr. Luciano Beneduce, dell'Università di Foggia, con il quale l'UR di Bolzano ha avuto una convenzione di ricerca (convenzione denominata BZ-FG-AGR16). La reazione di RT-PCR è stata effettuata con un RotorGene Qiagen utilizzando il kit iQ SYBER® GREEN SUPERMIX e seguendo il protocollo consigliato dalla ditta. I geni interessati finora da questa analisi sono il 16S

rRNA, i geni di apertura dell'anello aromatico (C23O), mentre si sta valutando l'uso di altri geni in funzione dei dati degli altri WP.

Risultati e Discussione

La messa a punto del metodo e gli esperimenti di Real Time del gene 16S rRNA sono iniziati nella seconda metà di agosto e sono ancora in corso (Figura 32). La standardizzazione è stata piuttosto difficile in quanto i DNA provenienti da sedimenti minerali hanno sempre degli inibenti che interferiscono con l'enzima DNA polimerasi della Real Time, enzima che è molto più sensibile rispetto a quelli usati nelle normali PCR. Nei prossimi mesi si continuerà con gli esperimenti.

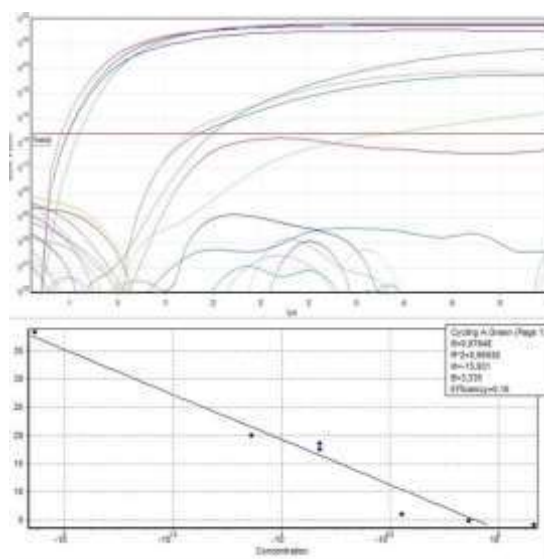


Figura 32 - qPCR di standard e di alcuni campioni di prova per la quantificazione del gene 16S rRNA.

3.14 WP2 (II anno) - Valutazione degli effetti di miscele di contaminanti emergenti (CE) sulla componente microbica (resp. dott.ssa Valeria Di Nica, UNIMIB)

Il WP2 ha avuto come obiettivo generale la valutazione degli effetti di miscele di contaminanti potenzialmente presenti nel torrente Vermigliana a valle dell'impianto di depurazione di Passo del Tonale. Come organismo test è stato scelto il batterio bioluminescente *Aliivibrio fischeri* e come metodo di indagine è stato applicato il metodo MICROTOX®. Due sono stati gli approcci principali seguiti in questo studio: **a)** diretta valutazione della tossicità degli effluenti trattati provenienti dal depuratore in oggetto (whole-mixture approach) e **b)** stima della tossicità totale della miscela di contaminanti potenzialmente scaricati con gli effluenti a partire dalle informazioni sui suoi componenti (component-based approach). È stato effettuato uno studio sul modo di azione esercitato dai contaminanti selezionati su *A. fischeri* mediante l'applicazione di modelli QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship). Sono stati applicati alcuni strumenti predittivi di tossicità di miscela ampiamente utilizzati in eco-tossicologia dalla comunità scientifica internazionale, ovvero i modelli di Concentration Addition (CA) e Independent Action (IA). È stato applicato il metodo della Combination Index (CI) allo scopo di indagare e quantificare la natura delle interazioni eventualmente occorrenti tra le sostanze in miscela.

Personale coinvolto: Coordinatore di WP2 Valeria Di Nica (4 mesi/uomo).

3.14.1 Obiettivo 1. Valutazione degli effetti degli effluenti provenienti dal depuratore di Passo del Tonale secondo l'approccio "whole-mixture" (marzo – ottobre 2017)

Come integrazione alle indagini sui macro-invertebrati bentonici così come richiesto dalla normativa nazionale (D. Lgs. 152/2006) e comunitaria (EC, 2000) e unitamente alle analisi genotossiche e chimiche condotte in altri WP, stati condotti saggi ecotossicologici su *Aliivibrio fischeri*. Tale approccio integrato risulta essere suggerito anche dall'Istituto Superiore di Sanità nel recente rapporto "*Selezione degli indicatori nella valutazione della salute degli ecosistemi acquatici*" (ISTISAN 16/3, 2016).

Materiali e metodi

Gli effluenti oggetto di studio sono stati prelevati in uscita al depuratore localizzato in Passo del Tonale (<http://adep.heidix.net/plant.html?PT>; Trentino, NE Italy; 46°N, 10°E) prima della sua diluizione nel Torrente Vermigliana. Il campionamento è stato effettuato in data 6 marzo 2017, il giorno dopo la fine delle vacanze di carnevale. L'impianto di Passo del Tonale è progettato per servire 10.000 abitanti equivalenti e attua trattamenti convenzionali (ossidazione, sedimentazione secondaria). Le principali informazioni tecniche relative ai processi di trattamento possono essere scaricate dalla pagina web dell'Agenzia per la Depurazione della Provincia di Trento (<https://adep.provincia.tn.it/Agenzia-per-la-Depurazione-ADEP>). I campioni sono stati raccolti in bottiglie d'acqua graduate sterili in polipropilene (PP) (da LP Italiana, Milano, Italia), conservati refrigerati durante il trasporto e successivamente conservati a -20°C. Prima di condurre i test di tossicità, il pH del campione è stato misurato con l'ausilio di un pHmetro (modello 250; Denver Instrument) e aggiustato nel range di pH compreso tra 6.00 e 8.50 in accordo alle procedure DIN EN ISO 11348-3 (2007) sulla

determinazione degli effetti di inibizione di bioluminescenza su *A. fischeri* di campioni acquosi. In aggiunta, allo scopo di riprodurre la pressione osmotica minima necessaria alla sopravvivenza dell'organismo, è stata aggiustata l'osmolarità del campione mediante addizione di NaCl 2% (DIN EN ISO 11348-3, 2007).

Materiali

Apparecchiature

- Congelatore per la conservazione delle sospensioni batteriche a -20°C.
- Luminometro Microtox® Model 500 ANALYZER con celle di misura termostata a $15 \pm 1^\circ\text{C}$ e blocco termostatico a $15 \pm 1^\circ\text{C}$ per la lettura a 490 nm di lunghezza d'onda della luminescenza emessa dalle sospensioni batteriche.
- Bagno termostatico per la riattivazione dei batteri secondo le istruzioni del produttore.
- Cuvette di misura adatte al luminometro in uso, di materiale chimicamente inerte.
- Computer dotato di software per l'elaborazione dei dati.
- pH-metro
- Micropipette a volume variabile da 10 a 200 μL e da 200 a 5000 μL con adeguati puntali.

Reattivi

Organismo test

Per il test Microtox® è stato utilizzato il ceppo NRRL-B-11177 della specie *Aliivibrio fischeri* depositato presso il DSM, Mascheroder Weg 16, 38124 Braunschweig, Germany, o presso l'American Type Culture Collection, 12301 Parkland Drive, Rockville, Maryland, U.S.A. I batteri sono stati acquistati in forma liofilizzata e conservati alla temperatura di -20°C.

Soluzione ricostituente

La soluzione ricostituente per la riattivazione delle sospensioni batteriche presenta la seguente composizione in un 1 litro di acqua distillata: 8 g di D(+)glucosio monoidrato ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$); 20 g di NaCl; 2,035 g di magnesio cloruro esaidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); 0,30 g di potassio cloruro (KCl); a pH $7 \pm 0,2$.

Soluzione diluente

La soluzione diluente è stata ottenuta sciogliendo 20g di NaCl in 1 litro di acqua distillata, aggiustando il pH a $7 \pm 0,2$ con l'ausilio di NaOH 1 M o HCl 1 M.

Il sistema MICROTOX®

Il sistema per la valutazione della tossicità Microtox® è stato messo a punto alla fine degli anni 70 negli USA ed è da tempo diventato un valido strumento di screening per il controllo della qualità dei campioni ambientali (effluenti di scarico domestici ed industriali, acque di fiumi, sedimenti e suoli) grazie al suo ampio spettro di sensibilità a diversi composti sia organici che inorganici. Il test Microtox® è un saggio di tossicità acuta usato per la determinazione, tramite la sua inibizione rispetto al controllo, della luce emessa da sospensioni di batteri della specie *Aliivibrio fischeri* (Eubacteria,

Vibrionacea) esposte a diverse diluizioni di una sostanza o di una miscela potenzialmente tossica. L'organismo indicatore scelto è un batterio marino bioluminescente gram-negativo, aerobio-anaerobio facoltativo, in grado di emettere luce di colore blu-verde con una lunghezza d'onda massima pari a 490 nm, tramite la seguente reazione chimica:



La sequenza di reazioni che provoca l'emissione di luce è associata alla catena respiratoria di trasporto degli elettroni ed è catalizzata dall'enzima luciferasi (ossigenasi a funzione mista connessa alla membrana cellulare) che ossida la luciferina batterica (aldeide alifatica a catena lunga) e la riboflavina 5-P, trasferendo elettroni all'ossigeno e producendo l'emissione di luce.

Quando *A. fischeri* viene a contatto con agenti tossici si ha un abbassamento quantificabile della bioluminescenza emessa. Il meccanismo attraverso cui questo avviene non è ancora del tutto chiaro. Probabilmente la riduzione di emissione di luminescenza avviene a causa di un rallentamento delle reazioni di produzione di energia della cellula dovuta alla inibizione di qualche enzima o all'interferenza nei processi di trasporto della membrana cellulare da parte delle sostanze tossiche. Tuttavia, si ipotizza la presenza di una molteplicità di siti di azione da parte degli agenti tossici sul batterio poiché è stato visto che l'inibizione della produzione di bioluminescenza è provocata da sostanze tossiche di diversa natura (Perin, 2004). In questo contesto, l'inibizione di bioluminescenza può essere ragionevolmente assunta come un indicatore della variazione dello stato di salute dell'organismo e quindi dell'effetto che il tossico stesso esercita sulla coltura microbica.

La percentuale di inibizione della luminescenza (*ICx%*) prodotta da un campione ambientale viene calcolata secondo l'equazione 1:

$$ICx\% = \frac{I_b - I_c}{I_b} * 100 \quad \text{eq. 1}$$

dove:

ICx% è l'inibizione % della bioluminescenza, *I_b* è la luminosità della soluzione di controllo e *I_c* è la luminosità del campione saggiato. La differenza nella quantità di luce emessa opportunamente corretta per la diminuzione di luce che si verifica fisiologicamente in assenza di tossicità è proporzionale all'effetto del campione sui microrganismi.

Procedura saggio Microtox®

I test sono stati eseguiti in accordo alle condizioni e al protocollo operativo previsto dal manuale di istruzioni del sistema Microtox® (Test di tossicità acuto, procedura "whole effluent toxicity (WET)" per gli effluenti; (Azur Environmental, 1998)) che si basa sulla misura della riduzione della bioluminescenza emessa dal batterio *Aliivibrio fischeri* (ex *Vibrio fischeri* o *Photobacterium phosphoreum*) esposto ad agenti tossici o campioni ambientali. I batteri liofilizzati e congelati e la soluzione ricostituente sono stati acquistati da Ecotox LDS s.r.l. (Milano, Italia). L'inibizione della luminescenza è stata misurata utilizzando lo strumento Microtox® Model 500 Analyzer in modalità acuta. La popolazione monospecifica di 10⁶ cellule di batteri è stata esposta ai campioni ambientali e loro diluizioni per 15 minuti. La temperatura durante l'esposizione è stata di 15 °C. Il saggio ha permesso di calcolare per ciascun campione i valori di *ICx* cioè la concentrazione (o frazione) di campione ambientale che ha provocato una riduzione di

x% (es. 50%) della bioluminescenza. I test di tossicità sono stati eseguiti in duplicato su un controllo e nove diverse diluizioni dell'effluente con diluizioni seriali effettuate in soluzione di NaCl 2% (fattore di diluizione: 2 e 1.50). Ogni test è stato condotto almeno 3 volte con un totale di 6 repliche per ogni concentrazione testata. In questo studio, il valore soglia di inibizione di bioluminescenza (ICx%) preso in considerazione per stabilire la presenza dello stato di tossicità del campione ambientale è del 20% (APAT, 2002). Se il valore di inibizione percentuale riferito al campione tal quale è inferiore al 20% il campione viene classificato come privo di tossicità acuta, se ricade nel range compreso tra $\geq 20\%$ e $< 50\%$ viene classificato come debolmente tossico. Risulta invece classificato come tossico se il valore di ICx risulta superiore o uguale al 50%.

Analisi statistiche

La probabilità del verificarsi di un evento di tossicità, ICx (inibizione della bioluminescenza) in funzione della concentrazione chimica c (o frazione del campione ambientale) e di un vettore di parametri (θ_1 ; θ_2) è stata ottenuta usando il modello di regressione non lineare a due parametri di Weibull (W2.2) (equazione 2):

$$ICx = (c, \theta) = 1 - \exp \{- \exp \{ \ln (\theta_2 (\ln (c) - \ln (\theta_1))) \} \} \quad \text{eq. 2}$$

Con questo modello matematico è stato possibile ottenere la relazione concentrazione-risposta per il campione ambientale testato. Per la scelta del modello matematico da applicare è stato effettuato un confronto tra diversi modelli di regressione non lineare (Weibull; Log Normal; Logistic e Log Logistic a due, tre e quattro parametri) mediante analisi della bontà di adattamento dei modelli matematici con le funzioni log likelihood e Akaike Information Criterion (AIC). È stato selezionato il modello di Weibull a due parametri che ha fornito una buona stima dei parametri statistici dei coefficienti di regressione stimati (θ_1 e θ_2). È stata effettuata anche l'analisi dei residui del modello applicato mediante il test Kolmogorov-Smirnov. Tutte le analisi statistiche e i valori di ICx con gli intervalli di confidenza al 95% sono stati ottenuti utilizzando il software R® (R Core Team, 2017).

Risultati e Discussione

In Tabella 27 sono mostrati i valori di inibizione di bioluminescenza raggiunti a varie diluizioni dell'effluente del depuratore di Passo del Tonale, mentre in Tabella 28 è mostrata la bontà del modello applicato per descrivere la curva concentrazione-risposta ottenuta.

Tabella 27 - Valori di inibizione di bioluminescenza (IC10; IC20 e IC21) per lo scarico studiato (% di effluente nel campione saggiato e intervallo di confidenza medio al 95% in parentesi).

IC _x	% effluente
IC ₁₀	8.3% (5.1%-11.5%)
IC ₂₀	89% (64%-114%)
IC ₂₁	100% (71%-129%)

Tabella 28 - Parametri statistici del modello di regressione selezionato e risultati del test di Kolmogorov-Smirnov.

Parametri W2.2	modello	Std. Error	t-value	p-value	n-1	ks.test p-value
θ_1	3.16E+03	2.06E+02	153.599	< 2.2e-16 ***	69	0.43
θ_2	1.03E+08	3.74E+07	27.631	0.007333 **		

Livello di significatività statistica: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

In Figura 33 viene riportata la relazione concentrazione–risposta (% di effluente in funzione della % di inibizione di bioluminescenza) ottenuta. In Figura 34 i valori medi di inibizione di bioluminescenza raggiunti dallo scarico tal quale (100% effluente) e da varie diluizioni rilevanti per l'ambiente (90%, 75%, 50% e 25% di effluente presente) sono rappresentati in istogramma.

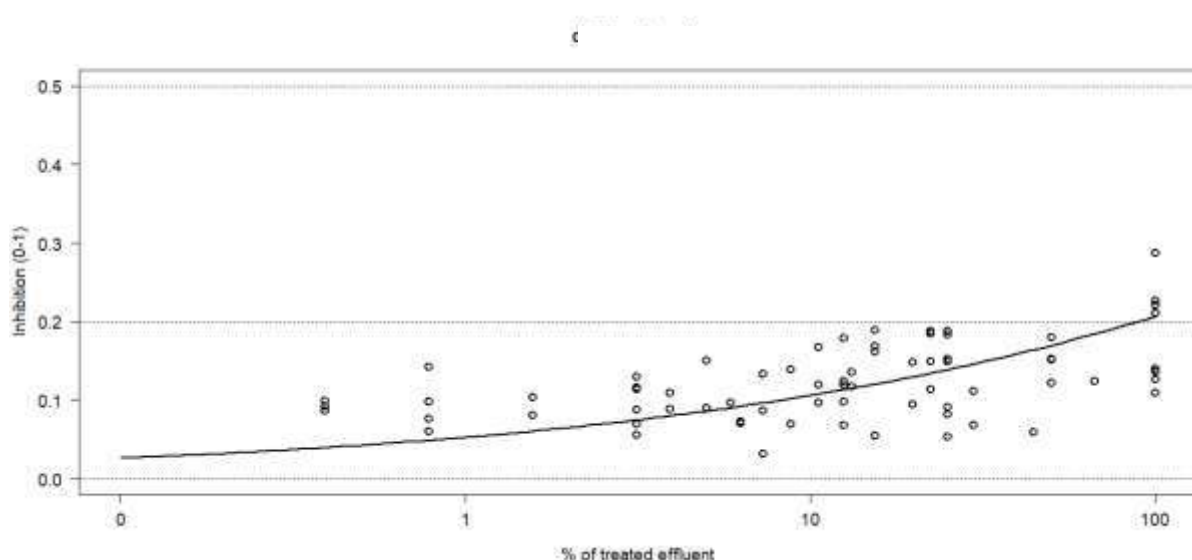


Figura 33 - Curva di concentrazione-risposta (W) per l'effluente proveniente dal depuratore di Passo del Tonale. In asse orizzontale la percentuale di effluente presente nel campione saggiato, in asse verticale il valore relativo di inibizione di bioluminescenza (0-1). In linee orizzontali sono indicati i valori di inibizione relativa rispettivamente di 0.5 (50%), 0.2 (20%) e 0.0 (0%).

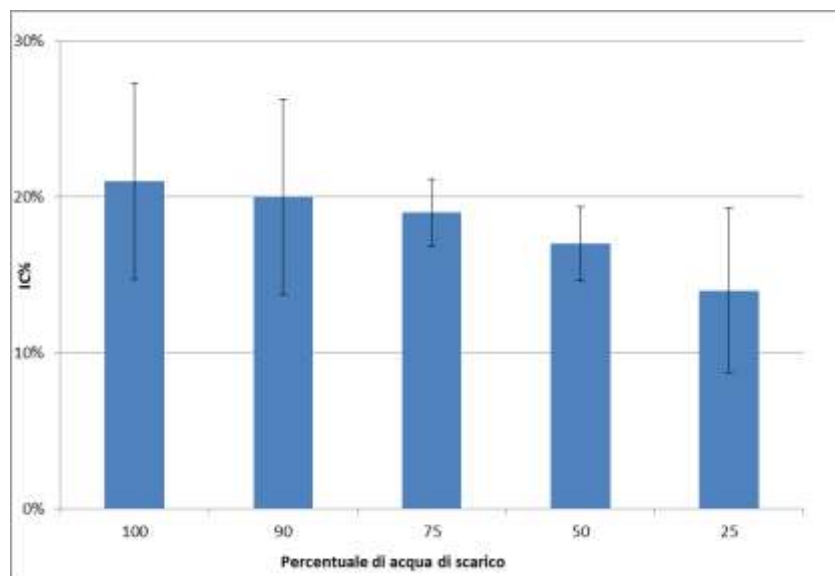


Figura 34 - Valori di inibizione media % provocata da varie aliquote di campioni di scarico del depuratore.

Con la metodologia descritta sopra è stata valutata la tossicità dello scarico del depuratore di Passo del Tonale nel periodo di massima pressione turistica. I dati di tossicità dello scarico in uscita (prima di subire diluizione nel torrente) presentano una elevata variabilità con una risposta di inibizione percentuale del campione tal quale (100% effluente) compresa tra l'11 e il 29%, e un valore medio pari al 21%. Confrontando questo risultato con la classificazione proposta dall'APAT (2002) la tossicità dell'effluente ricade nella classe compresa tra "non tossico e debolmente tossico". Pertanto l'effetto tossico dello scarico trattato in uscita al depuratore in oggetto sulla popolazione di *A. fischeri* risulta essere modesto.

Ai fini della valutazione della accettabilità degli scarichi, la salvaguardia dei corpi idrici recettori e per una corretta valutazione dello stato di salute degli ecosistemi acquatici, le indagini eco-tossicologiche che integrano le determinazioni analitiche chimiche e microbiologiche condotte di routine rappresentano un valido strumento di supporto, e consentono di avere un quadro conoscitivo completo del potenziale impatto ambientale esercitato da una specifica fonte di contaminazione. Questa integrazione di approcci risulta particolarmente utile per la messa a punto di adeguati piani di protezione e salvaguardia degli ecosistemi acquatici.

L'approccio seguito per la valutazione dello specifico effluente ambientale studiato, inteso come miscela di potenziali contaminanti, è un approccio che consente di avere informazioni sulla tossicità complessiva della miscela (whole mixture assessment) senza la necessità di utilizzo di particolari metodologie di valutazione. Tuttavia questo approccio non consente di imputare gli eventuali effetti tossici osservati alla presenza di specifici fattori chimico-fisici e/o contaminanti ambientali. Il campione ambientale viene valutato come se fosse un singolo agente chimico e i risultati sono rigorosamente applicabili alla specifica miscela studiata. In queste condizioni non possono essere effettuate delle generalizzazioni o estrapolazioni a differenti condizioni di esposizione ambientale (ad esempio i risultati non possono essere utilizzati per la definizione di standard di qualità ambientale). L'inevitabile passo successivo sarebbe quello di identificare quali contaminanti o gruppi di contaminanti nel campione ambientale sono

responsabili della eventuale tossicità osservata, con l'obiettivo di ridurre l'impatto e stabilire delle soglie di qualità ambientale (Kortenkamp et al., 2009). Quando le informazioni sui singoli componenti della miscela ambientale sono disponibili (ad esempio, quali componenti chimici sono presenti, qual è il loro modo di azione, quali effetti esercitano come singoli agenti tossici), è possibile stimarne la tossicità complessiva (component-based approach). Questo secondo approccio, collegando i risultati della intera miscela ai singoli componenti, consente di ottenere delle predizioni e di effettuare delle utili generalizzazioni (Van Gestel et al., 2011). L'applicazione di strumenti predittivi di tossicità di miscela diventa spesso necessaria in quanto la valutazione sperimentale della tossicità tutte le possibili miscele rinvenibili in una data area (ad esempio a valle del depuratore nel nostro caso) risulta praticamente non fattibile sia in termini di costo che di tempo. La predizione della tossicità di miscela viene effettuata mediante l'applicazione dei concetti di Concentration Addition (CA) and Independent Action (IA).

In questo contesto, sono state effettuate delle ulteriori indagini a partire dalle informazioni ottenute dal WP1 sulle concentrazioni misurate nel torrente Vermigliana a valle del depuratore di Passo del Tonale di una specifica categoria di contaminanti emergenti: i principi attivi (p.a.) contenuti in farmaci ad uso umano.

3.14.2 Obiettivo 2. Valutazione degli effetti di miscele di contaminanti potenzialmente scaricati con gli effluenti del depuratore di Passo del Tonale secondo l'approccio "component-based mixture" (marzo – ottobre 2017)

Selezione dei p.a. da combinare in miscela sulla base dei valori di unità di tossicità

Materiali e metodi

Il numero di sostanze chimiche che può essere scaricato nelle acque superficiali può essere estremamente alto, tuttavia ai fini della valutazione della tossicità della miscela ambientale risultante non sarebbe ragionevole considerarle tutte. È stato empiricamente osservato che nelle miscele realistiche solo un numero limitato di sostanze è responsabile di quasi tutta la tossicità dell'intera miscela (Price et al., 2012; Backhaus and Karlsson, 2014). A questo scopo, Backhaus e Karlsson (2014) hanno proposto l'analisi della distribuzione delle Unità di Tossicità (TU) dei composti in una miscela complessa come strumento per classificare le sostanze presenti in ordine di "importanza ecotossicologica".

La TU è definita come rapporto tra la concentrazione di un p.a. misurata in ambiente (es. acque superficiali) (MEC) e la tossicità (EC50) esplicita nei confronti di un definito endpoint biologico. Dallo studio effettuato dagli autori menzionati della distribuzione delle TU con riferimento alla tossicità esplicita verso le alghe in una miscela di prodotti farmaceutici ritrovati negli effluenti dell'impianto di trattamento acque reflue di Ryaverket (Gothenburg; Svezia) è stato visto che i primi 5 composti hanno espletato quasi il 90% della tossicità complessiva della miscela verso l'organismo studiato; mentre il 100% della tossicità è stata raggiunta dai primi 10 composti. Il contributo di oltre la metà delle sostanze farmaceutiche ritrovate è stato trascurabile. A questo scopo, in questo studio, sono stati confrontati i valori di MEC a valle del depuratore di passo del Tonale (dati ottenuti dal WP1) dei p.a. contenuti in prodotti farmaceutici ad uso umano nei mesi di

massima affluenza turistica (febbraio) con i valori di tossicità acuta (IC50) esercitata come singole sostanze chimiche nei confronti di *A. fischeri* (dati di bibliografia). Sono stati, quindi, selezionati i primi 7 principi attivi con i più elevati valori di unità di tossicità (TU=MEC/IC50 *A. fischeri*) come indicato in Tabella 29.

Tabella 29 – Distribuzione dei valori di unità di tossicità (TU=MEC/IC50) su *A. fischeri* dei p.a. ritrovati a valle del depuratore Tonale; indicazione dei valori di concentrazione ambientale misurata in ng/L e dei valori IC50 in mg/L sul batterio bioluminescente.

Principi attivi	MEC (ng/L)	IC50 (mg/L)	MEC/IC ₅₀
	dPT valle febbraio	<i>A. fischeri</i>	
Ibuprofen	619.0 ^a	18.3 ^b	3.38E-05
Clarithromycin	80.37 ^a	12.1 ^c	6.65E-06
Naproxen	91.25 ^a	17.9 ^c	5.09E-06
Diclofenac	41.90 ^a	15.9 ^b	2.63E-06
acetaminophen	744.00 ^a	567.5 ^d	1.31E-06
carbamazapine	5.14 ^a	94.0 ^b	5.47E-08
Amoxicillin	79.70 ^a	12.1 ^b	2.80E-08

a: Castiglioni (dati da WP1); **b:** Di Nica et al., 2017; **c:** Ortiz de Garcia et al., 2014; **d:** Kim et al. 2007.

Test di tossicità per le singole sostanze chimiche e per la miscela multicomponente

I principi attivi selezionati sono stati acquistati al più alto grado di purezza disponibile presso i laboratori di Sigma-Aldrich; in Tabella 30 ne sono riportate le principali proprietà chimico fisiche. Le soluzioni stock sono state preparate secondo il metodo riportato da Vighi et al., (2009) direttamente nelle soluzioni di acqua salina (NaCl 2%) utilizzate per il test. Per le sostanze che presentavano problemi di solubilizzazione (bassa solubilità in acqua salina) è stato utilizzato un co-solvente: dimetilsolfossido (DMSO). In accordo alle linee guida OECD (2000) sull'uso dei co-solventi, la concentrazione finale di DMSO nei campioni testati (singoli e in miscela) è risultata essere sempre inferiore all'1% (v/v). Alla concentrazione finale testata l'influenza del DMSO sulla tossicità dei composti chimici risulta essere trascurabile (Dong et al., 2013). Il pH delle soluzioni finali è stato aggiustato con l'aiuto di un pHmetro (model 250; Denver Instrument) nel range compreso tra 6 e 8.50 (DIN EN ISO 11348-3) mediante NaOH 1M. In tutti i test, sia per le sostanze singole testate che per la miscela, è stato fatto riferimento alle concentrazioni nominali (= iniziali) dei principi attivi. I test di tossicità sono stati effettuati in duplicato su un controllo e nove diverse concentrazioni di soluzioni stock effettuando delle diluizioni seriali in soluzione di NaCl al 2% (fattore di diluizione: 2 e 1.50). Ogni test è stato eseguito almeno due volte per un totale di 4 replicati. La procedura seguita per il saggio Microtox® è stata condotta secondo quanto descritto nel paragrafo 3.14.1. Il protocollo operativo scelto è il "basic test"; (Azur Environmental, 1998).

Allo scopo di ottenere le informazioni necessarie all'applicazione dei modelli predittivi di tossicità di miscela (CA e IA) è stata effettuata una valutazione degli effetti dei singoli p.a. selezionati. In particolare le informazioni su ibuprofen, diclofenac, carbamazepine e amoxicillin sono state ottenute da Di Nica et al. (2017), mentre gli effetti di clarithromycin, naproxen e acetaminophen (paracetamol) sono stati valutati in questo studio. La miscela multicomponente (mixMEC) è stata preparata combinando in soluzione NaCl 2% i sette p.a. secondo un rapporto fisso di concentrazione corrispondente alla MEC (Fixed Ratio Design). Allo scopo di descrivere l'intera curva concentrazione-risposta, le concentrazioni totali dei singoli e della miscela sono state sistematicamente variate utilizzando un adeguato fattore di diluizione e mantenendo costante per la miscela il rapporto di concentrazione tra i singoli composti componenti.

Tabella 30– Principali proprietà chimico fisiche dei composti selezionati

Gruppo farmaceutico	p.a.	n. CAS	Solubilità (mg/L)	pKa	Log Dow
Antibiotici	amoxicillin [AMX]	26787-78-0	3430	2.4, 7.4, 9.6	-1.17
	clarithromycin [CTM]	81103-11-9	0.33	8.99	3.16
	diclofenac sodium [DCF]	15-307-79-6	2425	4.15	1.3
Anti-infiammatori	ibuprofen [IBU]	15687-27-1	21	4.42	1.44
	naproxen [NPX]	22204-53-1	15.9	4.18	0.09
Analgesici	acetaminophen (paracetamol) [PAR]	103-90-2	14000	9.63	0.34
Antiepilettici	carbamazepine [CBZ]	298-46-4	112	13.9	2.45

CAS=Chemical AbstractsService; pKa=dissociation constant; D_{ow}=octanol–water distribution constant.

Modelli predittivi per la tossicità della miscela (Concentration Addition; Independent Action)

Per la stima degli effetti della miscela testata (EC_{xmix}) sono stati applicati i modelli matematici predittivi di Concentration Addition (CA) e Independent Action (IA). Questi modelli sono comunemente usati per miscele di sostanze chimiche componenti che presentano, rispettivamente, lo stesso modo di azione (MoA) o differente MoA nei confronti dell'endpoint selezionato (Loewe e Muischnek 1926; Bliss 1939). Entrambi gli approcci valutano la tossicità della miscela in modo additivo: additività delle concentrazioni (CA) e additività degli effetti (IA).

L'idea che sta alla base del modello CA è che se tutti i componenti in una miscela hanno lo stesso o simile MoA si comportano nei confronti del bersaglio biologico come se fossero la stessa sostanza chimica, così ciascuna potrebbe essere rimpiazzata da un'altra sostanza chimica ad una concentrazione equipotente. (es. all' EC50) senza modificare l'effetto tossico finale della miscela. Pertanto in una miscela così fatta le concentrazioni dei singoli componenti possono essere addizionate dopo avere

effettuato la opportuna normalizzazione delle concentrazioni in termini di unità di tossicità. Per una miscela multi-componente, il concetto matematico di CA può essere espresso come segue (Berenbaum, 1985) (equazione 3):

$$\sum_i^n \frac{C_i}{EC_{xi}} = 1 \quad \text{eq. 3}$$

dove n è il numero di composti nella miscela che provocano l' $x\%$ dell'effetto totale; C_i è la concentrazione del componente i esimo nella miscela, e EC_{xi} è la concentrazione del componente i esimo che produce lo stesso effetto quando applicato singolarmente.

La frazione C_i/EC_{xi} rappresenta l'Unità di Tossicità (TU) di ciascun componente (Sprague, 1970). La concentrazione di ciascun componente della miscela è rappresentata come una frazione equi-effettiva della concentrazione individuale, di conseguenza il comportamento della miscela è additivo se la somma delle TU è 1.

Nel caso in cui una miscela sia data dalla combinazione di sostanze con MoA differenti, le concentrazioni non sono grandezze tra loro omogenee per cui si deve ricorrere ad un diverso approccio concettuale: l'addizione delle risposte. L'effetto complessivo della miscela sarà stimato dalla somma degli effetti dei singoli componenti secondo il concetto statistico di eventi casuali indipendenti. Questo concetto matematico è espresso come segue (equazione 4):

$$E(C_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(C_i)) \quad \text{eq. 4}$$

dove $E(C_{mix})$ è l'effetto fornito dalla concentrazione totale della miscela; C_{mix} è la concentrazione totale della miscela; ed $E(C_i)$ è l'effetto che il composto i esimo avrebbe se applicato singolarmente.

Il modello IA porta ad una predizione della risposta in termini di tossicità più bassa rispetto a quella fornita dal modello CA. Quest'ultimo viene pertanto utilizzato come accettabile caso peggiore. Entrambi i modelli sono costruiti sulla base della assunzione di una assenza di interazione tra i componenti della miscela. Cioè la tossicità di ciascun componente della miscela non è influenzata dalla presenza degli altri componenti per mezzo di interazioni chimiche o biologiche che possono portare a una deviazione della tossicità osservata rispetto alle predizioni in direzione di effetti di tipo sinergico o di tipo antagonistico. Attualmente, considerata la complessità dei fenomeni di interazione che possono dar luogo ad effetti di questo tipo non è possibile prevedere un loro verificarsi mediante l'uso di modelli predittivi, ma possono essere soltanto osservati sperimentalmente e valutati caso per caso.

Applicazione del metodo Combination Index (CI)

Allo scopo di indagare e quantificare la natura delle eventuali interazioni occorrenti tra le sostanze in miscela è stato applicato il metodo della Combination Index (Chou, 1976; 2006; Chou and Talalay, 1984) storicamente applicato in farmacologia e di recente impiegato anche in campo ambientale (Rodea-Palomares et al., 2010). Per n sostanze chimiche l'equazione CI può essere espressa come segue (equazione 5):

$${}^n(CI)_x = \sum_{j=1}^n \frac{(D)_j}{(D_x)_j} = \sum_{j=1}^n \frac{(D_x)_{1-n} \left\{ \frac{[D]_j}{\sum_{i=1}^n [D]_i} \right\}}{(D_m)_j \left\{ \frac{(f_{ax})_j}{[1-(f_{ax})_j]} \right\}^{1/m_j}} \quad \text{eq. 5}$$

dove ${}^n(CI)_x$ è il risultato CI per n sostanze chimiche a $x\%$ di inibizione; $(D_x)_{1-n}$ è la somma delle concentrazioni di n sostanze chimiche che esercitano in combinazione un $x\%$ di inibizione; $\{[D]_j/\sum [D]_i\}$ è la proporzionalità della concentrazione di ciascuno degli n componenti che esercita una inibizione di $x\%$ in combinazione e $(D_m)_j \{(f_{ax})_j/[1-(f_{ax})_j]\}^{1/m_j}$ è la concentrazione di ciascun componente che da solo esercita l'inibizione $x\%$; D_m è la concentrazione dell'effetto mediano; f_{ax} è l'inibizione frazionaria a $x\%$ di inibizione; m è la pendenza della curva concentrazione-effetto mediano.

Dall'equazione 5, la presenza di effetti di tipo sinergico, additivo e antagonistico è indicata da valori di CI rispettivamente <1 , $= 1$ e > 1 .

Per calcolare i valori di CI per la miscela mixMEC a diversi intervalli di livelli di effetto è stato utilizzato il programma CompuSyn (Compusyn Inc., USA) (Chou and Martin, 2005). È stato così ottenuto il grafico di fa- CI (grafico di valori di CI della miscela mixMEC in funzione delle diverse fa).

Tutte le analisi statistiche e i valori di inibizione di bioluminescenza con gli intervalli di confidenza al 95% sono stati ottenuti utilizzando il software di statistica R[®]. L'analisi di bontà di adattamento dei modelli di regressione non lineare ai punti sperimentali ottenuti, tramite le funzioni log likelihood e AIC, ha consentito di individuare due modelli principali: il modello di Weibull (W) a due parametri descritto sopra e il modello concentrazione risposta Log Normal (LN) (equazione 6) a due parametri:

$$ICx = \varphi(\beta_2(\ln(c) - \ln(\beta_1))) \quad \text{eq. 6}$$

Dove, ICx = valore di inibizione di bioluminescenza; c = concentrazione testata; β_1 e β_2 = parametri del modello LN; φ = funzione di ripartizione della distribuzione normale.

Risultati e discussione

In Tabella 31 sono riportati i valori di concentrazione dei p.a. testati in questo studio (acetaminophen, clarithromycin, naproxen) e della miscela multicomponente (mixMEC) che hanno causato una riduzione del 10% e del 50% della bioluminescenza emessa dai batteri (IC_{10} ; IC_{50}) con l'intervallo di confidenza al 95% e i risultati dei test statistici. In Tabella 32 sono riportati anche i dati di tossicità acuta dei 4 composti presenti nella miscela multicomponente (amoxicillin, carbamazepine, diclofenac, ibuprofen) secondo dati di bibliografia (Di Nica et al., 2017). In Figura 35 sono riportate le curve concentrazione - risposta dei singoli e della miscela mixMEC fittate dai modelli di regressione selezionati (W2.2 e LN2).

Tabella 31- Dati di tossicità (IC10 e IC50) per i p.a. studiati (mg/L) con intervalli di confidenza medi al 95% tra parentesi; parametri statistici dei modelli di regressione selezionati; risultati del test di Kolmogorov-Smirnov

	Mod.	IC10	IC50	par. mod.		Std. Error	t-value	p-value	n-1	ks.test p-value
Acetaminophen	LN.2	74.13 [67.86; 80.40]	504.1 [483.6; 524.5]	β_1	504.1	974.354	51.734	< 0.001 ***	18	0.944
				β_2	0.669	0.01416	47.217	< 0.001 ***		
	Mod.	IC10	IC50	par. mod.		Std. Error	t-value	p-value	n-1	ks.test p-value
Clarithromycin	W2.2	28.65 [19.95; 37.35]	-	β_1	478.5	12.242.038	39.091	< 0.001 ***	33	0.917
				β_2	0.799	0.087028	91.842	< 0.001 ***		
Naproxen	LN.2	4.72 [3.99; 5.45]	131.06 [106.5; 155.6]	β_1	131.1	12.029.174	10.895	< 0.001 ***	31	0.993
				β_2	0.386	0.015984	24.123	< 0.001 ***		
MixMEC	W2.2	3.15 [2.10; 4.21]	66.90 [56.10; 77.70]	β_1	121.2	12.198.836	99.354	< 0.001 ***	40	0.43
				β_2	0.617	0.037089	16.629	< 0.001 ***		

Tabella 32- Dati di tossicità (IC10 e IC50) (mg/L) ricavati da Di Nica et al., (2017) per i p.a. presenti nella miscela mixMEC con intervalli di confidenza medi al 95% tra parentesi.

p.a.	Mod.	IC ₁₀	IC ₅₀
Amoxicillin	W2.2	717.6 (537.5; 897.7)	>1702
Carbamazepine	W2.2	4.2 (2.85;5.47)	94 (82.03; 105.91)
Diclofenac	W1.4	5.9 (5.03;6.74)	15.9 (14.59;17.26)
Ibuprofen	W2.2	1.4 (0.99;1.72)	18.3 (15.96; 20.58)

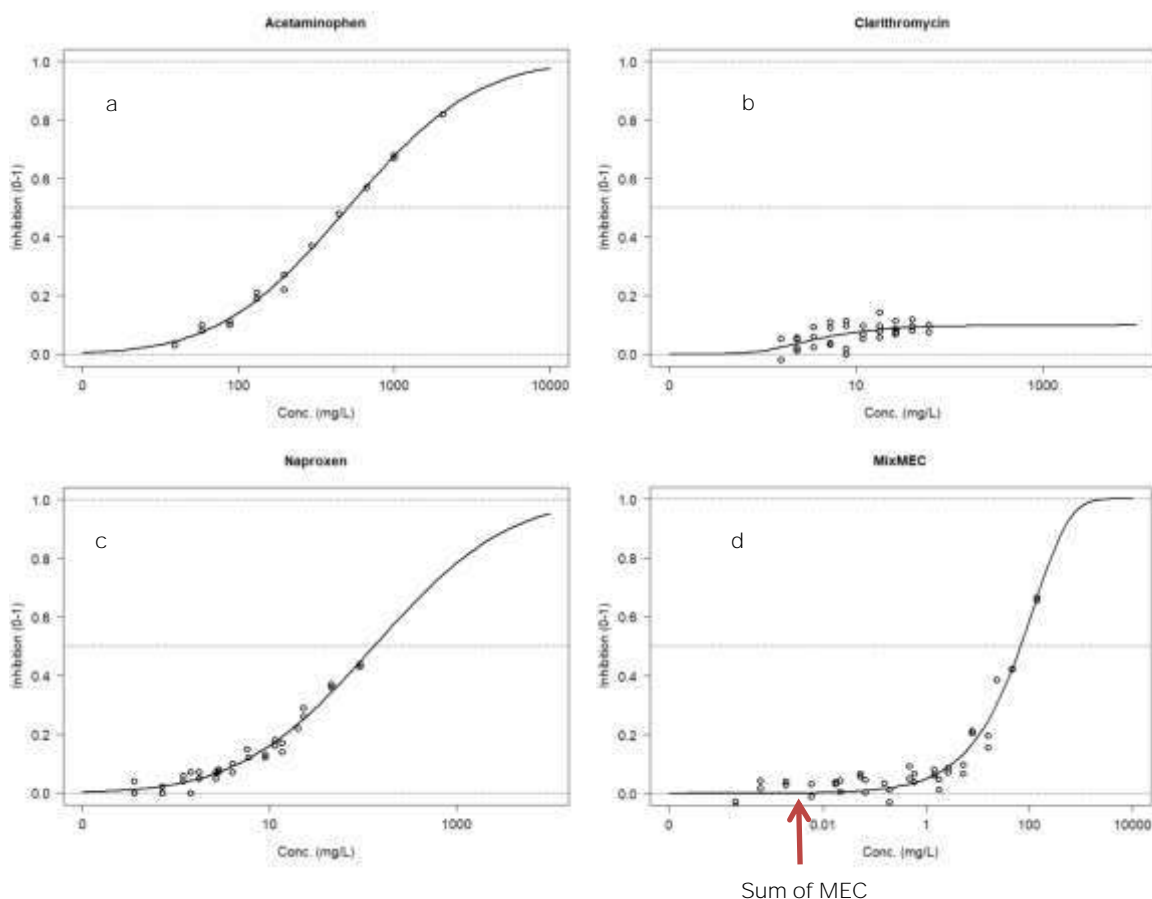


Figura 35 - Curve concentrazione-risposta sperimentali per i singoli p.a (a; b; c) e per la miscela mixMEC (d) investigati in questo studio (mixMEC=IBU+CTM+NPX+DCF+PAR+CBZ+AMX).

Tossicità dei singoli composti su *A. fischeri*

I singoli p.a. testati in questo studio hanno mostrato una moderata tossicità verso *A. fischeri* con valori di IC₅₀ superiori a 100 mg/L in tutti e tre i casi. In accordo alla classificazione dei composti sulla base dei valori di tossicità acuta proposta dalle Nazioni Unite (2013 - Sistema Internazionale di etichettatura e classificazione dei prodotti chimici) (EC₅₀ < 1mg/L= composti molto tossici per gli organismi acquatici; 1 < EC₅₀ < 10mg/L= composti tossici per gli organismi acquatici; 10mg/L < EC₅₀ < 100 mg/L= composti dannosi per gli organismi acquatici; EC₅₀ > 100 mg/L= composti non dannosi per gli organismi acquatici), clarithromycin, acetaminophen (paracetamol), e naproxen sono considerati non pericolosi per *A. fischeri*. Tuttavia, in un caso, per l'antibiotico clarithromycin, alla massima concentrazione che è stato possibile testare non è stato raggiunto il valore di IC₅₀. Da letteratura è stato visto che antibiotici aventi uno specifico meccanismo di azione verso *A. fischeri* tendono ad espletare il loro effetto tossico nel lungo termine (es. dopo 24h) piuttosto che nel breve periodo (es. 15 min); mentre l'effetto tossico nel breve e lungo termine esercitato dai composti con un meccanismo di azione non specifico (tossicità di base) è pressoché comparabile nel tempo. Le sostanze chimiche con una modalità di azione non specifica interferiscono prevalentemente con i processi associati alla membrana o con le proteine in generale. Mentre i composti antibiotici come la claritromicina che inibiscono la biosintesi delle

proteine mostrano un effetto tossico “ritardato” nel tempo. A questo scopo sarebbero necessari ulteriori saggi biologici di tossicità cronica. Gli altri composti presenti nella miscela mixMEC, a parte l’amoxicillin (non pericoloso), sono stati classificati come pericolosi per l’organismo testato ($10 \text{ mg/L} < \text{EC}_{50} < 100 \text{ mg/L}$).

Tossicità della miscela multicomponente su *A. fischeri*

I valori sperimentali di IC₁₀ (3.15 mg/L) e di IC₅₀ (66.9 mg/L) della miscela mix MEC sono risultati essere compresi tra la più alta e la più bassa tossicità di ciascuno dei componenti della miscela (Tabella 31). La concentrazione dei singoli p.a. nella mixMEC che in combinazione hanno provocato rispettivamente il 50% (24.8 mg/L IBU; 3.22 mg/L CTM; 3.66 mg/L NPX; 1.68 mg/L DCF; 29.85 mg/L PAR; 0.21 mg/L CBZ; 3.20 mg/L AMX) e il 10% (1.20 mg/L IBU; 0.16 mg/L CTM; 0.18 mg/L NPX; 0.08 mg/L DCF; 1.45 mg/L PAR; 0.010 mg/L CBZ; 0.15 mg/L AMX) di inibizione di bioluminescenza è stata inferiore rispetto a quella che singolarmente ha prodotto lo stesso effetto per quasi tutti i p.a. (Tabella 31). Tuttavia alla concentrazione corrispondente alla somma dei singoli valori di MEC misurati nel Torrente Vermigliana a valle del depuratore Tonale per i 7 p.a. ($\Sigma \text{MEC} = 1.66 \text{ } \mu\text{g/L}$) non è stato registrato alcun effetto di inibizione di bioluminescenza in *A. fischeri* (Figura 35d). Le concentrazioni che hanno dato luogo al 10% e al 50% di inibizione sono state rispettivamente di 3 e 4 ordini di grandezza superiori rispetto alle concentrazioni misurate in ambiente. Pertanto è possibile concludere che anche in miscela multicomponente la concentrazione a cui sono stati ritrovati i farmaci nel Torrente Vermigliana a valle del depuratore non risulta pericolosa per la popolazione di *A. fischeri* esposta.

Modo di azione (MoA) dei composti su *A. fischeri*

Allo scopo di indagare il MoA dei composti testati sono state applicate le equazioni QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) specificatamente sviluppate da Vighi et al. (2009) per la predizione dell’effetto su *A. fischeri* di composti narcotici non polari (equazione 7) e narcotici polari (equazione 8):

$$\text{Log}1/C_{\text{narcotic (mmol/L)}} = 0.94 \log K_{ow} - 2.61 (n = 23; R^2 = 0.92) \quad (7)$$

$$\text{Log}1/C_{\text{polarnarcotic (mmol/L)}} = 0.502 \log K_{ow} + 0.294 (n = 23; R^2 = 0.81) \quad (8)$$

La narcosi (detta anche tossicità di base) (eq. 7) è l’effetto tossico esercitato da una sostanza chimica inerte che non possiede uno specifico MoA verso un organismo ed è legato all'idrofobicità della sostanza definita sulla base del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua (K_{ow}). L’effetto tossico dei composti narcotici polari (eq. 8) è generalmente leggermente più forte di quello esercitato dai composti narcotici non polari, anche se non è correlato a uno specifico meccanismo di azione. I composti possono, inoltre, essere classificati come reattivi o come composti chimici ad azione specifica (Verhaar et al., 1992; Tremolada et al., 2004; Enoch et al., 2008). Le sostanze chimiche reattive mostrano un effetto tossico maggiore rispetto alla tossicità di base, ma reagiscono in modo non selettivo con le strutture chimiche comunemente presenti nelle biomolecole. Al contrario, la tossicità di sostanze chimiche ad azione specifica è dovuta all'interazione con uno specifico recettore molecolare.

Molti dei p.a. selezionati in questo studio sono ionizzabili e possono dissociarsi in funzione del pH e del loro valore di pKa (vedi Tabella 30). L'idrofobicità di composti non ionizzabili è generalmente espressa in termini di log K_{OW} (coefficiente di ripartizione n-ottanolo-acqua) definito come rapporto all'equilibrio della concentrazione dei composti non ionizzabili tra le due differenti fasi; mentre per i composti ionizzabili è preferibile il termine D_{OW} (distribuzione n-ottanolo-acqua). Il log D_{OW} è definito come il rapporto della somma delle concentrazioni di entrambe le forme (ionizzate e non ionizzate). Per un composto non ionizzabile log K_{OW} è uguale al log D_{OW}. Il valore di log D_{OW} è fortemente dipendente dalle condizioni di pH utilizzate in fase di determinazione del coefficiente di ripartizione. Pertanto in questo studio nella applicazione dei modelli QSAR sono stati applicati i valori di log D_{OW} determinati a valori di pH vicini a quello delle soluzioni test usate per i saggi Microtox.

Mettendo in relazione i dati sperimentali di tossicità (IC₅₀ in Tabella 31) con i risultati delle equazioni QSAR sono stati calcolati i rapporti di tossicità (TR₁= IC_{50narcotic}/IC_{50experimental} e TR₂=IC_{50polarnarcotic}/IC_{50experimental}) (Tabella 33). I risultati ottenuti per i p.a. testati in questo studio sono stati aggiunti ai risultati ottenuti in Di Nica et al., (2017) per amoxicillin, carbamazepine, diclofenac e ibuprofen. Dal valore di TR₂ ottenuto, vicino all'unità per tutti i composti studiati, si può concludere che i p.a. selezionati non hanno avuto uno specifico MoA verso *A. fischeri*, ma questi sembrano agire come composti narcotici polari. Il risultato ottenuto è visualizzabile anche in Figura 36, in cui si osserva che la tossicità sperimentale ricade nel range di tossicità dei composti a comportamento narcotico polare. Non è stato possibile effettuare lo studio del MoA dell'antibiotico clarithromycin a causa del mancato ottenimento del valore sperimentale di IC₅₀.

Tabella 33 – Valori di IC₅₀ (mg/L) su *A. fischeri* predetti mediante i modelli QSAR applicati (eq. 7 e 8) e valori dei rapporti di tossicità calcolati (TR₁ e TR₂; TR₁=IC_{50narcotic}/IC_{50experimental}; TR₂=IC_{50polarnarcotic}/IC_{50experimental}).

p.a.	IC _{50narc.} (mg/L)	TR ₁	IC _{50polar narc.} (mg/L)	TR ₂
Acetaminophen	29502	58.52	51.85	0.10
Amoxicillin	3995585	1404.41	1076	0.38
Carbamazepine	3664	39.00	20.96	0.22
Diclofenac	2121	133.25	17.98	1.13
Ibuprofen	392	21.42	5.96	0.33
Naproxen	77200	589.04	105.4	0.80

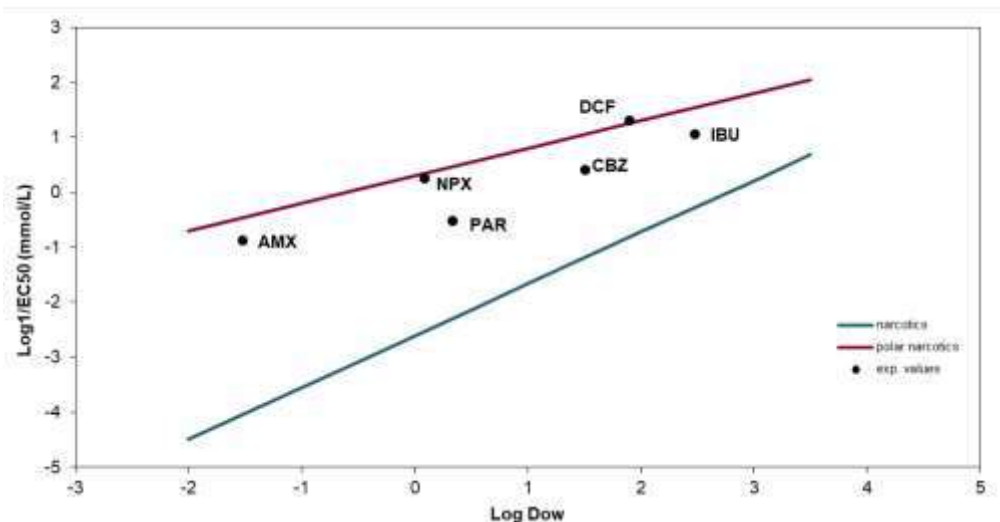


Figura 36 - Log (1/EC50) (in mmol/L) in funzione di Log DOW per i p.a. selezionati (punti neri). In rosso e in blu sono rappresentate le curve di risposta di *A. fischeri* a composti narcotici polari e non polari secondo le equazioni QSAR riportate (Vighi et al., 2009).

Predizione della curva di tossicità di miscela mediante i modelli CA e IA e confronto con i risultati sperimentali

La conoscenza del MoA delle sostanze è una delle informazioni necessarie per la predizione della tossicità delle miscele. Una miscela ambientale può essere composta da sostanze che agiscono secondo un MoA simile o secondo un MoA differente o più probabilmente da una combinazione di entrambe. Nel nostro studio tutti i composti selezionati, a parte l'antibiotico clarithromycin per il quale non è stato possibile applicare il modello QSAR, hanno avuto un comportamento di tipo narcotico polare verso l'organismo test e questo può essere assimilato a un comune MoA verso *A. fischeri*. Pertanto, la tossicità in miscela mixMEC verso l'organismo test dovrebbe essere ben predetta mediante l'applicazione del concetto di additività di concentrazione (CA). È stato effettuato un confronto tra la curva sperimentale di tossicità di miscela e le curve di tossicità predette dai modelli applicati (CA e IA) (Figura 37).

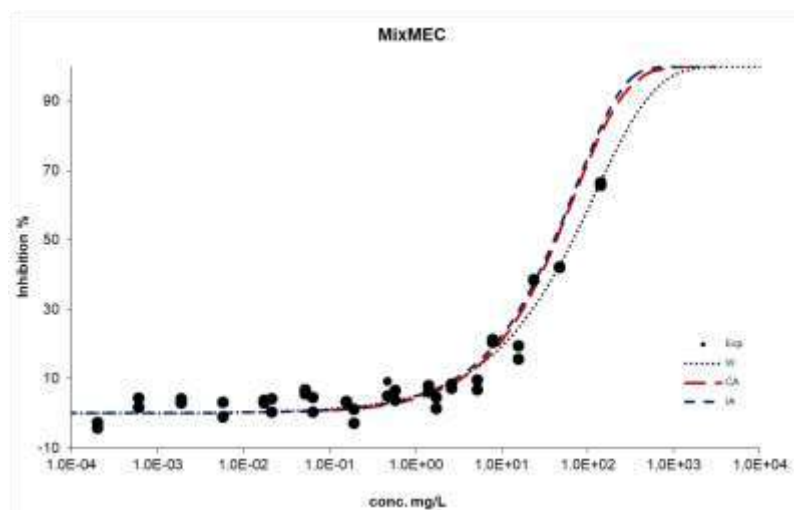


Figura 37 - Curve di concentrazione-risposta sperimentale (W2.2) e predette (CA in rosso e IA in blu) per la miscela mixMEC (mixMEC=IBU+CTM+NPX+DCF+PAR+CBZ+AMX).

Dal confronto effettuato si è visto che entrambi i modelli teorici applicati hanno restituito una buona stima della tossicità sperimentale della miscela testata. Non sembra, quindi, esserci stata interazione tra le sostanze. Pertanto, l'effetto tossico complessivo dei 7 p.a. in combinazione multicomponente può essere valutato in termini additivi (sia di concentrazione che di risposta). Si è visto che l'ampiezza dello spazio compreso tra le due curve predittive (prediction window) è pressoché inesistente; questo si verifica particolarmente quando il numero dei componenti della miscela è piccolo come nel caso in esame. Da letteratura si è visto che risposte di tipo sinergico o antagonistico sembrano essere confinate a miscele di pochi composti (2 o al massimo 3 componenti); al contrario sono raramente osservati in miscele multicomponenti. Warne e Hawker nel loro lavoro "The funnel hypothesis" (Warne and Hawker, 1995) hanno studiato la tossicità di miscele di composti privi di uno specifico MoA (composti narcotici) e hanno concluso che la risposta di miscele di composti a comportamento narcotico tende all'addittività all'aumentare del numero di componenti. Sembra che venga a crearsi una sorta di effetto buffer tra i componenti della miscela contro le interazioni sinergiche o antagonistiche quando il contributo di queste ultime non è predominante (Backhaus, 2014).

Applicazione del metodo Combination Index

Infine è stato applicato il metodo della Combination Index. Attraverso il sistema computerizzato Compusyn sono stati ottenuti i valori di CI a vari livelli di effetto fino alla massima concentrazione che è stato possibile testare (corrispondente al 65% del livello di effetto). In campo ambientale viene generalmente applicata una soglia di due volte la deviazione dall'unità per indicare la conformità tra la tossicità sperimentale della miscela e quella ottenuta mediante il principio di addittività di concentrazione (cioè valori di CI compresi tra 0.5 e 2) a indicare assenza di interazioni di tipo sinergico o di tipo antagonistico. In Figura 38 viene mostrato il grafico ottenuto per la miscela mixMEC.

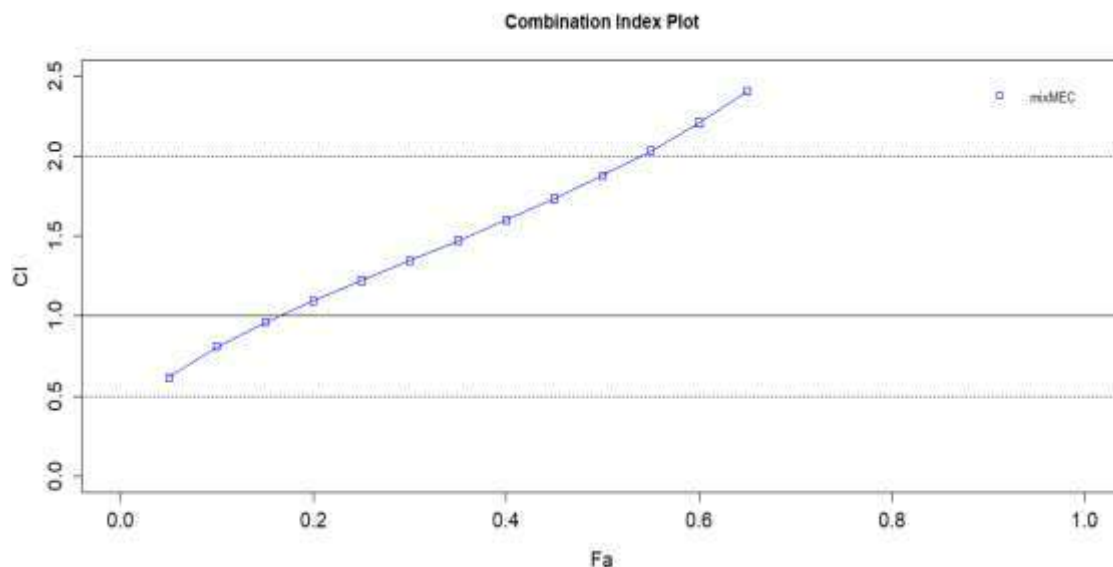


Figura 38 - Grafico Combination Index per la risposta della miscela multicomponente mixMEC su *A. fischeri*. I valori di CI sono rappresentati in funzione della inibizione di bioluminescenza frazionaria (fa) usando il programma CompuSyn (Chou and Martin, 2005). Valori di $0.5 < CI < 2$ indicano comportamento di tipo additivo delle sostanze in miscela; valori di $CI < 0.5$ e di $CI > 2$ indicano, rispettivamente, presenza di effetti di tipo sinergico e di tipo antagonistico.

Dal grafico ottenuto si è visto che i valori di CI sono risultati compresi tra 0.5 e 2 per quasi tutti i livelli di effetto indagati a conferma dell'assenza di interazione tra i farmaci testati in combinazione multicomponente. Tuttavia per livelli di effetto superiori al 55% ($fa > 0.55$) i valori di CI sono risultati essere superiori alla soglia di 2 fissata per individuare l'esistenza nelle miscele ambientali di effetti di tipo antagonistico. All'aumentare della concentrazione testata, i p.a. presenti cominciano ad interagire dando luogo ad una tossicità inferiore rispetto alle predizioni fornite dai modelli additivi. Questa tendenza è visualizzabile anche in Figura 35. Tuttavia, la sovrastima ottenuta della tossicità della miscela mixMEC non pone particolari problemi dal punto di vista di gestione del rischio ambientale, in quanto la predizione fornita dai concetti di additività si rivela essere sufficientemente protettiva.

3.15 WP3 - Effetti eco-genotossici sulla comunità dei macroinvertebrati (MUSE; Valeria Lencioni)

Il WP3 ha come obiettivo generale la valutazione degli effetti dei CE selezionati nell'ambito del WP1 sugli animali invertebrati, sia a livello di comunità che di specie target, nei 4 siti di indagine. Sono stati identificati 5 obiettivi principali, per ciascuno dei quali vengono presentati metodi e risultati conseguiti.

Personale coinvolto: Coordinatore di WP3, dott.ssa Lencioni, MUSE (I anno: 7 mesi/uomo; II anno: 5 mesi/uomo); giovane ricercatrice, dott.ssa Ciccazzo (I anno: 2 mesi/uomo), MUSE; personale MUSE, dott.ssa Alessandra Franceschini (I anno: 10 mesi/uomo; II anno: 4 mesi/uomo); personale collaboratore MUSE: Francesco Bellamoli (I anno: 12 mesi/uomo; II anno: 6 mesi/uomo); dott.ssa Francesca Rossi (I anno: 1 mese/uomo), Francesca Paoli (I anno: 8 mesi/uomo; II anno: 4 mesi/uomo); dott.ssa Paola Bernabò (II anno: 5 mesi/uomo); dott.ssa Sonia Carminati (II anno: 6 mesi/uomo); Sara Villa (II anno: 3 mesi/uomo); Valeria Di Nica (II anno: 3 mesi/uomo); Tanita Pescatore (II anno: 3 mesi/uomo); Sara Castiglioni (1 mese/uomo).

3.15.1 Obiettivo 3.1: Allestimento degli acquari e messa a punto di un protocollo di allevamento (ottobre 2015-gennaio 2016)

Tra ottobre 2015 e gennaio 2016 sono stati allestiti acquari per l'allevamento di insetti acquatici di cui due da 95 L, dotati di pompa e refrigeratore per allevamento a lungo termine, e 5 da 2,5 L per allevamenti a breve termine ossigenati mediante ossigenatore esterno. L'aerazione è stata garantita da un sistema di tubi collegati a più areatori, per garantire una percentuale di saturazione di ossigeno superiore all'80% (Figura 39).

Gli acquari per l'allevamento a breve termine sono stati mantenuti all'interno di una camera termostata a celle di Peltier (Memmert IPP110 plus) impostata alla stessa temperatura del torrente (tra 2 e 10°C). Qui sono state stabulate le larve di insetti prima di essere esposte a test di tossicità acuta e genotossicità.



Figura 39 - Acquari utilizzati per l'allevamento degli insetti.

3.15.2 Obiettivo 3.2: Struttura e caratteristiche funzionali della comunità di macroinvertebrati (dicembre 2015-marzo 2017; ottobre-novembre 2017)

Materiali e Metodi

La struttura e le caratteristiche funzionali della comunità di macroinvertebrati è stata studiata in due stagioni (inverno e inizio estate) in PTm, PTv e ML, solo in estate in PRO (in quanto non

accessibile

nel periodo invernale. I periodi di campionamento scelti (inverno, quando si ha la massima affluenza turistica al Tonale) e a inizio estate (in fase di disgelo e massima diluizione da precipitazioni) sono strategici per mettere in evidenza l'impatto da turismo invernale in una valle alpina.

Le raccolte sono iniziate nel mese di dicembre 2015. Alla raccolta di campioni qualitativi è seguito lo smistamento e la determinazione a livello di specie per i taxon risultati più abbondanti e interessanti dal punto di vista trofico, in modo da poter coprire più livelli trofici (dai raccoglitori-detritivori ai predatori).

I criteri utilizzati per la selezione delle specie sono:

- abbondanza relativa nella comunità di macroinvertebrati
- ruolo trofico
- facilità di determinazione ad occhio nudo (sul campo) o allo stereomicroscopio.

Queste analisi preliminari ci hanno consentito di selezionare le specie target su cui poi effettuare i test di tossicità acuta e di genotossicità, che richiedono, per poter essere effettuati su animali così piccoli (le larve sono dell'ordine di circa 1-2 cm di lunghezza), di un elevato numero di esemplari. A febbraio 2016 abbiamo potuto quindi iniziare i test ecotossicologici e di genotossicità, senza dover attendere la conta e la determinazione alla specie dei campioni quantitativi la cui raccolta è stata effettuata a febbraio stesso e si è completata nel corso della primavera.

Il 22 e 23 febbraio 2016 si è quindi effettuato il campionamento quantitativo dei macroinvertebrati nei tre siti PTm, PTv e ML (ripetuto il 28-29 giugno 2016), corredato dalla raccolta di dati ambientali. Con il medesimo protocollo è stata campionata a luglio (13/7/2016) e a settembre (17/9/2016) anche la stazione PRO (periodo in cui il torrente è colonizzato da larve numerose e mature di Ditteri Chironomidi – dato disponibile da un precedente studio condotto dal MUSE sul Rio Presena nel 2015). I test di tossicità acuta e genotossicità sono iniziati il giorno del campionamento quantitativo dei macroinvertebrati e sono proseguiti per diverse settimane fino al termine dei test stessi. Ad ogni uscita venivano raccolte le larve necessarie per effettuare i test per un totale di 35 uscite in inverno e 12 uscite in estate nel triennio 2016-2018, incluse quelle per la raccolta di larve per i test comportamentali, il bioaccumulo e la valutazione del danno ossidativo.

Materiali

- Retino manuale immanicato 0.32m x 0.32 m con area coperta di 0.1 m² e dimensione delle maglie di 250 µm;
- Retino da drift con maglie da 250 µm;

- Sonda multiparametrica da campo (HI 9829, Hanna Instruments);
- Filtri in cellulosa (0.45 µm, Ø 47 mm, Membranfilter Porafil®);
- Essiccatore con indicatore colorato che segnala il grado di esaurimento dell'agente essiccante;
- Borsa termica refrigerante;
- Bilancia analitica di 200 g di capacità e con risoluzione di 0.1 mg;
- Filtri in fibra di vetro (4.7 cm Whatman GF/C or Gelman A/E);
- Alcol etilico al 75%;
- Acetone 90%;
- Pompa a vuoto manuale ed elettrica (N86 KN.18 6L/min, Laboport);
- Abbassalingua standard (*betulla* 15 cm x 1.8 cm x 0.2 cm);
- Sale (NaCl);
- Pinzette da entomologo;
- Barattoli da 100, 250, 500 e 1000 mL;
- Data Logger digitali Gemini Tiny-Talk II parte 196-7386, Gemini Tiny-Talk II TK-0040 Gemini Tiny-Tag TK-4014,; Gemini Data Loggers UK Ltd, Chichester, England);
- Correntometro (OTT Hydrometrie Z30);
- Microscopio ottico Nikon Eclipse E600; Nikon Instruments Nikon Instruments Europe BV Amsterdam, Netherlands
- Microscopio stereoscopico (MZ 7.5; Leica Microsystems, Germany);
- Ricevitore GPS (Garmin eTrex 30);
- Stufa (UML400 Memmert);
- Muffola (A024, Matest);
- Spettrofotometro

Campionamento quantitativo della comunità dei macroinvertebrati

In ogni stazione (PR0, PTm, PTv, ML) sono state raccolte cinque repliche di zoobenthos utilizzando un retino tipo Surber (Figura 40) (Scubla SNC, Italy) avente dimensioni dell'intelaiatura pari a 32x32 cm per un'area di 0.1 m² per 2 minuti. L'area complessiva campionata è stata quindi di circa 0.5 m². In Presena è stato utilizzato un retino immanicato tipo Surber (22x23 cm, area di 0.05 m²) sempre per 2 minuti/replica.

I replicati sono stati raccolti secondo il protocollo STAR-ICMi (Buffagni and Erba 2007) in microhabitat rappresentativi del tratto di torrente investigato in accordo con il manuale ISPRA (2013). Per ogni microhabitat (raschio, pozza ecc.) sono state raccolte una serie di informazioni quali il tipo di flusso (in base in base al grado di turbolenza superficiale dell'acqua; ISPRA, 2013), la composizione granulometrica del substrato come percentuale di massi (>20 cm), ciottoli (5-20 cm), ghiaia (0.2-5 cm), sabbia (0.01-0.2 cm) e limo (<0.01 cm), la presenza di coperture algali macroscopiche (es. muschio e *Hydrurus foetidus* (Villars)) e infine, con un correntometro (OTT Hydrometrie Z30) sono state misurate profondità dell'acqua e velocità di corrente massima (a 2/3 della colonna d'acqua) in accordo con Maiolini & Lencioni (2001) e Lencioni & Rossaro (2005). In ogni sito e data è stato raccolto anche un campione qualitativo di drift con un retino (con maglie da 250 µm), per un'ora, posizionato a monte del tratto investigato con il kick sampling. I campioni di drift verranno analizzati nel corso del secondo anno di progetto (in particolare verranno considerate le esuvie pupali di Chironomidae per la loro determinazione a livello di specie). I campioni sono stati filtrati sul campo con rete da

250 micron e trasferiti in alcol etilico al 75%. Campioni aggiuntivi di drift (1 per un tempo di raccolta di 1h per ogni data e stazione) sono stati raccolti come campioni integrativi. Questo retino termina con un contenitore per la raccolta di animali e presenta una rete dotata di maglie di 250 μm (ISPRA, 2013).



Figura 40 - Retini immanicati per il campionamento dei macroinvertebrati bentonici

Misurazione dei parametri ambientali

La posizione del punto di prelievo è stata registrata mediante strumenti di posizionamento satellitare (Global Position System, GPS) ed espressa con il sistema di coordinate utilizzato è quello WGS84 gps.

Con una sonda multiparametrica da campo (HI 9829, Hanna Instruments(<http://www.hanna.it/multiparametro/portatile/hi-9829-multiparametro-portatile-17-parametri/#.WI9kkvnhDIU>)) è stata registrata ad ogni campionamento la temperatura dell'acqua ($^{\circ}\text{C}$), concentrazione di ossigeno disciolto (mg L^{-1}), la percentuale di ossigeno disciolto (%), la conducibilità ($\mu\text{S cm}^{-1}$), il pH e della torbidità (NTU).

La temperatura è stata registrata anche in continuo (ogni ora) con datalogger digitali: Tinytalk mod TK-4014 in dPT-v, Tinytag TGP-4017 in dPT-m. Per Presena PR0 i dati ci sono stati forniti dall'Area Stazioni Meteorologiche Meteotrentino (Dipartimento Protezione Civile, Servizio Prevenzione Rischi, Ufficio Previsione e Pianificazione della Provincia Autonoma di Trento) che ha posizionato un datalogger per la registrazione in continuo (oraria) della temperatura e del livello dell'acqua a valle del piccolo bacino proglaciale) mod. SEBA MDS Dipper PT.

La portata (L s^{-1}) è stata calcolata utilizzando il metodo della diluizione relativa del sale (Hongve, 1987). Questa metodologia prevede lo sversamento di una quantità di soluzione salina definita in un tratto del corso d'acqua e, a valle, la registrazione della variazione nel tempo della conducibilità (Hongve, 1987) con la sonda multiparametrica da campo (HI 9829, Hanna Instruments). Per il calcolo della portata è necessario conoscere, oltre alla conducibilità al tempo "zero", anche la temperatura al momento dello sversamento della soluzione salina.

La stabilità dell'alveo è stata valutata con l'Indice di Pfankuch (Pfankuch, 1975): è un indice soggettivo e visuale, utilizzato per valutare la stabilità dell'alveo. La sua misura è la somma dei punteggi di 6 variabili che tengono conto dei diversi aspetti del fondo del corso d'acqua. Ogni variabile ha un valore che aumenta con il diminuire della stabilità

per cui le 4 categorie di substrato che vengono identificate dalla somma finale presentano punteggi crescenti al decrescere della stabilità. Stabilità scarsa: 45-60; Stabilità discreta: 30-45; stabilità buona: 15-30; Stabilità eccellente: <15.

La torbidità è stata misurata come solidi sospesi (mg L^{-1}), in campo sono state prelevate aliquote d'acqua (da 250 mL a 1L per stazione e data, in funzione del valore di NTU registrato sul campo) per la successiva filtrazione in laboratorio.

In ogni sito e data è stato raccolto 1 L di acque per l'analisi dei nutrienti e sali minerali: alcalinità totale (mg L^{-1}), la durezza ($^{\circ}\text{F}$), il sodio (mg L^{-1}), il potassio (mg L^{-1}), il cloro (mg L^{-1}), il fluoruro (mg L^{-1}), il magnesio (mg L^{-1}), il calcio (mg L^{-1}), l'azoto ammoniacale (mg L^{-1}), l'azoto nitrico (mg L^{-1}), l'azoto totale (mg L^{-1}), l'ortofosfato (mg L^{-1}), il fosforo totale (mg L^{-1}), i solfati (mg L^{-1}) e la silice (mg L^{-1}). In inverno le analisi sono state effettuate dal Laboratorio di Chimica delle acque della Fondazione Edmund Mach, in accordo con i Metodi Standard (ISO 1974), in estate dal laboratorio accreditato dell'Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente (APPA-TN).

La produttività primaria è stata misurata come concentrazione di clorofilla *a* (IRSA-CNR, A. P. A. T., 2003). Ad ogni campionamento, in ciascun sito, dal torrente sono stati raccolti tre sassi *random* da cui sono stati raschiati 9 cm^2 di superficie colonizzata da alghe con un comune spazzolino da denti utilizzando un *frame*. Dallo spazzolino le alghe sono state trasferite in acqua distillata e poi filtrate su filtro in fibra di vetro (4.7 cm Whatman GF/C) e con pompa a vuoto. I filtri vengono tenuti al freddo e al buio fino al laboratorio dove sono stati tenuti al buio, a -20°C , per evitare la degradazione dei pigmenti fino alla data dell'estrazione della clorofilla (IRSA-CNR, A. P. A. T., 2003).

Tasso di decomposizione della sostanza organica

Il tasso di decomposizione della sostanza organica fornisce informazioni sulla capacità dell'ecosistema di degradare la sostanza organica, un processo complesso che coinvolge tutti gli organismi decompositori (dai batteri agli invertebrati) presenti oltre che da fattori ambientali tra cui la temperatura dell'acqua (Arroit et al., 2012).

Il tasso è stato misurato mediante l'uso di 5 stecchette abbassalingua in betulla ($15 \times 1.8 \times 0.2 \text{ cm}$) per sito. Le stecchette sono state numerate ed etichettate con nome della stazione (inciso) seccate in stufa (70°C , 72h) e pesate. Sul campo sono state ancorate mediante picchetto alla riva e adagiate sul letto del torrente, sommerse, in una zona sotto corrente. Un primo gruppo di 5 stecchette è stato posizionato il 18/24 agosto 2015 e ritirato il 17 novembre 2015 (solo in PR0 le stecchette sono state ritirate prima delle prime nevicate autunnali, il 17 settembre 2015). Queste sono state sostituite e recuperate l'anno dopo, l'1 settembre 2016 in PR0 e il 26/29 giugno in PT (quelle in PTv non sono state più ritrovate)

Smistamento e identificazione dei macroinvertebrati

I campioni sono stati smistati allo stereomicroscopio (MZ 7.5; Leica Microsystems, Germany) (50X) e determinati al livello tassonomico richiesto per l'applicazione degli indici di qualità ambientale (I.B.E. e STAR-ICMi, descritti oltre) in accordo a Sansoni (1988), Campaioli et al. (1994, 1999), Tachet et al. (2010) e Waringer and Graf (2011). Le specie target sono state identificate tra le famiglie di insetti: Baetidae, Rhyacophilidae, Chironomidae Diamesinae e Perlodidae. Per la determinazione a livello

di specie di Baetidae e Chironomidae sono stati allestiti preparati microscopici osservati al microscopio ottico (1000 X) in accordo a Lencioni et al. (2007). Oltre al gruppo di appartenenza è stato riportato lo stadio vitale, con juv. per le forme giovanili, L per gli stadi larvali, Le per esuvia larvale, P per le pupe, Pe per le exuvie pupali, A per gli adulti. Tutti gli animali raccolti sono conservati nella Collezione Entomologica del Muse (cINV017) in alcool etilico al 75% o su vetrino (oltre 100 vetrini preparati). La sostanza organica presente nei campioni di macroinvertebrati BPOM (Benthic Particulate Organic Matter) è stata separata dagli organismi e dal substrato inorganico allo stereoscopico e riposta in un contenitore di carta stagnola con peso noto (tara). Dopo un primo passaggio di asciugatura in stufa (UML400 Memmert) a 60°C, da cui è ottenuto il peso secco, si è proceduto con l'incenerimento in muffola (A024, Matest) a 500°C per un'ora. Con il passaggio in muffola si ottiene il peso delle ceneri. Il BPOM ovvero il peso della sostanza organica si ottiene per differenza tra il peso secco e il peso delle ceneri (Lencioni & Rossaro, 2005).

Quantificazione dei solidi sospesi

L'acqua raccolta per la determinazione dei solidi sospesi è stata filtrata su filtri in cellulosa (0,45 µm, Ø 47 mm, Membranfilter Porafil®) con pompa a vuoto elettrica (N86 KN.18 6L/min, Laboport). (IRSA-CNR, A. P. A. T., 2003). Per acque a bassa torbidità il volume filtrato è stato di almeno 1 L ((IRSA-CNR, A. P. A. T., 2003). Dopo la filtrazione, i filtri sono stati posti in stufa (UML400 Memmert) a 105°C per un'ora. Dopo averli lasciati raffreddare per 30 minuti in essiccatore, i filtri sono stati pesati al decimo di milligrammo su una bilancia analitica (IRSA-CNR, A. P. A. T., 2003) ed è stato calcolato poi il contenuto in solidi sospesi, espresso in mg/L.

Calcolo della portata

Nella formula che viene utilizzata per il calcolo della portata (L/sec) si tiene conto della quantità di sale gettata, della solubilità del sale alla temperatura dell'acqua del torrente, dell'ampiezza della variazione di conducibilità dovuta allo scioglimento del sale e del tempo necessario affinché la conducibilità torni ad assumere il valore iniziale:

$$Portata \left(\frac{L}{s} \right) = \frac{m \times 106 \times [0.214 - (0.0003 \times cond_{t0})] \times (0.50 + 0.02T^{\circ}C)}{ts \times SUM \text{ diff. cond}}$$

m = peso sale (kg)

cond_{t0} = conducibilità iniziale (mS/m)

T°C = temperatura acqua (°C)

ts = intervallo di tempo tra le misure di conducibilità (s)

SUM diff.cond = somma delle differenze di conducibilità tra un intervallo e quello successivo

Misura della concentrazione di clorofilla a

La clorofilla a viene estratta immergendolo ciascun filtro in 17 ml di acetone al 95% per almeno 12 ore in frigorifero. Si procede poi con la centrifugazione dell'estratto per eliminare particelle solide ed eventuali altre impurità. La clorofilla a risulta facilmente

distinguibile da altri pigmenti attraverso il confronto di due letture spettrofotometriche, prima e dopo la degradazione del pigmento, ottenuta mediante l'aggiunta di acido cloridrico (con 30 μ L di soluzione di HCl 0.1 M per ogni ml di estratto) che comporta la degradazione della clorofilla *a* a feofitina *a*. La prima lettura di assorbanza viene eseguita a 750 e 664 nm, la seconda lettura sull'estratto acidificato a 750 e 665 nm. Il processo di acidificazione serve ad avere una stima più corretta delle concentrazioni della clorofilla *a*, poiché la presenza di prodotti di degradazione della clorofilla *a*, i "feopigmenti", interferisce spettralmente con la lettura della clorofilla *a*. Il calcolo della concentrazione del pigmento si realizza attraverso un'equazione che tiene conto di tutte le variabili del procedimento e della differenza dei picchi di assorbimento fra prima e seconda lettura:

$$\text{Clorofilla } a \left(\frac{\text{mg}}{\text{m}^3} \right) = \frac{\{26,7 [(664 - 750) - (665a - 750a)]v\}}{V \times L}$$

$$\text{Feofitina } a \left(\frac{\text{mg}}{\text{m}^3} \right) = \frac{\{26,7 [1.7(665a - 750a) - (664 - 750)]v\}}{V \times L}$$

664 e 750 = assorbanze del campione rispettivamente a 664,665 e 750 nm

665a e 750a = assorbanze del campione dopo acidificazione a 665 e 750 nm

v = volume di acetone usato per l'estrazione (ml)

V = superficie spazzolata (cm^2)

L = cammino ottico della luce attraverso la cuvetta (cm)

Tasso di decomposizione della sostanza organica

Una volta recuperate, le stecchette vengono lavate sotto acqua corrente in laboratorio, seccate in stufa a 70°C per 4 giorni, pesate (DM), e poi incenerite in muffola a 500 °C per 5 ore e ripesate (AFDM) (Figura 41). Il tasso di decomposizione tiene conto della perdita di massa delle stecchette e viene calcolato con la seguente formula (Petersen and Cummins, 1974):

$$M_t = M_0 e^{-kt}$$

M_t = Peso secco senza le ceneri (AFDM) rimanente al tempo t (la differenza tra la il peso secco e quello incenerito della stecchetta)

M_0 = peso secco iniziale della stecchetta;

k = tasso di decomposizione;

t = numero dei giorni in cui la stecchetta è rimasta nel torrente.



Figura 41 - Stecchette di legno utilizzate per misurare il tasso di decomposizione della sostanza organica.

Le specie target

Sulla base della struttura osservata (es. ricchezza, diversità, densità) e sulla base dei gruppi funzionali presenti (I tratti biologici inerenti il sistema di nutrizione sono stati valutati secondo Moog (2002) e Ilg and Castella (2006)), con particolare attenzione ai livelli trofici condizionati dall'accumulo di contaminati nei sedimenti, sono state selezionate 11 specie target (quindi il triplo delle specie previste da proposta progettuale= 3) tra cui 3 detritivori-raccoglitori (*Diamesa cinerella* gr., *Diamesa zernyi* gr., *Diamesa latitarsis* gr.), 2 raschiatori-detritivori (*Baetis alpinus*, *Baetis rhodani*), 6 predatori (*Pseudodiamesa branickii*, *Perlodes intricatus*, *Dyctiogenus alpinus*, *Rhyachophila occidentalis*, *Rhyachophila torrentium*, *Rhyachophila tristis*). In Tabella 34 sono sintetizzate alcune informazioni sull'autoecologia delle diverse specie tratte da Sansoni (1988), Lencioni & Rossaro (2005), Lucentini et al., 2011; Maiolini & Lencioni, 2002).

Nel testo, i tre gruppi di specie del genere *Diamesa* vengono riportati per semplicità senza "gr."

Sulla base della loro abbondanza numerica nelle diverse stagioni e siti, su alcune sono state testate tutte le molecole selezionate, con test di tossicità acuta e di genotossicità (Tabella 35 e Tabella 36) su altre solo una o poche molecole e/o solo in una stagione (i siti di studio sono caratterizzati da una forte stagionalità).

Tabella 34 - Elenco delle specie target utilizzate come modello nei test di tossicità acuta e genotossicità, ordinate in base al loro ruolo trofico. DET= detritivori-raccoglitori; RAS-DET= raschiatori-detritivori; PRE= predatori; PRE*= solo larve “mature” (IV stadio), le larve giovani sono detritivore. Foto © MUSE, eccetto *R. torrentium*, foto da Waringer J., Graf W., 2011.




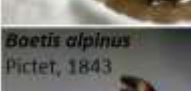



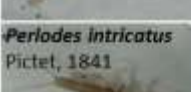



Specie	Ruolo trofico	Sito; stagione	Autoecologia	Abbondanza (%)	Test; stagione
 <i>Diamesa cinerella</i> Gr.	RAS-DET	PTm, PTv; inverno	Specie stenoterma fredda, tipica di torrenti montani e sorgenti fredde	PTm: 22,8% PTv: 20,6%	Tossicità, Danni al DNA; inverno
 <i>Diamesa zernyi</i> Gr.	RAS-DET	PRO; estate	Specie stenoterma fredda, tipica di torrenti glaciali e sorgenti fredde; spesso associata a <i>Hydrurus foetidus</i>	90%	Tossicità, Danni al DNA; estate
 <i>Diamesa latitarsis</i> Gr.	RAS-DET	PRO; estate	Specie stenoterma fredda, tipica di torrenti glaciali	10%	Danni al DNA; estate
 <i>Baetis alpinus</i> Pictet, 1843	RAS-DET	PTm, PTv, ML; inverno, estate	Specie tipica di torrenti montani e sorgenti (fino a oltre 2600 m slm)	Inverno PTm: 17,8%; PTv: 15,3%; ML: 0,4% Estate PTm: 5,8%; PTv: 2,4%; ML: 0,4%	Tossicità, Danni al DNA; inverno; Danni al DNA, estate
 <i>Baetis rhodani</i> Pictet, 1843	RAS-DET	ML; inverno, estate	Specie tipica di ambienti ritralli, anche inquinati	Inverno ML: 2,0% Estate ML: 2,5%	Tossicità, Danni al DNA; inverno; Danni al DNA, estate
 <i>Pseudodiamesa branickii</i> Nowicki, 1873	PRE*	PTm, PTv; inverno	Specie stenoterma fredda, tipica di torrenti montani e sorgenti fredde	PTm: 3,0% PTv: 2,7%	Tossicità, Danni al DNA; inverno
 <i>Perlodes intricatus</i> Pictet, 1841	PRE	PTm; inverno	Specie tipica di torrenti montani, fino a 2500 m slm	PTm: 0,02%	Tossicità, Danni al DNA; inverno
 <i>Dictyogenus alpinus</i> Pictet, 1843	PRE	PTm, PTv; inverno	Specie tipica di torrenti montani, tra 900 e 2000 m slm	PTm: 0,015% PTv: 0,015%	Tossicità; inverno
 <i>Rhyacophila occidentalis</i> McLachlan, 1874	PRE	ML, PTv; estate ML; inverno	Specie reofila, vive in torrenti montani	Estate ML: 0,31% PTv: 0,23% Inverno ML: 0,18%	Tossicità, Danni al DNA; inverno; Danni al DNA, estate
 <i>Rhyacophila tristis</i> Pictet, 1834	PRE	PTm, PTv; inverno PTv; estate	Specie stenoterma fredda di torrenti montani	Inverno PTm: 0,01% PTv: 0,02% Estate PTv: 0,04%	Danni al DNA; inverno; Tossicità, Danni al DNA; estate
 <i>Rhyacophila torrentium</i> Pictet, 1834	PRE	PTm, ML; Inverno	Specie reofila, vive in torrenti montani	PTm: < 0,01% ML: 0,01%	Danni al DNA; inverno

Tabella 35 - Prove di tossicità acuta effettuate.

Specie	Totali specie tossicità acuta Inverno	Totali specie tossicità acuta Estate	Totali specie tossicità acuta	Totali specie genotossicità Inverno	Totali specie genotossicità Estate	Totali specie genotossicità
Baetis alpinus	21	16	37	29	43	72
Baetis rhodani	11	4	15	7	17	24
Diamesa cinerella	27		27	65	1	66
Diamesa latitarsis		3	3		5	5
Diamesa zernyi		17	17		40	40
Dictyogenus alpinus	2		2			
Perlodus intricatus	2		2	3		3
Pseudodiamesa branickii	24	2	26	20	2	22
Rhyacophila occidentalis	13	8	21	18	23	41
Rhyacophila torrentium	1		1	3		3
Rhyacophila tristis		5	5	2	9	11
Totali stazioni per stagione	101	55	156	147	140	287
Totali stazioni	156			287		

Tabella 36 - Numero di animali esposti suddivisi per specie e molecole utilizzate nei test

Specie	Nome/Codice	Stazione	Molecole tox acuta	Molecole genotox	N° animali esposti tox acuta	N° animali esposti genotox	N° animali esposti totali
<i>Baetis alpinus</i>	Ba	PTm, PTv, ML	FUR, IBU, SUC, TCC, TMP	FUR, IBU, SUC, TCC, TMP	1850	360	2210
<i>Baetis rhodani</i>	Br	ML	FUR, IBU, SUC, TCC, TMP	FUR, IBU, SUC, TCC, TMP	965	120	1085
<i>Dictyogenus alpinus</i>	Df	PTm, PTv	IBU		12	0	12
<i>Perlodes intricatus</i>	Pi	PTm	FUR, IBU	IBU	12	3	15
<i>Diamesa cinerella</i>	Dc	PTm, PTv	FUR, IBU, TCC, TMP	FUR, IBU, TCC, TMP	1875	294	2169
<i>Diamesa zernyi</i>	Dz	Pr0	BOS, CAP, CHL, FUR, MET, MIX, SUC, TER, TON, TCC, TMP	BOS, CAP, CHL, FUR, MET, MIX, SUC, TER, TON, TCC, TMP	835	200	1035
<i>Diamesa latitarsis</i>	DI	Pr0		CHL	0	25	25
<i>Pseudodiamesa branickii</i>	Pb	PTm, PTv	FUR, IBU, TCC, TMP	FUR, IBU, TCC, TMP	1300	110	1410
<i>Rhyacophila occidentalis</i>	Roc	PTm, PTv, ML	FUR, IBU, SUC	FUR, IBU, SUC	80	41	121
<i>Rhyacophila torrentium</i>	Rto	PTm, ML			0	3	3
<i>Rhyacophila tristis</i>	Rtr	PTm, PTv	FUR, IBU		6	9	15

Analisi dei dati

I dati di abbondanza sono stati espressi come numero di individui/m² per sito di indagine e stagione. La diversità biologica (alpha diversità) è stata valutata come numero di taxa (S), numero di individui (N), Indice di Shannon (H) (Shannon and Weaver, 1949) e Indice di Dominanza di Simpson (D) (Simpson, 1949).

Le differenze significative tra le stagioni e i siti sono state stimate mediante Mann-Whitney U-test e test ANOVA ($p < 0.05$).

La relazione tra le variabili ambientali e biologiche è stata valutata con il Modello di Regressione Lineare ($p < 0.05$) e con analisi multivariata (Analisi Canonica delle Corrispondenze, CCA). Nella CCA, l'ordinamento di siti e taxa è vincolato a combinazioni lineari di variabili ambientali; gli assi di ordinamento rappresentano gradienti ambientali interpretabili con le variabili selezionate per l'analisi. Nella CCA sono state incluse 10 delle 25 variabili ambientali misurate selezionate sulla base delle correlazioni significative ($p < 0.05$): temperatura dell'acqua, conducibilità, torbidità,

portata, produzione primaria (clorofilla a + feofitina a), nutrienti (azoto totale, fosforo totale, orto fosfato), silice, solfati. Dei 49 taxa rinvenuti, 34 sono stati inseriti nella matrice biologica, ovvero quelli con frequenza ≥ 2 . Questa matrice è stata utilizzata anche per classificare i siti con Cluster Analysis (Algorithm Paired group (UPGMA), Similarity Index: Bray-Curtis) e ordinarli con Analisi delle Componenti Principali (PCA). Per le analisi statistiche sono stati utilizzati il software PAST 3.06 software (Hammer et al., 2001) e STATISTICA 12.0. La qualità dell'acqua e lo stato ecologico sono stati valutati mediante l'applicazione degli Indici I.B.E. e STAR_ICMi.

Indice biotico esteso (I.B.E.)

L'indice biotico esteso (I.B.E.) si basa sull'analisi della comunità di macroinvertebrati che colonizzano gli ecosistemi fluviali. Tali comunità sono composte da popolazioni caratterizzate da differenti livelli di sensibilità alle modificazioni ambientali e da differenti ruoli ecologici. L'indice fornisce un'informazione integrata nel tempo degli effetti causati da differenti azioni turbative (fisiche, chimiche e biologiche). Nei progetti di monitoraggio l'indice viene considerato come un metodo complementare e integrato al controllo chimico e fisico delle acque. L'indice permette di rilevare lo stato di qualità del tratto di corso d'acqua analizzato, ma non consente di individuare e valutare il grado dell'azione dei singoli fattori che hanno indotto modificazioni. L'I.B.E. si basa sul confronto e sulla valutazione delle differenze tra la composizione della comunità "ottimale o attesa" e la composizione della comunità "campionata" in un determinato tratto del corso d'acqua. Il metodo prevede l'ausilio di una tabella a doppia entrata (Tabella 37). Questa tabella permette di trasformare le indicazioni racchiuse nella lista dei "taxa" in un giudizio sulla qualità del corso d'acqua, espresso attraverso un valore dell'indice. Sono due gli indicatori che influenzano il giudizio dell'indice: la presenza nel campione di "taxa" a differenti livelli di sensibilità alle alterazioni del corpo idrico e la ricchezza totale in "taxa" della comunità. Il valore ottenuto dall'indice, espresso con un numero intero su scala discreta, riassume un giudizio di qualità basato sulle modificazioni della comunità campionata rispetto alla comunità attesa. Il livello di identificazione richiesto per i vari "taxa" di macroinvertebrati di interesse è stato riportato in un'apposita tabella all'interno dei "Metodi analitici per le acque". Il valore dell'indice viene definito dal numero indicato nella casella che si trova all'incrocio tra la riga di entrata orizzontale e la colonna di entrata verticale. I valori dell'I.B.E. sono stati raggruppati in 5 Classi di qualità, ciascuno individuato da un numero romano. Le 5 Classi di Qualità possono essere facilmente visualizzate in cartografia mediante colori, nell'ordine dal più alto al più basso valore dell'indice: azzurro, verde, giallo, arancione e rosso (Tabella 38) (IRSA-CNR, A. P. A. T., 2003).

Tabella 37 - Tabella per il calcolo dell'Indice Biotico Esteso (I.B.E.) (IRSA-CNR, 2003).

Tabella 2: Tabella per il calcolo del valore di I.B.E.

Gruppi tassonomici che determinano con la loro presenza l'ingresso orizzontale in tabella (ingresso orizzontale)		Numero totale delle Unità Sistematiche costituenti la comunità (ingresso verticale)									
		0-1	2-3	4-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36...	
Plecoteri presenti (Leuctra *)	Più di una U.S.	-	-	8	9	10	11	12	13*	14*	
	Una sola U.S.	-	-	7	8	9	10	11	12	13*	
Efemeroteri presenti ** (Escludere Baetidae e Caenidae)	Più di una U.S.	-	-	7	8	9	10	11	12	-	
	Una sola U.S.	-	-	6	7	8	9	10	11	-	
Tricotteri presenti (Comprendere Baetidae e Caenidae)	Più di una U.S.	-	5	6	7	8	9	10	11	-	
	Una sola U.S.	-	4	5	6	7	8	9	10	-	
Gammaridi e/o Atheridi e/o Palemonidi presenti	Tutte le U.S. sopra assenti	-	4	5	6	7	8	9	10	-	
Asellidi e/o Nisargidi presenti	Tutte le U.S. sopra assenti	-	3	4	5	6	7	8	9	-	
Oligocheti o Chironomidi	Tutte le U.S. sopra assenti	1	2	3	4	5	-	-	-	-	
Altri organismi	Tutte le U.S. sopra assenti	0	1-	2-	3-	-	-	-	-	-	

Legenda:






*: nelle comunità in cui *Leuctra* è presente come unico "taxon" di Plecotteri e sono assenti gli Efemeroteri (tranne eventualmente generi delle famiglie di Baetidae e Caenidae), *Leuctra* deve essere considerata al livello dei Tricotteri per definire l'entrata orizzontale in tabella;

** per la definizione dell'ingresso orizzontale in tabella ogni genere delle famiglie Baetidae e Caenidae va considerato a livello dei Tricotteri;

-: giudizio dubbio, per errore di campionamento, per presenza di organismi di "drift" erroneamente considerati nel computo, per ambiente non colonizzato adeguatamente, per tipologia non valutabile con l'I.B.E. (es. sorgenti, acque di scioglimento di neve, acque ferme, zone deltizie, salmastre);

*: questi valori di indice vengono raggiunti raramente negli ecosistemi di acqua corrente italiani per cui occorre prestare attenzione, sia nell'evitare la somma di biotipologie (incremento artificioso del numero di "taxa"), che nel valutare eventuali effetti prodotti dall'inquinamento, trattandosi di ambienti con elevata ricchezza in "taxa".

Tabella 38 - Classi di qualità associate al valore dell'Indice I.B.E. corrispondente (IRSA-CNR, 2003).

Tabella 4: Tabella di conversione dei valori di I.B.E. in classi di qualità, con relativo giudizio e colore per la rappresentazione in cartografia. I valori intermedi tra due classi vanno rappresentati mediante tratteggio con colori o retinature corrispondenti alle due classi				
Classi di qualità	Valori di I.B.E.	Giudizio di qualità	Colore e/o retinatura relativi alla classe di qualità	
Classe I	10-11-12-...	Ambiente non alterato in modo sensibile	Azzurro	
Classe II	8-9	Ambiente con moderati sintomi di alterazione	Verde	
Classe III	6-7	Ambiente alterato	Giallo	
Classe IV	4-5	Ambiente molto alterato	Arancione	
Classe V	0-1-2-3	Ambiente fortemente degradato	Rosso	

Indice STAR_ICMi

L'indice STAR_ICMi è stato costituito per valutare la qualità generale dei corpi idrici, in relazione agli obiettivi della Direttiva Europea sulle Acque (2000/60/EC). Si tratta di un indice multimetrico costituito da sei metriche che devono essere opportunamente ponderate e normalizzate. Le sei metriche contenute nell'Indice sono: ASPT, $\log_{10}(\text{sel_EPTD}+1)$, 1-GOLD, Numero Famiglie di EPT, Numero Totale di Famiglie e Indice di diversità di Shannon-Weiner. Le sei metriche sono allineate con i tre aspetti

riportati in Direttiva per i macroinvertebrati e cioè tolleranza, ricchezza/diversità e abbondanza/habitat (Tabella 39 e Tabella 40).

Tabella 39 - Metriche che compongono l'indice STAR_ICMi divise per tipo di informazione (Buffagni & Erba, 2007).

Tipo di informazione	Tipo di metrica	Nome della Metrica	Taxa considerati nella metrica	Rif. Bibliografico	Peso
Tolleranza	Indice	ASPT	Intera comunità (livello di famiglia)	e.g. Armitage et al., 1983	0.333
Abbondanza/ Habitat	Abbondanza	$\text{Log}_{10}(\text{Sel_EPTD} + 1)$	Log_{10} (somma di Heptageniidae, Ephemeridae, Leptophlebiidae, Brachycentridae, Goeridae, Polycentropodidae, Limnephilidae, Odontoceridae, Dolichopodidae, Stratiomyidae, Dixidae, Empididae, Athericidae e Nemouridae +1)	Buffagni et al., 2004; Buffagni & Erba, 2004	0.266
	Abbondanza	1-GOLD	1 - (Abbondanza relativa di Gastropoda, Oligochaeta e Diptera)	Pinto et al., 2004	0.067
Ricchezza /Diversità	Numero taxa	Numero totale di Famiglie	Somma di tutte le famiglie presenti nel sito	e.g. Ofenböck et al., 2004	0.167
	Numero taxa	Numero di Famiglie di EPT	Somma delle famiglie di Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera	e.g. Ofenböck et al., 2004; Böhmer et al., 2004.	0.083
	Indice Diversità	Indice di diversità di Shannon-Wiener	$D_{S-W} = -\sum_{i=1}^s \left(\frac{n_i}{A} \right) \cdot \ln \left(\frac{n_i}{A} \right)$	e.g. Hering et al., 2004; Böhmer et al., 2004.	0.083

Tabella 40 - Tabella dei valori dell'Indice STAR_ICMi con relativo intervallo e colore di rappresentazione.

Stato Ecologico	ELEVATO	BUONO	SUFFICIENTE	SCARSO	CATTIVO
Intervallo Indice	> 0.95	0.95-0.71	0.71-0.48	0.48-0.24	< 0.24
Classe	1	2	3	4	5
Colore					

Le metriche possono essere raggruppate in metriche qualitative e quantitative. Il livello di identificazione delle unità sistematiche arriva al livello di famiglia. Alle singole metriche è attribuito un peso differente, il peso maggiore è attribuito alle metriche più robuste. In primo luogo si è proceduto al calcolo delle metriche, dopo di che, ciascuna metrica è stata normalizzata, cioè il valore osservato è stato diviso per il valore della metrica in condizioni di riferimento.

Il valore normalizzato di ciascuna metrica è stato poi moltiplicato per il suo peso (Buffagni and Erba, 2007). Lo stato ecologico del corso d'acqua soggetto di studio dev'essere espresso in Ecological Quality Ratio (EQR), quindi i valori rappresentativi della qualità ecologica dell'indice devono essere rapportati ad una scala ideale che va da 0 a 1, dove 0 rappresenta il più basso valore ottenibile, con qualità del corpo idrico peggiore, mentre 1 rappresenta il più alto valore ottenibile, massima qualità che include anche i valori di riferimento. Occorre quindi confrontare i singoli valori osservati con quelli di riferimento. Si ha una suddivisione in cinque classi con limiti definiti tra le classi. Esistono appositi software per il calcolo corretto dell'Indice (Buffagni and Erba, 2007).

Per il calcolo dell'Indice e l'espressione dell'EQR è stato utilizzato il Software MacrOper.ICM, versione MacrOper 1.0.5, 2013 (<http://www.life-inhabit.it/cnr-irsa-activities/it/download/software/macropicmsoft/macropicm-software-download>).

Risultati e Discussione

Variabili ambientali

Nella Tabella 41 sono riportati i dati riguardanti le principali caratteristiche ambientali dei 4 siti di indagine nelle due stagioni, inverno (=I) ed estate (=E).

Tabella 41 - Variabili ambientali dei 4 siti di indagine in estate. I valori di BPOM sono espressi come media \pm deviazione). * Temperatura dell'acqua misurata durante il campionamento biologico. I= inverno (febbraio), E1= inizio estate (giugno per PT e ML, luglio per PR0), E2= fine estate (settembre). Nella seconda colonna l'abbreviazione delle 10 variabili ambientali (in grassetto) usate nell'analisi multivariata.

		PTm	PTv	ML	PR0	PR0	PTm	PTv	ML
Quota	Quota	1792	1790	221	2685	2685	1792	1790	221
Stagione	Stagione	I	I	I	E1	E2	E1	E1	E1
Temperatura (°C)	Temp	2.8	4.2	6.7	0.7	1.4	12.3	11.8	11.7
pH	pH	7.7	7.8	8.6	7.1	7	8	7.9	8.5
Conducibilità ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Cond	200	214	298	12.25	12	138	145	221
O.D. (mg/L)	O2	10	10	12	6.5	9	11	9.6	12.5
O.D. (%)	%satO2	94	92	104	95	98	127	110	117
Torbidità (NTU)	Torb	7	30	4	60	72	4	4	7
Alcalinità (mg CaCO_3 /L)	Alcal	96.3	107.8	146.5	17	8.8	73	78	134
Durezza (°F)	Dur	9.9	11.2	16.0	0.8	0.7	6.1	7	12.2
N-NO ₃ (μg /L)	N-NO3	808	3211	1015	280	120	360	570	650
N-NH ₃ (μg /L)	N-NH3	107	67	44	3	6	18	18	18
N _{tot} (μg /L)	Ntot	1704	4575	1252	500	157	450	600	700
P-PO ₄ (μg /L)	P-PO4	67	450	15	10	2	9	20	10
P _{tot} (μg /L)	Ptot	112	560	25	70	10	9	20	10
SiO ₂ (mg/L)	SiO2	8.9	8.0	3.7	1.4	1.3	5.8	6	3.1
SO ₄ (mg/L)	SO4	12.0	13.0	22.06	0.4	0.5	8.6	8.5	10.1
Solidi Sospesi (mg/L)	SS	3.0	2.7	2.4	7.6	6.8	3.4	2.2	3.6
Portata (L s ⁻¹)	Portata	27.0	17.7	219.1	9.9	17.3	45.9	43.6	463.1
Clorofilla a (mg cm ⁻²)	Clorofil	1.3	1.2	3.0	-0.03	0.2	0	0.1	0.4
Feofitina a (mg cm ⁻²)	Feofitin	0.05	0.07	0.36	0.24	-0.10	0.90	4.70	10.00
Clorofilla a + Feofitina a ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Clor+Feo	1.34	1.29	3.41	0.21	0.10	0.90	4.80	10.40
BPOM (g m ²)	BPOM	0.79	0.78	0.2	1.05	0.7	1.2	0.7	0.5
k (cost di degradaz)	k_dec	0.001	0.004	0.004	0.0004	0.001	0.001	-	0.005
Ora	Ora	14	11	15	10	10	14	11	10

In media, al diminuire della quota aumentano progressivamente la portata (da 13.6 ± 5.3 L/s in PR0 a 341.1 ± 172.5 L/s in ML), la temperatura dell'acqua (da 1.1 ± 0.5 °C in PR0 a 9.2 ± 3.5 °C in ML), la conducibilità (da 12 ± 0.2 µS/cm in PR0 a 260 ± 54 µS/cm in ML), il pH (da 7.1 ± 0.1 in PR0 a 8.5 ± 0.1 in ML), l'alcalinità (da 12.9 ± 5.8 mg CaCO₃/L in PR0 a 140.3 mg CaCO₃/L in ML), la durezza (da 0.8 ± 0.1 °F in PR0 a 14.1 ± 2.7 °F in ML), i solfati (da 0.45 ± 0.07 mg/L in PR0 a 16.08 ± 8.46 mg/L in ML), la produzione primaria (clorofilla a+feofitina a = da 0.15 ± 0.08 µg/cm² in PR0 a 6.90 ± 4.93 µg/cm² in ML) e BPOM (da 0.4 ± 0.2 g/m² in ML a 1.0 ± 0.3 g/m² in PTm). La quota è risultata negativamente correlata ($p < 0.05$) con portata, pH, conducibilità, alcalinità, durezza, solfati, clorofilla a +feofitina a, BPOM, k (tasso di decomposizione della sostanza organica), positivamente ($p < 0.05$) con la torbidità. In Figura 42 l'andamento spazio-temporale delle 10 variabili selezionate per l'analisi multivariata.

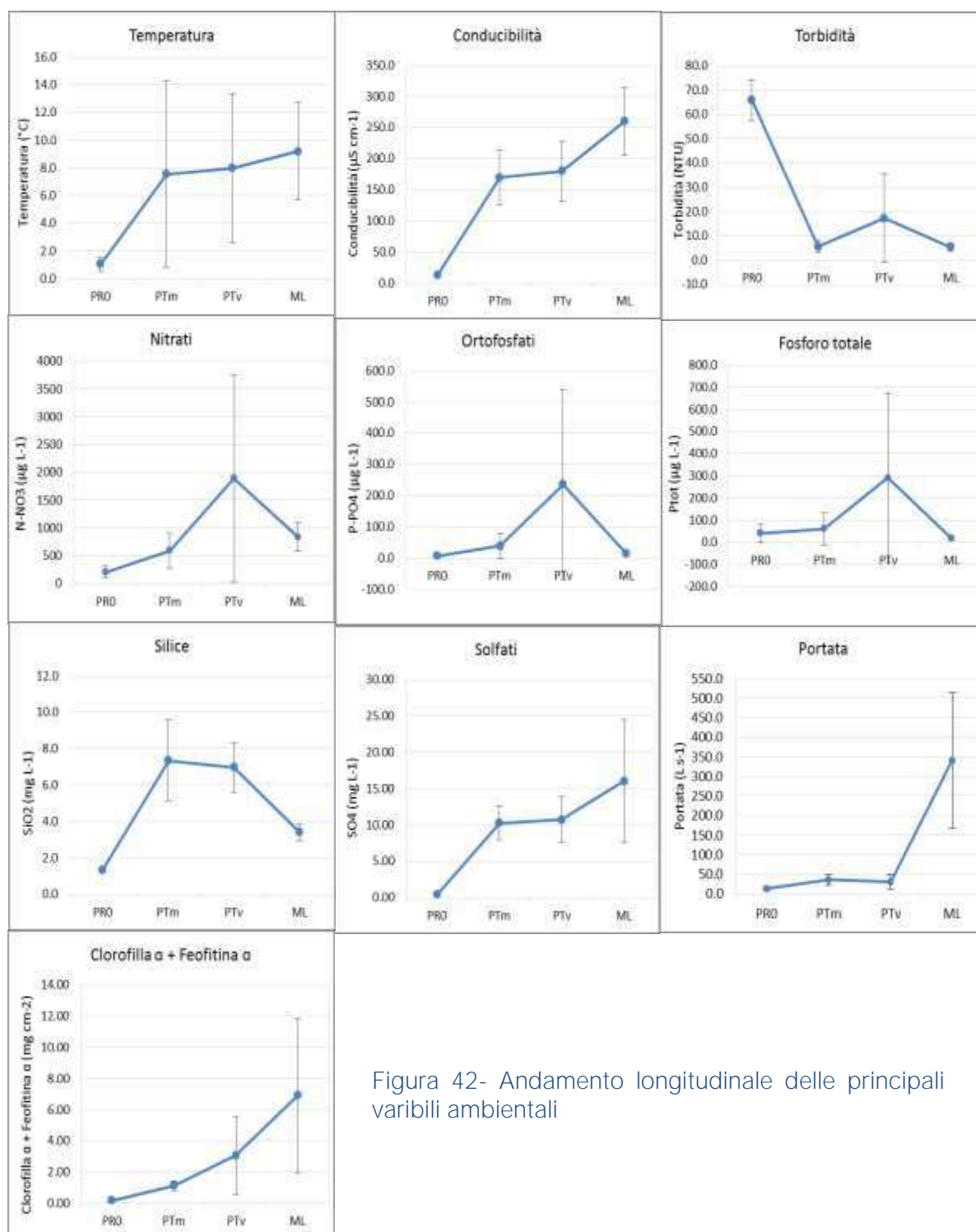


Figura 42- Andamento longitudinale delle principali variabili ambientali

Per alcune di queste variabili il valore medio misurato a monte e a valle del depuratore è risultato essere molto simile (pH) o solo leggermente più elevato in PTv, in modo non significativo (temperatura, clorofilla, solfati, portata, conducibilità). Altri parametri hanno mostrato valori massimi in PTv rispetto a tutti i siti di indagine, quali N-NO₃ ($1891 \pm 1897 \mu\text{g/L}$), Ntot ($2588 \pm 2811 \mu\text{g/L}$), P-PO₄ ($235 \pm 304 \mu\text{g/L}$) e PT ($290 \pm 382 \mu\text{g/L}$), e la torbidità – solo in inverno (= 30 NTU in PTv), mentre in estate il valore più elevato è stato misurato in PRO ($66 \pm 8 \text{ NTU}$) contro 4 NTU in PTv. Per azoto e fosforo, l'elevata

deviazione standard è indice di un'elevata stagionalità. Per esempio, i nitrati (N-NO₃) sono risultati più elevati in tutti i siti (eccetto PR0 non campionata in inverno), in inverno che in estate, con un picco, invernale di 3211 µg/L a valle del depuratore e un minimo di 808 mg/L a monte. Viceversa in estate la concentrazione di nitrati è aumentata progressivamente da PTm (360 µg/L) a ML (650 µg/L), e si è mantenuta su valori decisamente più bassi rispetto all'inverno.

La stessa stagionalità si è osservata per la conducibilità, significativamente più bassa in estate rispetto all'inverno nelle due stazioni del Tonale (- 31% in PTm, -32% in PTv). Anche il fosforo (sia ortofosfato che totale) ha una evidente stagionalità, con valori più elevati, specialmente nella PTv, in inverno (P-PO₄= 450 µg/L e PT= 560 µg/L). All'inizio dell'estate il valore di fosforo totale più elevato è stato misurato in PR0 come atteso (Maiolini e Lencioni, 2001), avendo origine dalla "farina di roccia" che si stacca durante il processo di fusione del ghiaccio a contatto con la roccia sottostante, entrando in acqua. La torbidità elevata misurata in PTv in inverno ha invece diversa origine, essendo riconducibile allo scarico del depuratore. La silice ha mostrato valori più elevati in media in PT, ad indicare contributi di sorgenti e acque sotterranee (l'origine del torrente Vermigliana è mista, kreno-rhithral).

Tipo di flusso e granulometria

Nella Tabella 42 sono riportati i dati relativi all'idrologia e alla geomorfologia nelle stazioni di campionamento in estate e in inverno. Per ogni stazione sono state effettuate cinque repliche. I dati riguardanti velocità di corrente e profondità sono stati ottenuti dalle medie tra queste repliche, ed è perciò indicata anche la deviazione standard. La granulometria indicata in percentuale rappresenta la proporzione dei vari microhabitat nell'area totale.

Tabella 42 – Tipo di flusso e granulometria dei siti di indagine nelle date di campionamento.

	PR0	PTm	PTv	ML	PR0	PTm	PTv	ML
Data	17/09/2015	23/02/2016	23/02/2016	22/02/2016	13/07/2016	29/06/2016	29/06/2016	28/06/2016
Tipo di flusso	UW	RP	RP	SM-RP	CF	RP	CF-UW	BW
Velocità di corrente (giri minuto ⁻¹)	237 ± 181	72 ± 21	53 ± 56	61 ± 56	144 ± 84	129 ± 50	149 ± 41	143 ± 27
Profondità (cm)	10,2 ± 5,3	18,0 ± 7,5	16,6 ± 8,8	18,1 ± 9,7	12,6 ± 2,9	23,8 ± 5,1	27,0 ± 4,9	33,7 ± 8,9
Granulometria dell'alveo (%)	SAB 40%, GHI 20%, MGL 20%, MIC 10%, MAC 10%	GHI 25%, MIC 25%, MGL 20%, SAB 15%, MES 15%	SAB 40%, MES 30%, GHI 20%, MAC 5%, MIC 5%	GHI 35%, SAB 20%, MIC 20%, MES 15%, MAC 10%	MES 40%, GHI 35%, MGL 15%, SAB 5%, MAC 5%	MES 45%, MAC 30%, MIC 15%, SAB 10%	MAC 30%, MES 30%, MIC 20%, SAB 15%, GHI 5%	MAC 40%, MIC 30%, GHI 15%, MGL 5%, MES 5%, SAB 5%
Eventuale copertura biotica	<i>Hydrurus foetidus</i>	<i>Hydrurus foetidus</i> , muschi	<i>Hydrurus foetidus</i>	Muschi	<i>Hydrurus foetidus</i>	/	Muschi	Muschi e ranuncoli

Nella stazione PR0 nel campionamento di luglio il tipo di flusso prevalente è il flusso caotico/Chaotic flow (CF), caratterizzato da un misto tra i flussi più veloci, in cui nessuno è predominante; l'alveo campionato è composto prevalentemente da pietre di medie dimensioni (6-20 cm) e da ghiaia (0,2 – 2 cm) mentre risulta abbondante la copertura

dell'alga *Hydrurus foetidus*. Nella stessa stazione nel campionamento di settembre il flusso è di tipo Uw "Unbroken standing waves" in cui la superficie dell'acqua appare disturbata; Il substrato dell'alveo è costituito da sedimenti a granulometria fine, in prevalenza da sabbia con il 40%; una percentuale pari al 20% è costituita invece da massi di grosse dimensioni (megalithal); anche in questo periodo la copertura di *Hydrurus foetidus* è massiccia.

Nella stazione PTm prevale, sia in estate che in inverno, un flusso di tipo Increspato/Rippled (RP) in cui la superficie dell'acqua mostra delle increspature simmetriche. Per quanto riguarda il periodo estivo la granulometria dominante è quella a Mesolithal, seguita dal Macrolithal, mentre in inverno prevalgono percentualmente ghiaia e Microlithal (substrati rilevati entrambi al 25%). In inverno la copertura biotica dei substrati minerali era costituita sia da *Hydrurus foetidus* che da muschi, mentre in estate la componente vegetale è risultata assente.

Nella stazione PTv in estate è di tipo caotico (CF) mentre in inverno il flusso prevalente è di tipo Increspato/Rippled (RP). Il substrato, in estate, è caratterizzato da una granulometria maggiore rispetto all'inverno, con prevalenza di pietre grossolane (20-40 cm) e di medie dimensioni (6-20 cm), entrambe con percentuale del 30%; in inverno invece il substrato campionato ha una granulometria inferiore, con la prevalenza di sabbia (40%).

Nella stazione ML i microhabitat minerali prevalenti sono il Macrolithal (40%) e il Microlithal (30%); in inverno la granulometria del fondo dell'alveo è inferiore, con ghiaia al 35%, sabbia e pietre piccole al 20%. La copertura biotica in questa stazione è rappresentata da muschi (in entrambe le stagioni) e da ranuncolo (in estate).

Per quanto riguarda l'idrologia, PR0 è la stazione con la maggiore velocità media di corrente (237 ± 181 (giri/min⁻¹ in settembre) dovuta agli apporti derivanti dallo scioglimento del ghiaccio; in generale la velocità di corrente aumenta nella stagione estiva con l'aumento di portata tipico della stagione. La profondità media maggiore si rileva nella stazione ML, come ci si aspetta dalla conformazione dell'alveo del corso d'acqua in questa stazione.

Comunità dei macroinvertebrati

In totale, sono stati raccolti 206.923 invertebrati acquatici di cui l'84% insetti (distribuiti in 28 famiglie) e il restante 16% distribuito in 9 classi/phylum di non-insetti (Tabella 43). In Tabella 43 i taxa sono elencati nell'ordine utilizzato per l'analisi proporzionale multihabitat e l'applicazione del programma di calcolo dell'indice STAR ICMi ("Macroper").

Tabella 43 - Elenco dei taxa rinvenuti nei 4 siti di indagine in inverno (I= febbraio 2016) e in estate (E= giugno, 2016). Solo il sito in Presena è stato campionato a inizio (E1) e fine (E2) esate. Liv1= Livello tassonomico superiore (a partire dall'Ordine), Liv2= livello tassonomico inferiore (per tutti i taxa la famiglia con l'eccezione di Ostracoda e Harpacticoida= classi, Acari= sottoclasse, Tardigrada= phylum). Con sfondo grigio: insetti.

Liv1	Liv2	E1	E2	I	E1	I	E1	I	E1	
		PR0	PR0	PTm	PTm	PTv	PTv	ML	ML	
Plecoptera	Leuctridae			1232	230	578	276		1680	3996
Plecoptera	Nemouridae			388	90	215	106			799

Liv1	Liv2	E1 PR0	E2 PR0	I PTm	E1 PTm	I PTv	E1 PTv	I ML	E1 ML	
Plecoptera	Taeniopterygidae			2						2
Plecoptera	Perlodidae			37	6	19	6			68
Ephemeroptera	Baetidae			2722	903	2328	863	1580	1680	10076
Ephemeroptera	Heptageniidae			32	83	55	26	26	23	246
Ephemeroptera	Ephemerellidae							32	3320	3352
Ephemeroptera	Heptageniidae						3	16	3	22
Trichoptera	Ecnomidae							18		18
Trichoptera	Glossosomatidae			126	23	48	30	116	320	663
Trichoptera	Hydropsychidae			30	13		3	244	187	477
Trichoptera	Hydroptilidae							312	13	325
Trichoptera	Limnephilidae			284	20	110	23	166	53	656
Trichoptera	Psychomyidae							54	720	774
Trichoptera	Rhyacophilidae			10	17	20	90	130	200	467
Trichoptera	Sericostomatidae				3			36		39
Coleoptera	Dytiscidae							4		4
Coleoptera	Elmidae			74	43		160	2776	5013	8067
Coleoptera	Hydraenidae			74	3		40			117
Coleoptera	Hydrophilidae				7					7
Diptera	Anthomyidae							16		16
Diptera	Athericidae			2						2
Diptera	Blepharicidae				23		13			36
Diptera	Chironomidae	860	430	4610	5070	4135	24616	54402	37413	130246
Diptera	Empididae			30	7	45	20	346	227	674
Diptera	Limoniidae			112	60	10	56	508	53	799
Diptera	Simuliidae			3982	307	2195	536	886	2293	10199
Diptera	Psycodidae			320		213	3	20		556
Crustacea	Asellidae							34		34
Crustacea	Gammaridae							2		2
Crustacea	Ostracoda			34	95	14	317		4	464
Crustacea	Harpacticoida			35	103	454	257	27	40	916
Gastropoda	Ancylidae							56	440	496
Gastropoda	Bythiniidae						3		13	16
Gastropoda	Hydrobioidea				3			2		5
Gastropoda	Lymnaeidae							2		2
Gastropoda	Physidae							14		14
Bivalvia	Pisidiidae							38	53	91
Bivalvia	Sphaeriidae								13	13
Tricladida	Planariidae			248	297	353	376			1273
Tricladida	Dugesidae							12	73	85
Hirudinea	Erpobdellidae							2		2
Oligochaeta	Haplotaxidae				17					17
Oligochaeta	Lumbricidae								23	23
Oligochaeta	Lumbriculidae			754	7403	4295	7076	748	3267	23543
Oligochaeta	Naididae							2288		2288
Arachnida	Acari			58	553		353	1200	960	3124
Nematoda	Mermithidae				90		390	2		482
Tardigrada	Tardigrada				4		33			37
Tot. ind/m2		860	430	15196	15475	15085	35675	66115	58087	206923
N. taxa		1	1	23	27	17	26	34	26	49

In tutti i siti di indagine i Chironomidae sono risultati il taxon dominante, rappresentante in PRO il 100% della comunità a inizio e fine estate (Figura 43). Nella stazione a monte dello scarico del depuratore del Passo del Tonale (PTm), in inverno la comunità è risultata costituita in prevalenza da Ditteri Chironomidi (30%) e Simuliidae (26%), seguiti da Efemerotteri Baetidae (18%), Plecotteri Leuctridae (8%) e Oligocheti Lumbriculidae (5%). Sono stati trovati in percentuale pari al 2% individui appartenenti alle famiglie Planariidae, Limnephilidae, Nemouridae appartenenti al genere *Protonemura*, Psycodidae e in percentuale pari all'1% le famiglie Limoniidae, Glossosomatidae, Nemouridae appartenenti al genere *Nemoura*. Nel campionamento effettuato nel periodo estivo sono prevalsi gli Oligocheti Lumbriculidae (48%), seguiti dai Chironomidae (33%) e dai Baetidae (6%). In ordine di abbondanza decrescente sono stati trovati anche Acari (4%), Ditteri Simuliidae e i Planariidae del genere *Crenobia* (2%) e altri taxa con abbondanza percentuale dell'1% (Leuctridae, Harpacticoida, Mermithidae, Ostracoda, Heptageniidae del genere *Ecdyonurus*); gli altri taxa che costituivano la comunità presentavano abbondanze inferiori all'1%. Anche a valle dello scarico (PTv), in inverno, la comunità macrobentonica è risultata dominata dai medesimi taxa ma con percentuali leggermente diverse ovvero codominanza di Lumbriculidae (28%) e Chironomidae (27%), seguiti dai Simuliidae e dai Baetidae (entrambi al 15%); seguivano i Leuctridae (4%), gli Harpacticoida (3%), i Planariidae del genere *Crenobia* (2%), Limnephilidae (1%), Nemouridae del genere *Protonemura* (1%) e Psycodidae (1%). Questo sito d'indagine in estate mostrava una dominanza di Chironomidi (69%), seguiti dai Lumbriculidae (20%); erano presenti, con abbondanze del 2% Simuliidae e Baetidae, mentre sono risultati presenti con abbondanze dell'1% Leuctridae, Acari, Planariidae, Harpacticoida e Mermithidae. In estate, in PTm la differenza principale si è osservata nell'aumento della percentuale di Lumbriculidae (48%), mentre in PTv nell'aumento dei Chironomidi (69%).

Nella stazione più a valle (ML) il gruppo dominante è ancora quello dei Chironomidae (82% della popolazione in inverno e 64% in estate); il secondo gruppo è rappresentato dai Coleotteri della famiglia Elmidae (4% in inverno e 9% in estate). Nel periodo estivo compaiono taxa tipici dei tratti di torrenti con quote meno elevate, come gli Efemerotteri della famiglia Ephemerellidae (6%).

Nel campione estivo la comunità presentava una maggiore abbondanza di Lumbriculidae (6%) e Simuliidae (4%) rispetto al campione invernale (entrambi i taxa all'1%). Baetidae e Leuctridae in estate erano entrambi presenti con abbondanza del 3%. Complessivamente, al Tonale, Baetidae, Simuliidae e Perlodidae sono risultati più abbondanti in inverno. I Chironomidae risultavano più abbondanti nel periodo estivo per i siti di indagine del Tonale, mentre per il sito di Mezzolombardo sono risultati meno abbondanti in estate rispetto al campionamento invernale. In questo sito non sono stati rilevati individui appartenenti alla famiglia Perlodidae. Anche i Leuctridae in ML sono risultati più abbondanti in estate, mentre in PTv e PTm l'andamento sembra inverso, con abbondanze superiori in inverno.

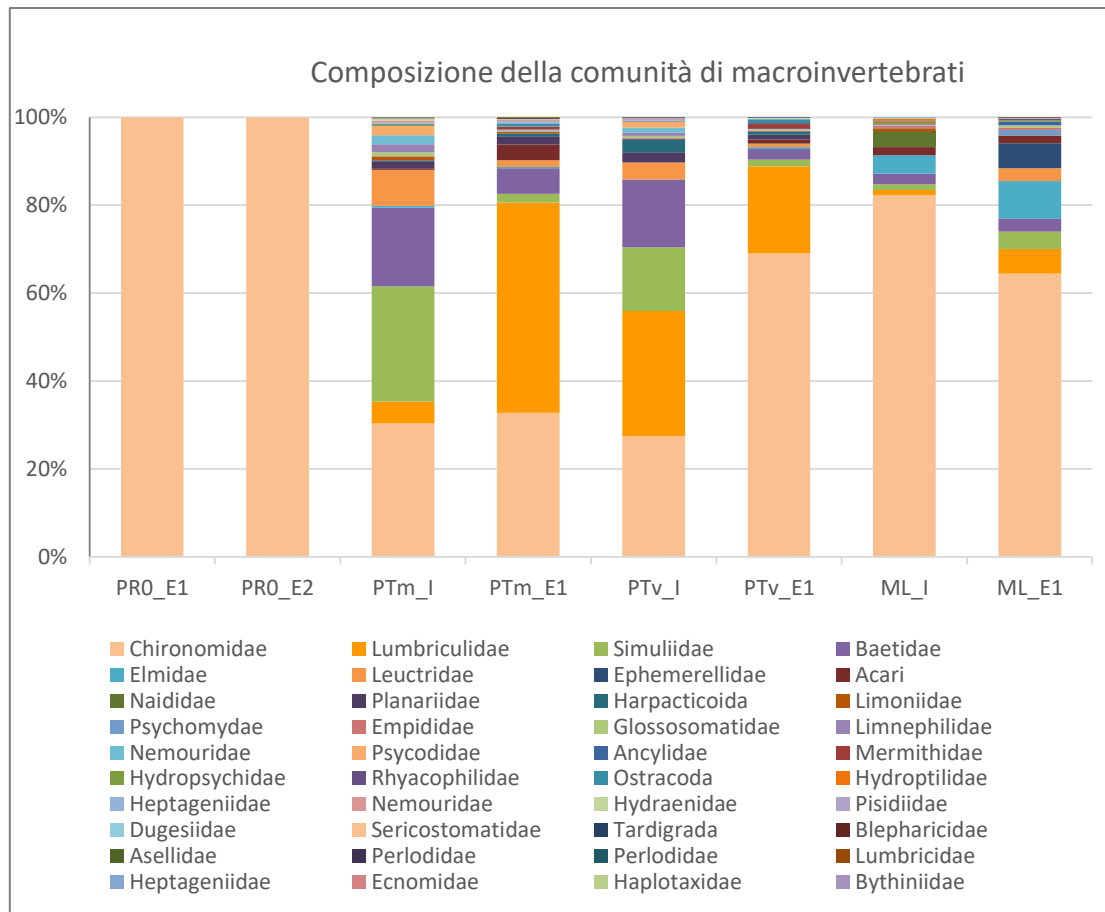


Figura 43- Composizione relativa della comunità di macroinvertebrati nei 4 siti di indagine.

Il numero totale di individui ($p = 0,0002$; $r = -0,958$) e di taxa ($p = 0,01$; $r = 0,8126$) è risultato aumentare da monte verso valle, al diminuire della quota, come atteso in torrenti alpini (Maiolini e Lencioni, 2001), con valori minimi in PRO e massimi in ML (Figura 44, Figura 45). Le due stazioni a monte e a valle del depuratore, che si trovano praticamente alla stessa quota (1792 e 1790 m slm), e solo a 120 m di distanza, ospitano un numero di individui simile in inverno, e un numero di taxa simile in estate. Il numero di taxa è molto più basso in PTv in inverno mentre qui l'abbondanza è aumentata notevolmente in estate (Tabella 43).

In ML si osserva l'andamento contrario, con più taxa e individui in inverno, quando le acque sono più fresche e l'inquinamento agricolo è più basso.

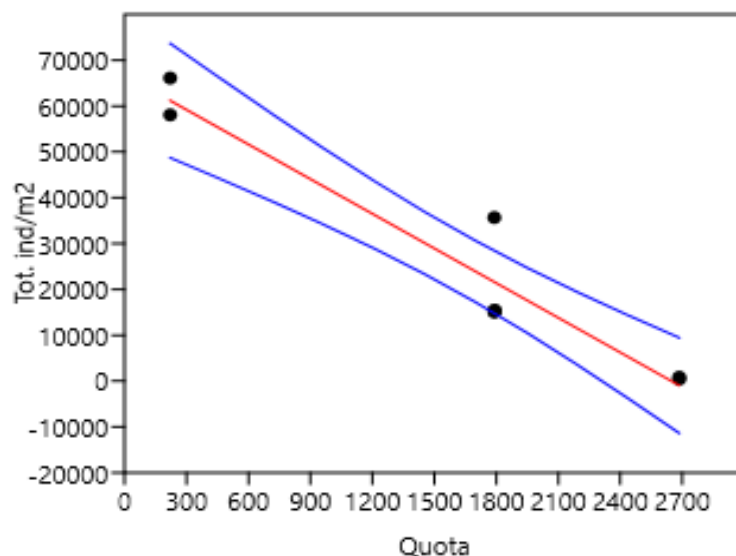


Figura 44 - Regressione lineare tra numero di individui/m2 e quota ($p = 0,0002$; $r = -0,958$). Pendenza (a)= $-25,222$, errore standard= $3,074$; intercetta (b)= 66776 , errore standard= 5683 ; le curve rappresentano l'intervallo di confidenza al 95%.

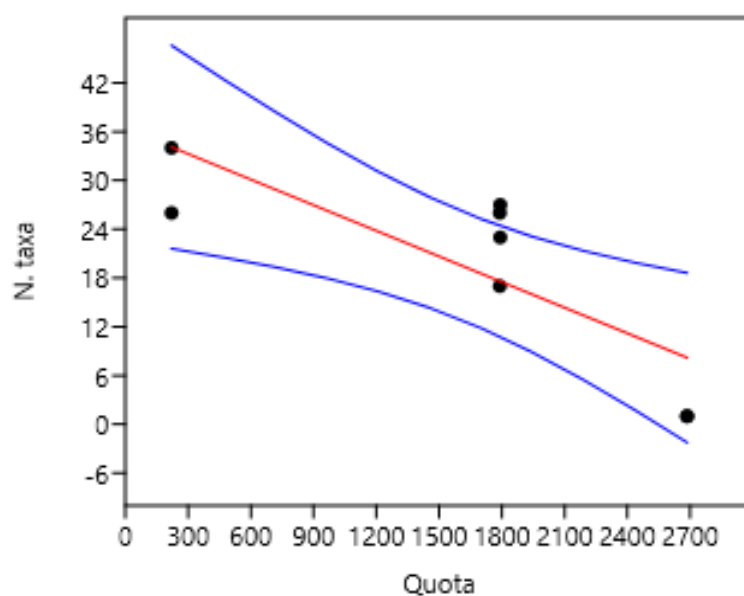


Figura 45 - Regressione lineare tra numero di taxa e quota ($p = 0,01$; $r = 0,813$). Pendenza (a)= $-0,011$, errore standard= $0,003$; intercetta (b)= $36,422$, errore standard= $5,690$; le curve rappresentano l'intervallo di confidenza al 95%.

In media il numero di taxa è risultato più basso in PTv (= 26) che in PTm (= 30) e ML (= 39); tuttavia questa differenza non è significativa come dimostra l'elevato valore di deviazione standard (Figura 46).

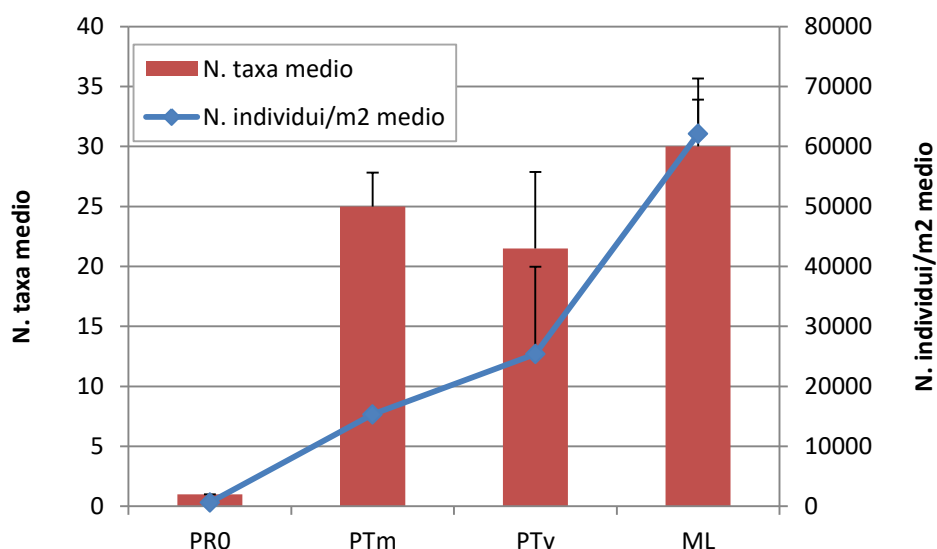


Figura 46 - Numero medio di taxa e di individui/m2 nei 4 siti di indagine. Barre= deviazione standard.

Nel sito del Presena (PRO), con caratteristiche tipiche di un ambiente crale, sono stati raccolti, in entrambe le stagioni, solo larve e pupe di Ditteri Chironomidi. Questo giustifica il valore di Shannon (= 0) e di Simpson (= 1) calcolati (Tabella 43; Figura 47), ovvero diversità nulla e dominanza assoluta nella comunità. Inoltre, tutte le larve e pupe raccolte sia a inizio che a fine state appartenevano al genere *Diamesa* Meigen e ai gruppi di specie *zernyi-cinerella* (~90%) e *latirarsis* (~10%) [le abbondanze relative sono state stimate sulla base delle larve determinate alla specie per i test di tossicità acuta e genotossicità e sulla base delle conoscenze del team di lavoro sulla tassonomia dei Diamesinae]. In media, la massima diversità è stata calcolata in PTm ($H = 1,70 \pm 0,32$; $D = 0,27 \pm 0,10$) (Figura 47).

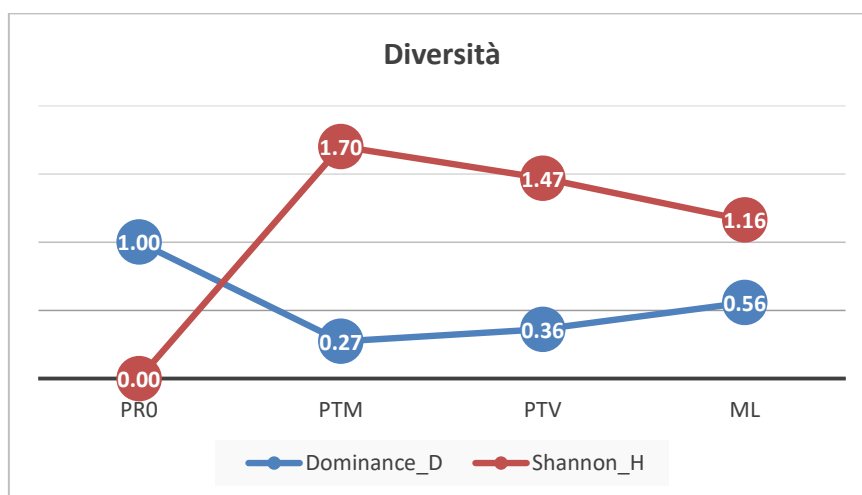


Figura 47 - Indice di Shannon e di Simpson (valori medi) nei 4 siti di indagine.

Molti taxa sono rari (presenti in meno del 50% dei campioni raccolti). Quindici di questi sono stati rinvenuti in solo 1 sito (in grigio in Figura 48), pertanto esclusi dall'analisi multivariata di classificazione e ordinamento.

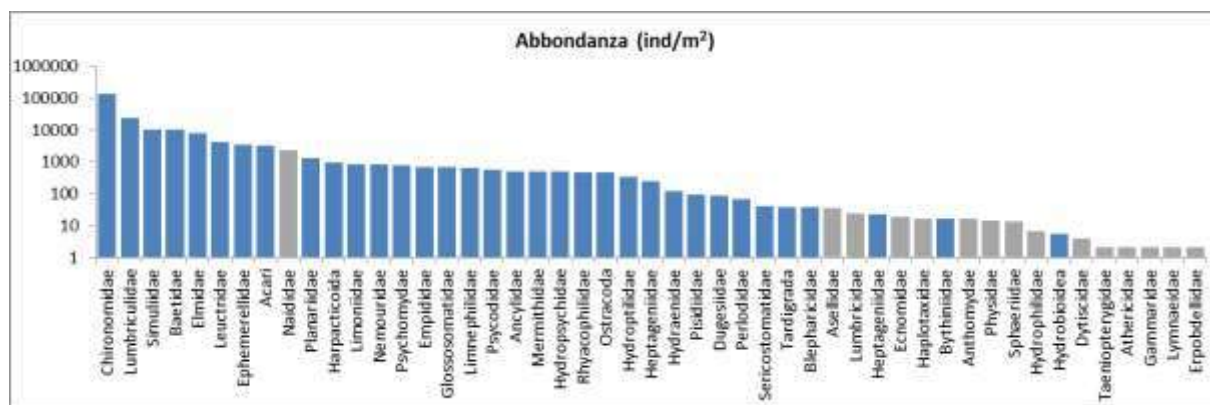


Figura 48 - Taxa (N. 49) in ordine di abbondanza (in scala logaritmica). In grigio taxa con frequenza=1.

In Figura 49 i risultati della Cluster Analysis, che mette in evidenza sia una chiara separazione tra i siti che tra le stagioni ("I" ed "E"). In inverno i tre torrenti, Presena (PRE0), Vermigliana (PTm e PTV) e Noce (ML) risultano bene separati tra loro, mentre in estate PTV risulta più simile a ML che a PTm, a conferma della Figura 43.

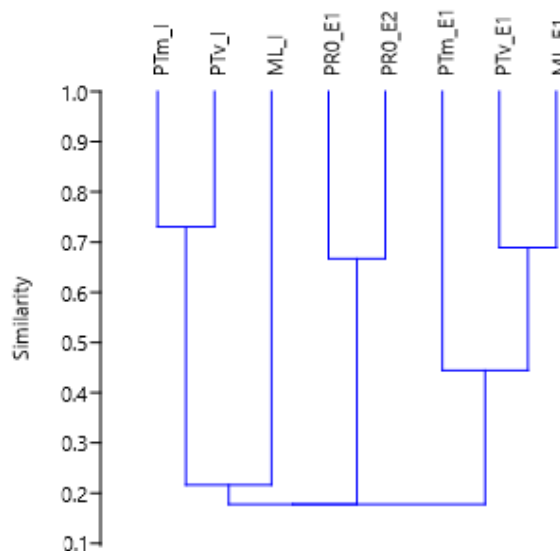


Figura 49 - Cluster Analysis (Indice di Similarità: Bray-Curtis).

A questo livello tassonomico in inverno le due stazioni del Tonale non risultano così diverse, se non per una maggior abbondanza relativa di Lumbriculidae in PTV riconducibile a un maggior carico di nutrienti a valle dello scarico (Tabella 41), Lumbriculidae che aumentano invece in proporzione in PTm in estate (Figura 43).

In Figura 50 il biplot “siti e variabili ambientali” risultato dall’analisi di ordinamento della PCA (34 taxa, 2 campioni per sito). I siti sono ordinati lungo un gradiente altitudinale-idrologico dalla PR0 alla ML (asse 2) e trofico-termico (asse 1). La PR0, a quota più elevata, è associata a temperatura, portata, conducibilità, produzione primaria, solfati e silice più basse, e a torbidità più elevata. Le stagioni vengono separate chiaramente lungo il primo asse, con l’inverno a destra e l’estate a sinistra del diagramma.

In Figura 51 sono presentati i risultati dell’analisi CCA (34 taxa, 2 campioni per sito, 10 variabili ambientali) (autovalori: asse 1= 0.302; asse 2= 0.1038; varianza spiegata= 65,8% (asse 1), 22.6% (asse 2), per un totale di 88,4%). Il plot mette in evidenza inoltre la similarità tra PTm e PTv in inverno, tra PTv e ML in estate e tra ML e PR0. Questa similarità tra ML e PR0 risulta anomala, inattesa, e dovuta unicamente alla dominanza nei due siti dei Chironomidi nella comunità nella comunità bentonica.

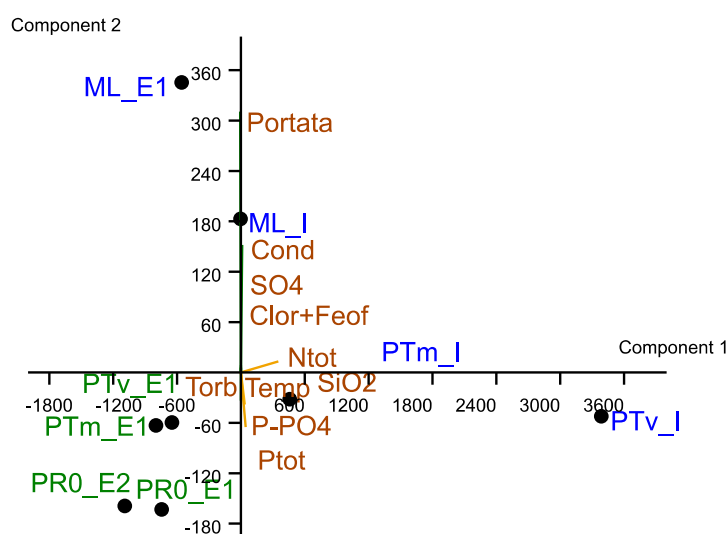


Figura 50 - Biplot PCA (10 variabili ambientali, 4 siti di indagine).

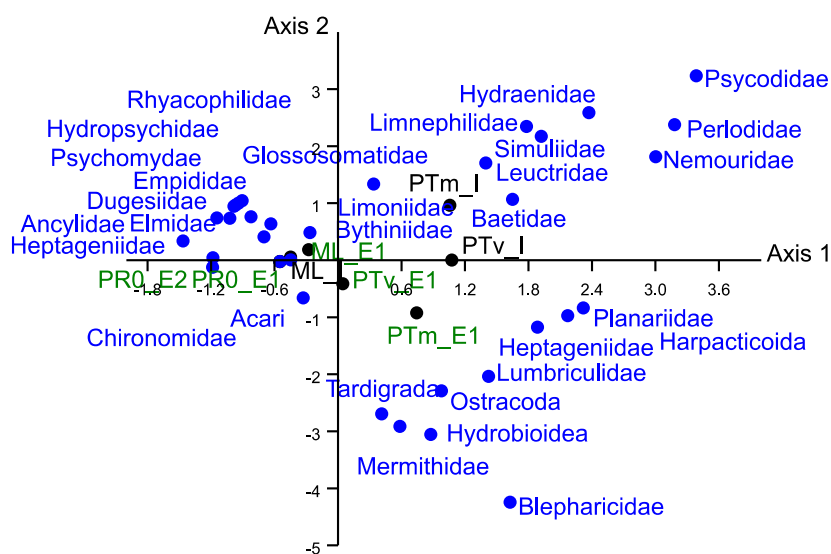


Figura 51 - CCA bilpot siti e taxa.

Per quanto riguarda la famiglia Chironomidae è stato condotto un ulteriore approfondimento, con la suddivisione in sottofamiglie (Tabella 44).

Tabella 44 – Elenco delle sottofamiglie di Chironomidae; per la sottofamiglia Chironominae sono state ulteriormente distinte due categorie di livello tassonomico inferiore (tribù di appartenenza).

		E1	E2	I	E1	I	E1	I	E1	
Sottofamiglia	Tribù	PR0	PR0	PTm	PTm	PTv	PTv	ML	ML	
Orthocladiinae		0	0	2253	4938	2976	24187	48619	37165	120138
Diamesinae		860	430	733	30	451	80	0	0	2585
Chironominae	Tanytarsini	0	0	597	68	390	313	5424	117	6910
	Chironomini	0	0	953	8	293	4	0	0	1259
Tanypodinae		0	0	73	25	24	31	359	130	644

L'analisi CCA, ripetuta con tale livello di identificazione, mette in evidenza la netta separazione tra i due siti ML e PR0 (Figura 52).

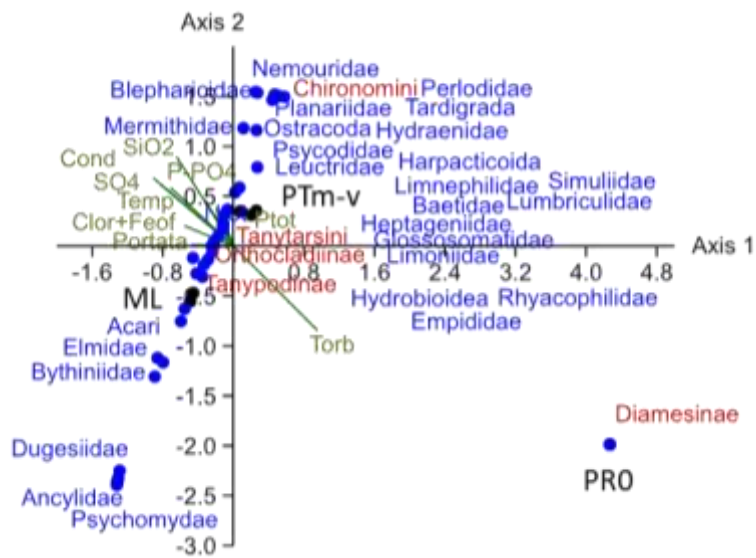


Figura 52 - CCA triplot siti, taxa e variabili ambientali (Chironomidi a livello di sottofamiglia).

I valori ottenuti dall'applicazione dell'Indice STAR_ICMi e dell'indice IBE sono riportati nella Tabella 45.

Tabella 45 - Indice STAR_ICMi e Indice IBE.

CORSO D'ACQUA	Data	SITO	STAR_ICMi			IBE	
			Valore	Stato Ecologico	Classe	Valore	Classe
Noce	22/02/2016	ML	0,766	BUONO	2	12-13	I
Noce	28/06/2016	ML	0,739	BUONO	2	11	I
Vermigliana	23/02/2016	PTm	1,191	ELEVATO	1	11-10	I
Vermigliana	29/06/2016	PTm	1,105	ELEVATO	1	11	I
Vermigliana	23/02/2016	PTv	1,039	ELEVATO	1	10	I
Vermigliana	29/06/2016	PTv	1,015	ELEVATO	1	11	I
Presena	13/07/2016	PR0	0,013	CATTIVO	5	1	V
Presena	17/09/2015	PR0	0,013	CATTIVO	5	1	V

Per il sito del Presena si sono ottenuti valori molto bassi per entrambi gli Indici, come atteso (Lencioni et al., 2002), in quanto sito caratterizzato da una naturale bassa biodiversità, ad una quota oltre il limite di applicabilità di entrambi gli indici. Il risultato di stato ecologico “cattivo” (Classe 5) non ha quindi valore se non a confermare l’inapplicabilità dei due indici. In base all’IBE, la qualità dell’acqua dei torrenti Vermigliana e Noce è risultata elevata (Classe 1 in entrambe le stagioni). In base all’Indice STAR-ICMi lo stato ecologico è risultato elevato per la Vermigliana (sia a monte che a valle dello scarico Classe 1), buono (Classe 2) a Mezzocorona. In questo caso, l’indice STAR_ICMi risulta più preciso rispetto all’I.B.E. essendo in grado di individuare un peggioramento nella qualità ecologica del corso d’acqua che non individuata dall’I.B.E.

In conclusione, nei 4 siti di indagine lungo l’asta del Noce, da 2685 a 221 m slm, è stata rinvenuta la comunità di macroinvertebrati attesa, da cui un elevato stato ecologico indice di un’elevata qualità dell’acqua. La ricchezza (N. taxa) e l’abbondanza (N. individui/m²) aumentano in modo significativo da monte verso valle, lungo un gradiente termico e idrologico ben definito. L’aumento della temperatura e della portata lungo il gradiente longitudinale possono essere ricondotte a variazioni naturali delle condizioni ambientali, così come della produzione primaria, della conducibilità. L’andamento spazio-temporale di altri parametri è invece riconducibile all’agricoltura (es. solfati a Mezzolombardo) e allo scarico di depuratori (molto evidente in PTv, in inverno, quando si raggiunge il numero più elevato di abitanti al Tonale). Qui, in inverno, si è registrata la concentrazione più elevata di nutrienti, sia azoto (nitrati e totale) che fosforo (orto fosfato e totale) e una torbidità elevata, paragonabile a quella registrata nel Rio glaciale Presena nel periodo del disgelo di inizio estate. Sempre in PTv, in inverno, il numero di taxa rinvenuto è risultato significativamente più basso che in PTm, mettendo in evidenza l’effetto negativo dello scarico sull’alfa diversità. A inizio estate, quando la composizione chimica dell’acqua in PTm e PTv è più simile, il numero di taxa in PTv raggiunge il valore rinvenuto in PTm. Se consideriamo il valore medio e la deviazione standard le due stazioni diventano molto simili, come sarebbe atteso in assenza dello scarico essendo alla stessa quota e solo a una 120 metri di distanza una dall’altra. La struttura della comunità di macroinvertebrati cambia nel tempo (si è osservata una chiara separazione tra estate ed inverno con la cluster analysis) e nello spazio (PR0 è molto diversa dagli altri tre siti, PTm e PTv sono molto simili soprattutto in inverno, ML è ben distinta dalle altre stazioni in inverno, confrontabile con PTv in estate. I Chironomidi sono il gruppo esclusivo in PR0 e dominante (>50% degli individui) in ML, in entrambe le stagioni, e in

Ptv, in estate. Tuttavia, con questo livello di determinazione, ovvero quello richiesto dalla Direttiva Europea 2000/60/EC (2000) recepita nell'ordinamento nazionale tramite il D.Lgs 152/2006, per valutare lo stato ecologico delle acque correnti, non si evidenziano significative differenze tra le due stazioni a monte e a valle dello scarico, PTm e Ptv sono risultate co-domite da Ditteri (Chironomidae e Simuliidae) e Oligocheti (Lumbriculidae), seguiti, in inverno, da Efemerotteri Baetidae. Cambiano le proporzioni tra Ditteri e Oligocheti (più abbondanti i primi in PTm in inverno e in Ptv in estate, viceversa per i secondi), ma i taxa dominanti sono gli stessi. In particolare, la maggior abbondanza di Oligocheti in Ptv in inverno è risultata correlata al maggior carico di nutrienti in questo sito. Allo stesso modo, l'analisi multivariata (CCA) non separa PR0 da ML perché entrambe dominate dai Ditteri Chironomidi. La determinazione a livello di sottofamiglia dei Chironomidi è sufficiente a separare nettamente queste due stazioni (in PR0 era presente solo la sottofamiglia delle Diamesinae, sia in estate che in inverno, appartenenti al genere *Diamesa*, assente in tutte le stagioni in ML dove è risultata la presenza solo di Tanytopodinae, Orthocladinae e Chironominae). E ancora, il genere *Diamesa* è stato rinvenuto con specie diverse in PT e PR0, per cui l'analisi a livello di specie modificerebbe ulteriormente i risultati dell'analisi multivariata, consentendo di mettere in evidenza le differenze tra i siti dovute a fattori naturali (es. la variazione della temperatura con le stagioni e la quota) ed autoecologici-fenologici (ciclo vitale e valenza ecologica delle diverse specie). Questi risultati confermano la necessità di determinare i macroinvertebrati a livello di specie (tutti i gruppi, non solo quelli indicati dalla Direttiva; nel caso dei Chironomidi almeno al livello di sottofamiglia) per poter analizzare variazioni spazio-temporali in relazione ai parametri ambientali e quindi ai diversi possibili impatti.

3.15.3 Obiettivo 3.3: Test di tossicità acuta (febbraio 2016-aprile 2016, giugno-luglio 2016)

Materiali e Metodi

Sono stati eseguiti test di tossicità sulle specie target selezionate nelle due stagioni, inverno ed estate, per un totale di 157 test (Tabella 35, Tabella 36). In inverno sono stati eseguiti sulle specie rinvenute in PTm, Ptv e ML; in estate solo sulle specie rinvenute in PR0. Tali test sono mirati a valutare la tossicità a breve termine (entro le 96 ore di esposizione) delle molecole selezionate espressa come LC = concentrazione letale/lethal concentration) al 10% (= concentrazione alla quale sono stati trovati il 10% di morti) e al 50% (= concentrazione alla quale sono stati trovati il 50% di morti). Sono stati eseguiti anche test impiegando miscele dei diversi contaminanti.

Le concentrazioni a cui esporre gli animali per ottenere i valori di LC10 (a cui eseguire i test di genossicità) e di LC50 sono state determinate sulla base:

- della letteratura esistente e quindi dei valori di LC o EC (= concentrazione di effetto) disponibili per le diverse molecole, calcolati per organismi acquatici, sono state scelte
- delle concentrazioni ambientali EC (= environmental concentrations) di contaminanti emergenti nei nostri siti, nelle due stagioni, fornite dall'Università di Trento a inizio progetto (gennaio 2016).

Materiali

- Ibuprofene - Soluzione stock (s.s.) – IBU – (Sigma-Aldrich I4883)
 - Furosemide – Soluzione stock (s.s.) – FUR – (Sigma-Aldrich F4381)
 - Trimethoprim – Soluzione stock (s.s.) e soluzione stock diluita (s.s.d.) – TMP – (Sigma-Aldrich 92131)
 - Sucralosio - SUC - (Sigma-Aldrich 69293)
 - Tonalide - TON - (Sigma-Aldrich W526401)
 - Triclocarban – Soluzione stock concentrata (s.s.c.) e soluzione stock di lavoro (s.s.l.) – TCC – (Sigma-Aldrich 105937)
 - Boscalid - BOS - (Sigma-Aldrich 33875)
 - Captan - CAP - (Sigma-Aldrich 32054)
 - Chlorpyrifos - CHL - (Sigma-Aldrich 45395)
 - Metolachlor - MET - (Sigma-Aldrich 36163)
 - Terbutilazina - TER - (Sigma-Aldrich 45678)
 - DMSO
 - Acetone
 - pHmetro (TIM860 Titration manager, TitraLab, Radiometer analytical)
 - NaOH, 1M
 - HCl, 1M
 - Micropipettatori manuali (0.5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L, 500-5000 μ L)
 - Flacons 100 ML
 - Aeratori a più vie (M2K3 350 L/h, SCHEGO®)
 - Incubatori a celle di Peltier (IPP 110 plus, Memmert®)
 - Rack in resina acrilica personalizzati per flaconi 100 ML
 - Acqua ricostituita soft-medium (Holdway, 2005)
- Composizione acqua ricostituita soft-medium:
- NaHCO₃ 82 mg/L
 - CaSO₄ 2H₂O 51 mg/L
 - MgSO₄ 51 mg/L
 - KCl 3.5 mg/L

La composizione dell'acqua ricostituita è stata ottenuta da (Holdway, 2005) e adattata alla conducibilità media e al pH dei siti di campionamento. L'acqua ricostituita è stata quindi impiegata per la preparazione delle soluzioni delle sostanze da esaminare, per i controlli negativi, e nella fase di acclimatamento delle larve prima dell'esposizione alle molecole testate. Il pH è stato corretto con NaOH 1 M oppure HCl 1 M, facendo riferimento alle condizioni ambientali.

Letteratura di riferimento per la scelta delle concentrazioni

I dati ecotossicologici presenti in letteratura su invertebrati acquatici, riferiti alle molecole considerate, utilizzati per la scelta delle concentrazioni a cui esporre gli animali sono in Tabella 46. I dati sulle concentrazioni ambientali EC (= environmental concentrations) sono stati forniti dall'Università di Trento a inizio progetto (gennaio 2016).

Tabella 46 – Contaminante, Parametro di tossicità. Concentrazioni ambientali (AC) misurate nei siti di campionamento: *da Mandaric et al. (2017), in PTv; **Predicted Environmental Concentration (PEC_{sw}) (WP1); °Measured Environmental Concentration in PTv (WP1);

†Measured Environmental Concentration in TP_up (WP1); °Measured Environmental Concentration in PR0 (IWP1); ⁽¹⁾ Pascoe et al., 2003; ⁽²⁾ Pounds et al., 2008; ⁽³⁾ Quinn et al., 2008; ⁽⁴⁾ De Liguoro et al., 2009; ⁽⁵⁾ Tamura et al., 2013; ⁽⁶⁾ Wiklund et al., 2012; ⁽⁷⁾ Grützner, 1995; ⁽⁸⁾ Bundschuh et al., 2016; ⁽⁹⁾ Kamrin, 2000; ⁽¹⁰⁾ Ankley et al., 1994; ⁽¹¹⁾ Mayer and Ellersieck, 1986; ⁽¹²⁾ Marchini et al., 1988).

	Parametro di tossicità (tempo) da letteratura		Concentrazione ambientale (CA)	Range di concentrazioni sperimentali (C)	Cmin/AC	Cmax/AC
Furosemide	>100 mg/L (EC50, 48h)	⁽¹⁾ (<i>Hydra vulgaris</i>)	*359 ng/L	1-500 mg/L	2786	1392758
Ibuprofen	20 mg/L (LC50, 72h)	⁽²⁾ (<i>Planorbis carinatus</i>)	°619 ng/L; †327 ng/L	1-100 mg/L	1616	161551
	25 mg/L (LC50, 96h)	⁽³⁾ (<i>Hydra attenuata</i>)				
Trimethoprim	150 mg/L (EC50, 48h)	⁽⁴⁾ (<i>Daphnia magna</i>)	*176 ng/L	0.001-400 mg/L	6	2272727
Triclocarban	10 µg/L (EC50, 48h)	⁽⁵⁾ (<i>Daphnia magna</i>)	** 105 ng/L	1-100 µg/L	10	952
Sucralose	> 10 g/L (LC50, 96h)	⁽⁶⁾ (<i>Nitocra spinipes</i>)	°600 µg/L	42.7 g/L	-	71167
Tonalid	0.2 mg/L (EC50, 21d)	⁽⁷⁾ (<i>Daphnia magna</i>)	**209.3 ng/L	100 mg/L	-	477783
Boscalid	50 µg/L (LC50, 48h)	⁽⁸⁾ (<i>Daphnia magna</i>)	**5.32 µg/L	5-500 µg/L	1	94
Captan	7-10 mg/L (LC50, 96h)	⁽⁹⁾ (<i>Daphnia magna</i>)	**38.7 µg/L	1-150 mg/L	3	388
Chlorpyrifos	0.5 µg/L (LC50, 96h)	⁽¹⁰⁾ (<i>Chironomus tentans</i>)	°°6.83 ng/L	0.5-100 µg/L	732	14641
Metolachlor	3.8 mg/L (EC50, 48h)	⁽¹¹⁾ (<i>Chironomus plumosus</i>)	°°4.62 ng/L	2.5-250 mg/L	541126	54112554
Terbutylazine	>5 mg/L (EC50, 48h)	⁽¹²⁾ (<i>Daphnia magna</i>)	°°1.5 ng/L	10-25 mg/L	6666667	16666667

Per ciascuna molecola sono state selezionate da cinque a sette differenti concentrazioni, oltre ad un controllo (C = 0 mg/L). Concentrazioni di tossico crescenti sono indicate da C1 a Cmax, mentre il controllo (preparato con il solvente) è indicato con C. Le concentrazioni sono state scelte in modo tale da averne almeno una inferiore e due più elevate della LC50 teorica, ricavata dai dati in letteratura.

Il numero di replicati eseguiti è compreso tra 1 e 3 per ciascuna concentrazione, in base alla quantità di animali disponibili. Il numero di animali per replica è invece compreso tra 1 e 5, in base al ruolo trofico (un esemplare nel caso dei predatori), alla disponibilità (un esemplare nel caso di specie rare), e alla massa corporea (un esemplare se il peso è superiore a 5 mg).

La durata di ciascun test è compresa tra 24 e 96 ore, valutata in base al tasso di mortalità rilevato ogni 24 ore. Qualora tutte le larve fossero state rinvenute vive dopo 96 ore, il test è stato arrestato. Sono state considerate vive le larve capaci di movimento autonomo, sofferenti le larve immobili ma in grado di reagire a stimolazione tattile. Per i chironomidi si è preso nota sul numero di pupe rinvenute nel corso dell'esperimento, come effetto sul metabolismo/pupazione.

Preparazione delle soluzioni

Alcune delle sostanze tossiche studiate sono poco solubili in acqua ad una o più delle concentrazioni scelte per gli esperimenti. Per ovviare al problema è stato selezionato come carrier il DMSO, per tonalide è stato usato l'acetone in cui sono state disciolte le sostanze pure poi aliquotate e diluite in acqua ricostituita. Il pH è stato corretto con soluzioni di NaOH 1M e HCl 1M per portare il pH delle soluzioni al valore ambientale (pH= 7,7). Il contenuto finale di DMSO nelle soluzioni non ha mai superato il 2% v/v per evitare effetti nocivi sugli animali (Dong et al. 2013).

Ibuprofene - IBU - (Sigma-Aldrich I4883)

Soluzione stock: 25 mg m/L, in DMSO

- pKa: 4.91
- Peso molecolare (base libera): 206,28082 g mo/L
- Solubilità in acqua (base libera): 21 mg/L

Soluzioni testate (Tabella 47) (volume finale: 50 mL, pH 7,7):

Tabella 47 - Etichetta campione, concentrazione tossico, quantità tossico per campione, volume di stock impiegato per campione. * = LC50 teorico a 48h, 72h, 96h (Dong et al. 2013).

Concentrazione	mg/L	Massa disciolta	Volume stock
C	0	0 mg	Controllo negativo
C1	1	0,05 mg	2 µL
C2	10	0,5 mg	20 µL
C3	25*	1,25 mg	50 µL
C4	50	2,5 mg	100 µL
C5	100	5 mg	200 µL

Furosemide - FUR - (Sigma-Aldrich F4381)

Soluzione stock: 25 mg m/L, in DMSO

- Peso molecolare (base libera): 330,74 g mo/L
- Solubilità in DMSO: 66 mg m/L a 25 °C

Il furosemide è praticamente insolubile in acqua, ed è quindi stato utilizzato come carrier il DMSO.

Soluzioni testate (

Tabella 48) (volume finale: 50 mL, pH 7.7):

Tabella 48 - Etichetta campione, concentrazione tossico, quantità tossico per campione, volume di stock impiegato per campione. LC50 teorico a 48h = 130 mg/L (Quinn et al. 2008).

Concentrazione	mg/L	Massa disciolta	Volume stock
C	0	0 mg	Controllo negativo
C1	1	0,05 mg	2 μ L
C2	10	0,5 mg	20 μ L
C3	25	1,25 mg	50 μ L
C4	50	2,5 mg	100 μ L
C5	100	5 mg	200 μ L
C6	250	12,5 mg	500 μ L
C7	500	25 mg	1 mL

Trimethoprim - TMP - (Sigma-Aldrich 92131)

Soluzione stock: 50 mg m/L, in DMSO

- pKa: 6,6
- Peso molecolare (base libera): 290,32 g mo/L
- Solubilità in acqua (base libera): 0,4 mg/L

Soluzioni testate (Tabella 49) (volume finale: 50 mL, pH 7,7):

Tabella 49 - Etichetta campione, concentrazione tossico, quantità tossico per campione, volume di stock impiegato per campione. * = LC50 teoria a 48h (Pascoe et al. 2003)

Concentration	mg/L	Container	Stock solution
C	0	0 mg	Controllo negativo
C1	1	0,05 mg	1 μ L
C2	10	0,5 mg	10 μ L
C3	50	2,5 mg	50 μ L
C4	100	5 mg	100 μ L
C5	150*	7,5 mg	150 μ L
C6	200	10 mg	200 μ L
C7	400	20 mg	400 μ L

Sucralosio - SUC - (Sigma-Aldrich 69293)

- Peso molecolare (base libera): 397,626 g/mol
- Solubilità in acqua: $2.27 \cdot 10^4$ mg/L a 25 °C

Soluzioni testate (Tabella 50) (volume finale: 50 mL, pH 7.7):

Tabella 50 - Etichetta campione, concentrazione tossico, quantità tossico per campione, volume di stock impiegato per campione. * = LC50 teorico a 96h > 10000 mg/L (Wiklund et al. 2012)

Concentrazione	mg/L	Massa disciolta	Volume stock
C	0	0 mg	Controllo
C1	42727*	2136,35 mg	N.D.

Tonalide - TON - (Sigma-Aldrich W526401)

Soluzione stock: 200 mg mL, in acetone

- Peso molecolare (base libera): 258,405 g/mol
- Solubilità in acqua: 1,25 mg/L

Soluzioni testate (Tabella 51) (volume finale: 50 mL, pH 7,7):

Tabella 51 - Etichetta campione, concentrazione tossico, quantità tossico per campione, volume di stock impiegato per campione. In quanto gli unici dati reperiti in letteratura si riferivano ad EC50 21d, si è deciso di optare per una soluzione più concentrata vicina al limite di solubilità del composto.

Concentrazione	mg/L	Massa	Volume stock
C	0	0 mg	Controllo
C1	100	5 mg	25 µL

Triclocarban - TCC - (Sigma-Aldrich 105937)

Soluzione stock: 20 µg/mL, in DMSO

- Peso molecolare (base libera): 315,58 g/mol
- Solubilità in acqua (base libera): $2,37 \cdot 10^{-3}$ mg/L

Soluzioni testate (Tabella 52) (volume finale: 50 mL, pH 7,7):

Tabella 52 - Etichetta campione, concentrazione tossico, quantità tossico per campione, volume di stock impiegato per campione. * = LC50 teorico a 48h (Kim et al. 2007; De Liguoro et al. 2009).

Concentration	µL/L	Container	Stock
C	0	0 µg	Controllo

	Concentration $\mu\text{L/L}$	Container	Stock
C1	1	0,05 μg	2,5 μL
C2	5	0,25 μg	12,5 μL
C3	10*	0,5 μg	25 μL
C4	25	1.25 μg	62.5 μL
C5	50	2,5 μg	125 μL
C6	100	5 μg	250 μL

Boscalid - BOS - (Sigma-Aldrich 33875)

Soluzione stock: 250 $\mu\text{g m/L}$, in DMSO

- Peso molecolare (base libera): 343,207 g/mol
- Solubilità in acqua: 4,6 mg/L a 20 °C

Soluzioni testate (Tabella 53) (volume finale: 50 mL, pH 7,7):

Tabella 53 - Etichetta campione, concentrazione tossico, quantità tossico per campione, volume di stock impiegato per campione. * = Tossicità acuta teorica (Bundschuh 2016).

	Concentrazione $\mu\text{g/L}$	Massa	Volume stock
C	0	0 μg	Controllo
C1	5	0,25 μg	1 μL
C2	10	05 μg	2 μL
C3	50*	2,5 μg	10 μL
C4	100	5 mg	20 μL
C5	500	25 μg	100 μL

Captan - CAP - (Sigma-Aldrich 32054)

Soluzione stock: 10 mg m/L, in DMSO

- Peso molecolare (base libera): 300,578 g/mol
- Solubilità in acqua: 5,1 mg/L a 25 °C

Soluzioni testate (

Tabella 54) (volume finale: 50 mL, pH 7,7):

Tabella 54 - Etichetta campione, concentrazione tossico, quantità tossico per campione, volume di stock impiegato per campione. * = LC50 teorica (Kamrin 1997).

Concentrazione	mg/L	Massa	Volume stock
C	0	0 mg	Controllo
C1	1	0,05 mg	5 µL
C2	10*	0,5 mg	50 µL
C3	25	1,25 mg	125 µL
C4	100	5 mg	500 µL
C5	150	7,5 mg	750 µL

Chlorpyrifos - CHL - (Sigma-Aldrich 45395)

Soluzione stock: 5 µg/mL, in DMSO

- Peso molecolare (base libera): 350,575 g/mol
- Solubilità in acqua: 5,0 mg/L a 20 °C

Soluzioni testate (Tabella 55) (volume finale: 50 mL, pH 7,7):

Tabella 55 - Etichetta campione, concentrazione tossico, quantità tossico per campione, volume di stock impiegato per campione. * = LC50 teorica a 24h (Kersting 1992).

Concentrazione	µg/L	Massa	Volume stock
C	0	0 µg	Controllo
C1	0.5	0.025 µg	5 µL
C2	5*	0.25 µg	50 µL
C3	10	0.5 µg	100 µL
C4	50	2.5 µg	500 µL
C5	100	5 µg	1000 µL

Metolachlor - MET - (Sigma-Aldrich 36163)

Soluzione stock: 10 mg/mL, in DMSO

- Peso molecolare (base libera): 283,796 g/mol
- Solubilità in acqua: 530 mg/L a 20 °C

Soluzioni testate (

Tabella 56) (volume finale: 50 mL, pH 7,7):

Tabella 56 - Etichetta campione, concentrazione tossico, quantità tossico per campione, volume di stock impiegato per campione. * = EC50 teorica (USEPA/OPP 2000).

Concentrazione	mg/L	Massa	Volume stock
C	0	0 mg	Controllo
C1	2.5	0,125 mg	12,5 µL
C2	10	0,5 mg	50 µL
C3	25*	1,25 mg	125 µL
C4	100	5 mg	500 µL
C5	250	12,5 mg	1250 µL

Terbutilazina - TER - (Sigma-Aldrich 45678)

Soluzione stock: 50 mg mL⁻¹, in DMSO

- Peso molecolare (base libera): 229,712 g/mol
- Solubilità in acqua: 5,0 mg/L a 20 °C

Soluzioni testate (Tabella 57) (volume finale: 50 mL, pH 7,7):

Tabella 57 - Etichetta campione, concentrazione tossico, quantità tossico per campione, volume di stock impiegato per campione. EC50 teorica a 48h = 21.2 mg/L (USEPA/OPP 2000).

Concentrazione	mg/L	Massa	Volume stock
C	0	0 mg	Controllo
C1	10	0,5 mg	10 µL
C2	25	1,25 mg	25 µL

Ogni campione è stato dotato di etichetta di riconoscimento, contenente le principali informazioni riguardanti l'esperimento, secondo lo schema qui sotto riportato:

Esperimento n° - Specie testata - Sito di campionamento - Molecola testata

Condizioni di esposizione

Le larve raccolte sono state acclimatate in cella termostata per 24 ore alle condizioni di laboratorio di esposizione al tossico, in acqua ricostituita, alla temperatura dell'acqua dei siti di raccolta (PT e ML in inverno: $5 \pm 1^\circ\text{C}$; PT e ML in estate: $10^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$; PR0 in estate: $2 \pm 1^\circ\text{C}$), al buio, con aeratore per mantenere l'ossigenazione prossima alla saturazione (100%). Allo scadere delle 24 ore gli animali sono stati trasferiti alle diverse concentrazioni dei tossici in contenitori da 100 mL contenenti ciascuno 50 mL di soluzione. I test sono stati condotti in cella termostata alla stessa temperatura di acclimatazione, al buio, con aeratore (uno per ogni contenitore). Come già anticipato sopra, ogni 24h le larve che si muovevano spontaneamente sono state considerate

attive, mentre quelle che si muovevano solamente in seguito ad uno stimolo tattile sono state considerate sofferenti (il totale di larve vive è stato considerato come somma di larve attive e larve sofferenti). Le larve immobili sono state considerate morte. Gli animali vivi di ciascun contenitore sono stati congelati a -80 °C ritenendoli campioni studiabili in futuro con approcci molecolari.

Nei test di tossicità acuta l'errore è minimizzato qualora si abbiano almeno due esperimenti in cui il rapporto tra animali vivi e morti è superiore a 0,5 ed un esperimento con un rapporto al di sotto di questo valore. Qualora non fossero raggiunte le condizioni che consentivano di minimizzare l'errore gli esperimenti sono stati prolungati da un minimo di 24 ore fino ad un massimo 96 ore, oltre le quali per le larve sarebbero subentrati ulteriori fattori di stress che avrebbero potuto alterare i dati ottenuti. Oltre alla valutazione dello stato vitale degli animali, ogni 24 ore venivano contestualmente rinnovate le soluzioni.

Analisi dei dati

È stato usato uno script in linguaggio R per modellare i risultati dei test di tossicità acuta su una distribuzione di tipo Weibull (Tabella 58). I dati in input sono stati divisi in due colonne, concentrazione del tossico (C) e le corrispondenti mortalità delle larve (E). Lo script genera sia un grafico della distribuzione che un file di testo, contenente i valori stimati di LC da 1 a 100. I valori di LC10 sono stati utilizzati come concentrazioni di tossico per gli esperimenti di Comet assay.

Nei casi in cui, dopo 96h di esposizione tutte le larve sono risultate vive la concentrazione più elevata del tossico ("Cmax") è stata considerata come NOEC ("No Observed Effect Concentration"). Nel caso in cui, dopo 96h di esposizione, il numero dei morti è risultato inferiore al 50% del numero totale di larve esposte, è stata calcolata una LCx dove x= N. morti osservati dopo 96h alla Cmax/N. totale animali trattati. Infine, nel caso in cui dopo 96h, tutte le larve sono risultate vive ma in parte sofferenti e/o impupate (nel caso dei Chironomidi), la Cmaxc è stata definita come LOEC ("Lowest Observed Effect Concentration").

I test non sono stati ripetuti a concentrazioni più elevate in quanto Cmax corrispondeva ai limiti massimi di solubilità delle molecole in acqua e/o era pari fino a 50 milioni di volte (es. nel caso del metholaclor) la concentrazione ambientale.

Tabella 58- Script R per il calcolo dei parametri tossicologici e generazione curve di Weibull.

```
library(drc)
# EMF library
#library(devEMF)
filename<-file.choose()
txtfilename <- paste(filename,"acutetox.txt",sep="_")
# PDF plot output filename
picfilename <- paste(filename,"acutetox.pdf",sep="_")
# EMF plot output filename
#picfilename <- paste(filename,"acutetox.emf",sep="_")
ToxicityTest<-read.csv(filename,header=TRUE)
sink(txtfilename, append = FALSE)
ToxicityTest
ToxicityTest.m1 <- drm(E ~ C, data = ToxicityTest, fct =
W2.2())
```

```

summary(ToxicityTest.m1)
confint(ToxicityTest.m1)
## Comparing models (showing the AIC values)
mselect(ToxicityTest.m1,
list(W1.20, W1.30, W1.40, W2.30, W2.40, L.30, L.40,
L.50, LL.20, LL.30, LL.40, LL.50, LN.20, LN.30, LN.40))
ED(ToxicityTest.m1,c(1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50,
55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99), interval="delta")
modelFit(ToxicityTest.m1)
print("Enter plot title: ")
plottitle<-readline()
# PDF plot output
pdf(picfilename, width = 12, height = 8)
# EMF plot output
#emf(picfilename, width = 12, height = 8)
# Concentration in milligrams per liter
plot(ToxicityTest.m1, broken=TRUE, xlab="conc.
(mg/L)",main=plottitle, ylab="Relative Mortality (0-1)",
lwd=2,cex=1.2, cex.axis=1.2, cex.lab=1.2, type="all",
ylim=c(0,1), xlim=c(0,1000))
plot(ToxicityTest.m1, add=TRUE, xlab="Conc (mg/L)",
ylab="Inhibition (%)", lwd=2,cex=1.2, cex.axis=1.2,
cex.lab=1.2, type="confidence",ylim=c(0,1), xlim=c(0,1000))
# Concentration in micrograms per liter
#plot(ToxicityTest.m1, broken=TRUE,
xlab=expression(paste("conc. (" ,mu,"g/L)")),main=plottitle,
ylab="Relative Mortality (0-1)", lwd=2,cex=1.2, cex.axis=1.2,
cex.lab=1.2, type="all", ylim=c(0,1), xlim=c(0,1000))
#plot(ToxicityTest.m1, add=TRUE, xlab=expression(paste("conc.
(" ,mu,"g/L)")), ylab="Inhibition (%)", lwd=2,cex=1.2,
cex.axis=1.2, cex.lab=1.2, type="confidence",ylim=c(0,1),
xlim=c(0,1000))
abline(h=0.5, lty=3)
abline(h=0.1, lty=3)
dev.off()

```

Risultati

Stagione invernale

La Tabella 36 riassume i test di tossicità acuta effettuati nella stagione invernale. *Diamesa cinerella* e *Pseudodiamesa branickii* sono state trovate esclusivamente presso i siti di indagine PTm e PTv, mentre *Baetis rhodani* in abbondanza maggiore nel sito ML. *Baetis alpinus* è risultato abbondante sia in PTm che PTv mentre di difficile reperimento in ML: per questa ragione è stato testato solo nei confronti di una molecola, ibuprofene. Per la medesima ragione le *Rhyacophila* spp. di tutti i siti e i Perlodidae (*Dictyogenus alpinus* di PTv, *D. alpinus* e *Perloides intricatus* di PTm) sono stati esposti solamente a una (ibuprofene) o due (ibuprofene e furosemide) molecole. Le curve di sopravvivenza, le distribuzioni di Weibull ed i relativi parametri statistici sono riportati in Appendice 1. I valori di LC10 sono stati stimati per tutte le specie, con le sole eccezioni di *D. cinerella*, esposta a 4 molecole, e *P. branickii*, esposta a TMP, TCC e IBU (quest'ultima soltanto

per il sito PTv). In questi casi tutte le larve sono risultate vive (talvolta con segnali di sofferenza o pupazione) o hanno presentato un basso tasso di mortalità. Per *D. cinerella*, la LCx è stata calcolata per IBU (LC7) e TCC (LC13) del sito PTm, mentre le LOEC sono state osservate per FUR e TMP. Per la stazione PTv non è stato osservato alcun effetto per IBU, mentre alcuni effetti non letali sono stati riscontrati per FUR (LOEC); TMP (LC7) e TCC (LC33) hanno avuto un'effetto sulla sopravvivenza. Con *P. branickii* sono state osservate NOEC per IBU (PTv), TMP (PTv) e TCC (PTm e PTv), mentre la LOEC è stata osservata per TMP in PTm. I parametri tossicologici sono riportati nella Tabella 59.

Tabella 59 – Specie utilizzata, sostanza testata, sito di indagine, parametro tossicologico, concentrazione, tempo di esposizione e parametro tossicologico teorico per test di tossicità acuta effettuati nella stagione invernale. Note in tabella: *1 in questo esperimento la concentrazione massima utilizzata è stata di 100 mg/L *2 comet eseguito alla conc massima di 10 in quanto non più rinvenuti esemplari per ripetere prova a LC10 calcolata.

Specie	Sostanza	Stazione	P. tossicologico	Tempo	Concentrazione	P. tossicologico teorico (t)
<i>Diamesa cinerella</i>	Ibuprofene	PTm	LC7 calcolata	96h	100 mg/L	25 mg/L (LC50 24h, 72h, 96h)
		PTv	NOEC	96h	100 mg/L	
	Furosemide	PTm	NOEC	96h	500 mg/L	130 mg/L (LC50 48h)
		PTv	NOEC	96h	500 mg/L	
	Trimethoprim	PTm	NOEC	96h	400 mg/L	150 mg/L (LC50 48h)
		PTv	LC7 calcolata	96h	400 mg/L	
<i>Baetis alpinus</i>	Ibuprofene	PTm	LC10	24h	14,80 mg/L	25 mg/L (LC50 24h, 72h, 96h)
			LC50	24h	30,26 mg/L	
		PTv	LC10	24h	14,04 mg/L	
			LC50	24h	41,14 mg/L	
		ML	LC10	24h	10,07 mg/L	
	Furosemide	PTm	LC10	72h	36,14 mg/L	130 mg/L (LC50 48h)
			LC50	72h	94,81 mg/L	
		PTv	LC10	72h	41,91 mg/L	
	Trimethoprim	PTm	LC10	48h	106,15 mg/L	150 mg/L (LC50 48h)
			LC50	48h	143,45 mg/L	
		PTv	LC10	48h	38,38 mg/L	
	Triclocarban	PTm	LC10	48h	187,84 mg/L	10 µg/L (EC50 48h)
			LC50	48h	2,88 µg/L	
		PTv	LC10	48h	84,26 µg/L	
<i>Baetis rhodani</i>	Ibuprofene	ML	LC10	48h	0,57 µg/L	10 µg/L (EC50 48h)
			LC50	48h	39,91 µg/L	
	Furosemide	ML	LC10	48h	18,17 mg/L	25 mg/L (LC50 24h, 72h, 96h)
			LC50	48h	36,44 mg/L	
	Trimethoprim	ML	LC10	48h	36,09 mg/L	130 mg/L (LC50 48h)
			LC50	48h	197,54 mg/L	
	Triclocarban	ML	LC10	96h	15 mg/L	150 mg/L (LC50 48h)
			LC50	96h	606,80 mg/L	
<i>Pseudodiamesa branickii</i>	Ibuprofene	PTm	LC10	48h	28,82 µg/L	10 µg/L (EC50 48h)
			LC50	96h	107,98 µg/L	
	Furosemide	PTm	LC10	48h	25,34 mg/L	25 mg/L (LC50 24h, 72h, 96h)
			LC50	48h	73,13 mg/L	
		PTv	NOEC	96h	100 mg/L	
			LC10	72h	138,33 mg/L	
	Trimethoprim	PTm	LC10	72h	1366,05 mg/L	130 mg/L (LC50 48h)
			LC50	72h	256,91 mg/L	
		PTv	LC10	72h	1726,99 mg/L	
	Triclocarban	PTm	NOEC	96h	400 mg/L	150 mg/L (LC50 48h)
			NOEC	96h	400 mg/L	
<i>Perlodes intricatus</i>	Ibuprofene	PTm	LC10 calcolata	24h	16,32 mg/L	25 mg/L (LC50 24h, 72h, 96h)
			NOEC	96h	100 mg/L ^{*1}	
	Furosemide	PTv	NOEC	96h	100 mg/L ^{*1}	130 mg/L (LC50 48h)
<i>Dictyogenus alpinus</i>	Ibuprofene	PTm	LC10 calcolata	24h	16,32 mg/L ^{*2}	25 mg/L (LC50 24h, 72h, 96h)
			NOEC	24h	100 mg/L	
<i>Rhyacophila occidentalis</i>	Ibuprofene	PTm	LC10	24h	27,68 mg/L	25 mg/L (LC50 24h, 72h, 96h)
			LC50	24h	75,90 mg/L	
		PTv	NOEC	24h	100 mg/L	
	Furosemide	PTm	NOEC	96h	100 mg/L	130 mg/L (LC50 48h)
			NOEC	96h	500 mg/L	
		PTv	NOEC	96h	500 mg/L	

Risposte per sostanze

Ibuprofene

Il valore di LC10 stimato è compreso tra 10,7 mg/L (24h, *B. alpinus*, ML) e 27,68 mg/L (24h, *R. occidentalis*, PTm). In generale sono state stimate più LC10 nel sito PTm rispetto al sito a valle. La sola specie per cui è stato possibile determinare l'LC10 in ogni sito di campionamento è *B. alpinus*, nonché la più sensibile a questa molecola, con valori di 14,80 mg/L (24h) per PTm, 14,04 mg/L (24h) per PTv e 10,07 mg/L (24h) per ML. Per quanto riguarda *D. alpinus*, *P. branickii* e *R. occidentalis*, si sono invece determinate l'LC10 per PTm e delle NOEC/LOEC per ML, a causa della maggiore tolleranza a questa molecola. I valori stimati di LC50 variano considerevolmente rispetto all'LC50 teorica (25 mg/L a 48h, 72h, 96h) trovati in letteratura. I valori ottenuti per *D. alpinus* sono inferiori per il sito PTm, come per *P. intricatus*, mentre per *B. alpinus* risulta quasi identico all'LC50 teorico per il sito ML (25,28 mg/L), aumentando leggermente per i siti PTm e PTv. Anche i valori calcolati per *P. branickii* e *R. occidentalis* risultano più elevati, mentre *B. rhodani* presenta il valore più alto, pari a 197,54 mg/L. Con la sola eccezione di *P. branickii* (48h), tutte le specie testate presentano un tempo di esposizione inferiore rispetto a quello trovato in letteratura per le LC50 teoriche.

Furosemide

Le LC10 stimate sono comprese tra 36,09 mg/L (72h, *B. rhodani*, ML) e 256,91 mg/L (72h, *P. branickii*, PTv). Nei siti di PT le LC10 sono state stimate solo per *B. alpinus* e *P. branickii* e risultano crescenti da PTm a PTv. Con l'eccezione di *B. alpinus* di PTm, le concentrazioni di LC50 stimate risultano superiori al valore teorico di riferimento (130 mg/L). *P. branickii* PTv è risultata la specie più resistente tra quelle suscettibili, ed il valore stimato risulta dieci volte superiore all'LC50 teorica.

Trimethoprim

Le LC10 stimate sono comprese tra 15 mg/L (96h, *B. rhodani*, ML) e 106,25 mg/L (72h, *B. alpinus*, PTm). Anche se *B. alpinus* PTm presenta l'LC10 più elevata, la sua LC50 è risultata inferiore all'LC50 teorica (150 mg/L).

Triclocarban

I valori stimati di LC10 variano da 0,57 µg/L (48h, *B. alpinus*, PTv) a 28,82 µg/L (96h, *B. rhodani*, ML). L'LC10 di *B. alpinus* per PTm risulta superiore a quella stimata per PTv, ma entrambi i valori risultano di molto inferiori a quelli ottenuti per *B. rhodani* ML. In questo caso, a differenza degli altri composti testati, tutte le LC50 stimate sono risultate superiori all'LC50 teorica (10 µg/L).

Risposte per specie

Baetis alpinus

Per il sito di indagine PTm, gli effetti tossici del furosemide sono stati evidenziati già a 24h con concentrazioni superiori a 100 mg/L. Tra le larve sopravvissute, è stata osservata sofferenza a partire dai 50 mg/L, con sola eccezione della prova a 48h. Il trimethoprim ha stressato le larve (20% sofferenti) a partire da 200 mg/L a 24h, mentre per la prova a 48h lo stress si è manifestato a 100 mg/L (13% sofferenti). Un basso livello di stress è stato osservato anche per triclocarban durante l'esposizione all'LC10 (6% sofferenti al di sopra di 25 µg/L); solamente nel controllo (0 µg/L) tutti gli esemplari sono sopravvissuti.

Una moderata percentuale di sofferenti (33%) è stata osservata per ibuprofene per il sito PTv già ad una concentrazione di 1 mg/L. Per quanto riguarda questa stazione, il furosemide ha presentato capacità di stress a 25 mg/L a 48h, diminuendo assieme alla percentuale di sopravvissuti a 72h. L'esposizione a trimethoprim ha indotto sofferenza solamente a 50 mg/L (a 24h e 48h). Come per il sito a monte, sono state ritrovate larve morte a tutte le concentrazioni di triclocarban, mentre una percentuale di sofferenza è stata osservata solamente alla concentrazione Cmax (100 µg/L).

Presso il sito ML, le larve hanno presentato sofferenza con concentrazioni di ibuprofene superiori a 10 mg/L e solamente nel controllo (0 mg/L) è stata mantenuta la sopravvivenza di tutti gli esemplari.

Baetis rhodani

Per ibuprofene, il trend di sofferenza risulta crescente con concentrazioni superiori a 10 mg/L a 24h, ma non compare a 48h. Una simile tendenza è stata osservata nelle prove con furosemide, con sofferenza a 50 mg/L, 24h. Non è stata osservata sofferenza per le esposizioni a trimethoprim. Basse percentuali di sofferenza sono state registrate per triclocarban a 1 µg/L (48h, 72h, 96h), 10 µg/L (72h) e 100 µg/L (72h 96h), con percentuali mai superiori al 10%.

Dictyogenus alpinus

Con l'esposizione ad ibuprofene sono state osservate larve morte a concentrazioni superiori a 10 mg/L per il sito PTm, mentre per il sito a valle PTv è stata determinata una NOEC.

Perlodes intricatus

Sono state ritrovate larve morte dopo l'esposizione ad ibuprofene con concentrazioni superiori a 10 mg/L, ma nessun effetto è stato riscontrato con furosemide. Tutte le larve utilizzate provenivano dal sito PTm.

Diamesa cinerella

Presso il sito PTm, è stata evidenziata sofferenza con ibuprofene con concentrazioni di 50 mg/L a 48h, mentre erano presenti morti per concentrazioni di 10 e 100 mg/L a 72h.

Con la sola eccezione del controllo, la pupazione era presente a 96h con percentuali più elevate nelle basse concentrazioni (27% a 1 e 10 mg/L, contro il 13% per 25, 50 e 100 mg/L). Simili tassi di mortalità e sofferenza sono stati osservati nelle prove con furosemide. La percentuale di pupazione era compresa tra il 13% ed il 31% fino a 100 mg/L, con drastico incremento a concentrazioni superiori a 250 mg/L (66% e 60%). Nei test con triclocarban il tasso di sofferenti è risultato crescere a partire dai 10 µg/L con tempi pari a 72h e 96h, presentando un picco a 50 µg/L; questo valore è calato a 0% raggiunti i 100 µg/L. La percentuale di pupazione non ha superato il 7% fino a 72h (sia a 10 µg/L che a 50 µg/L), raggiungendo il 60% a 100 µg/L. Non sono stati osservati morti fino a 25 µg/L, 72h. Il trimethoprim non ha invece mostrato effetti su mobilità, metabolismo e pupazione.

Con le eccezioni di furosemide a 96h e triclocarban a 96h, nessun effetto aggiuntivo è stato osservato sui campioni del sito PTv. Il picco di pupazione per furosemide è stato misurato a 500 mg/L (54%). I trend per quanto riguarda sopravvivenza e sofferenza sono invece invariati. Per quanto concerne le esposizioni a triclocarban sono stati osservati morti a concentrazioni superiori a 50 µg/L, mentre la pupazione risultava più elevata nel controllo (27%) con una sofferenza rilevabile a partire da 50 µg/L di molecola.

Pseudodiamesa branickii

Nei test con ibuprofene per il sito PTm sono state osservati esemplari sofferenti a partire da 10 mg/L a 24h. Questo valore cala a 0% a 48h, con la sola eccezione delle prove a 50 mg/L. Escludendo le prove con 25 mg/L, con prove di durata pari o superiore a 72h si sono verificati fenomeni di cannibalismo. Nelle prove con furosemide si è rilevata sofferenza per concentrazioni superiori a 25 mg/L, 72h, con un picco a 50 mg/L. Un singolo stadio pupale è stato osservato a 50 mg/L, 72h. La pupazione non è invece stata osservata per animali esposti a trimethoprim, che hanno invece mostrato sofferenza a partire da 200 mg/L s 48h (27%), mantenendo questo valore anche a 96h. Nessun effetto di sofferenza o pupazione è stato osservato in triclocarban.

Le larve di PTv esposte ad ibuprofene non hanno mostrato differenze rilevabili di mobilità, pupazione o metabolismo, con l'eccezione di una lieve sofferenza a 25 mg/L a 24h. Con furosemide si è osservata sofferenza da 50 mg/L a 24h, andata calando fino a 100 mg/L a 72h. Le esposizioni a trimethoprim non hanno mostrato sofferenza, bensì pupazione (24h) e mortalità (72h) a concentrazioni di 100 mg/L. Con la sola eccezione di una lieve mortalità a 1 µg/L triclocarban non ha invece prodotto effetti osservabili.

Rhyacophila occidentalis

Per il sito PTm le esposizioni ad ibuprofene hanno mostrato sofferenza a partire da 10 mg/L (67%), decrementando a 0% con 50 mg/L. In questa stazione non è stato riscontrato alcun effetto per furosemide 24h e 48h (con la sola eccezione della prova con 50 mg/L).

Nella stazione PTv è stato testato ibuprofene solamente a 24h, osservando unicamente mortalità a 1 mg/L, senza ulteriori effetti rilevabili.

Nel sito ML tutti gli esemplari esposti ad ibuprofene sono sopravvissuti, pur risultando stressati a 1 mg/L a 96h e a concentrazioni maggiori di 25 mg/L a 72h. Il furosemide non ha presentato effetti su mobilità o metabolismo.

Stagione estiva

La Tabella 36 riassume i test di tossicità acuta effettuati nella stagione estiva. La maggior parte delle prove di tossicità sono state condotte sulla specie dominante in PR0, *Diamesa zernyi*. Su *Diamesa latitarsis*, trovata con pochi esemplari, sono state testate solo due molecole. Per le altre tre specie, le prove con sucralosio hanno completato i test iniziati nel periodo invernale del 2016.

I valori delle LC10 e LC50 sono stati stimati per tre sostanze (captan, chlorpyrifos e metolachlor) in *D. zernyi*. In tutti gli altri casi, o tutte le larve sono state trovate vive (anche se con qualche segnale di sofferenza o di pupazione) oppure il tasso di mortalità è risultato troppo basso per poter costruire curve di Weibull.

Tabella 60 - Specie utilizzata, sostanza testata, sito di indagine, parametro tossicologico, concentrazione, tempo di esposizione e parametro tossicologico teorico per test di tossicità acuta effettuati nella stagione estiva.

Specie	Sostanza	Stazione	P. tossicologico	Tempo	Concentrazione	P. tossicologico teorico (t)
<i>Diamesa zernyi</i>	Ibuprofene	PR0	LC33 calcolata	96h	100 mg/L	25 mg/L (LC50 24h, 72h, 96h)
	Furosemide	PR0	NOEC	96h	500 mg/L	130 mg/L (LC50 48h)
	Triclocarban	PR0	LC7 calcolata	96h	100 µg/L	10 µg/L (EC50 48h)
	Trimethoprim	PR0	LOEC	96h	400 mg/L	150 mg/L (LC50 48h)
	Sucralosio	PR0	LC10 calcolata	96h	42.727 g/L	> 10000 mg/L (LC50 96h)
	Tonalide	PR0	LC7 calcolata	96h	100 mg/L	0.244 mg/L (EC50 21d)
	Boscalid	PR0	NOEC	96h	500 µg/L	50 µg/L (LC50)
	Captan	PR0	LC10	24h	3.14 mg/L	10 mg/L (LC50)
			LC50	24h	81.06 mg/L	
	Chlorpyrifos	PR0	LC10	48h	1.06 µg/L	5 µg/L (LC50 48h)
			LC50	48h	5.24 µg/L	
	Metolachlor	PR0	LC10	72h	27.40 mg/L	25 mg/L (LC50 48h)
			LC50	72h	84.12 mg/L	
	Terbutilazina	PR0	LC20 calcolata	96h	25 mg/L	20 mg/L (48h)
	MIX 1K	PR0	LC3 calcolata	72h	10 ³ conc.ambientali	N.D.
	MIX 10K	PR0	LC13 calcolata	24h	10 ⁴ conc.ambientali	N.D.
<i>Baetis alpinus</i>	Sucralosio	PTm	LC47 calcolata	48h	42.727 g/L	> 10000 mg/L (LC50 96h)
		PTv	LC33 calcolata	48h	42.727 g/L	
		ML	LC40 calcolata	48h	42.727 g/L	
<i>Rhyacophila occidentalis</i>	Sucralosio	PTm	NOEC	24h	42.727 g/L	> 10000 mg/L (LC50 96h)
		PTv	NOEC	48h	42.727 g/L	
		ML	LOEC	48h	42.727 g/L	

I test effettuati su *D. zernyi* (Tabella 60) proveniente dal sito di indagine PR0 hanno evidenziato per questa specie un'elevata sensibilità per captan, chlorpyrifos e metolachlor, per le quali è stato possibile stimare un valore di LC10 rispettivamente a 24, 48 e 72 ore. Le molecole per le quali è stata invece riscontrata la maggiore resistenza sono risultate boscalid e furosemide, per le quali è stata osservata una NOEC 96h, seguite da trimethoprim (LOEC 96h). Una risposta intermedia è stata invece osservata a 24 ore per la miscela 10k (LC10 calcolata) e, a 96 ore, per le restanti molecole: tonalide e triclocarban (LC7 calcolate), sucralosio (LC10 calcolata), terbutilazina (LC20 calcolata) e ibuprofene (LC33 calcolata).

Sucralosio

Tabella 61 - Specie utilizzata, sito di indagine, concentrazione, tempo di esposizione e denominazione concentrazione per test con sucralosio.

Specie	Stazione	Concentrazione	Tempo	Denom. Conc.
<i>B. alpinus</i>	PTm	42,727 g/L	48h	LC47 calcolata
<i>B. alpinus</i>	PTv	42,727 g/L	48h	LC33 calcolata
<i>B. rhodani</i>	ML	42,727 g/L	48h	LC40 calcolata
<i>D. zernyi</i>	PRO	42,727 g/L	96h	LC10 calcolata
<i>R. occidentalis</i>	PTm	42,727 g/L	24h	NOEC
<i>R. occidentalis</i>	PTv	42,727 g/L	48h	NOEC
<i>R. occidentalis</i>	ML	42,727 g/L	48h	LOEC

Per quanto riguarda i test effettuati con sucralosio non sono state fatte prove complete di sopravvivenza (a parte per *D. zernyi*), in quanto sono state interrotte a 24 o 48 per effettuare test di genotossicità (Tabella 61). Sulla base dei risultati parziali ottenuti è comunque possibile osservare per *R. occidentalis* di tutti e tre i siti una elevata resistenza al sucralosio, in particolare per i siti PTm e PTv, seguita da *D. cinerella* (PRO), *B. alpinus* (PTv) e *B. rhodani* (ML). La specie risultata più sensibile a questa molecola è invece *B. alpinus* proveniente dal sito di indagine PTm.

Discussione

Stagione invernale

Sulla base dei risultati ottenuti dai test di sopravvivenza, *B. alpinus* e *B. rhodani* possono essere considerate le specie più sensibili alle 4 molecole tra quelle trattate. Le LC10 sono risultate significative in tutti i test di tossicità acuta ed i valori risultanti bassi quando confrontati con le altre specie esaminate.

Con la sola eccezione dell' furosemide, per *B. alpinus* le misure per il sito PTm erano generalmente più elevate che per PTv, suggerendo che la popolazione a monte fosse più resistente a furosemide della popolazione a valle. L'ibuprofene è stato l'unico composto testato per tutti i siti di campionamento, e ha presentato un danno decrescente da PTm a ML. Il trimethoprim ha mostrato la più grande differenza di tossicità tra le stazioni di PT, con un valore doppio a monte rispetto a valle. Tra i Baetidae, *B. rhodani* è risultato più resistente alla presenza di ibuprofene nel sito ML.

D. alpinus e *P. intricatus* hanno dimostrato lo stesso valore di NOEC per l'esposizione ad ibuprofene, a causa della configurazione del test di tossicità acuta. Nessun effetto è stato invece osservato per *P. intricatus* con esposizione a furosemide (NOEC).

D. cinerella è apparentemente risultata più resistente dei Baetidae, con una tolleranza ai tossici leggermente maggiore per PTv rispetto a PTm, con la sola eccezione di ibuprofene, dove si è passati dalla misura di una LC7 ad una NOEC tra i due siti. Inoltre è stato rilevato un tasso più elevato di pupazione per gli animali prelevati a valle, in particolare con più pupe nei controlli rispetto agli individui esposti ai tossici. Il furosemide ha presentato gli stessi effetti in entrambi i siti e la pupazione è stata stimolata da concentrazioni più elevate di questa molecola. Il trimethoprim ha invece mostrato un effetto tossico maggiore passando da una LOEC ad una LC13 calcolata, alterando anche il tasso di pupazione, il cui picco è passato dai 150 mg/L di PTm al

controllo in PTv. Le LC di triclocarban, calcolate per entrambe le stazioni, sono risultate una LC13 per PTm e una LC33 per PTv.

In generale, *P. branickii* è risultata più resistente nelle stazioni a valle, con percentuali di morti/sofferenti decrescenti da PTm a PTv. In particolare, con esposizione ad ibuprofene, per gli esemplari della stazione a monte sono stati osservati crescenti livelli di stress e di cannibalismo. La percentuale è risultata più elevata nel controllo e alle concentrazioni più basse. Nessun effetto è stato osservato per le esposizioni alla NOEC per gli esemplari di PTv. Il furosemide è risultato il solo composto che ha permesso la stima della LC10 in entrambi i siti, con valori maggiori per PTv rispetto alla stazione a monte. Con trimethoprim è stata osservata una maggiore percentuale di sofferenza alla LOEC per la stazione di PTm, non riscontrando simili effetti in PTv alla NOEC (eccetto per lo stadio pupale). Sono state infine determinate le NOEC con triclocarban per entrambi i siti (anche se una larva morta è stata ritrovata a 1 µg/L, 96h).

R. occidentalis è risultata più vulnerabile agli effetti di ibuprofene in PTm; l'LC10 è stata stimata per la stazione a monte, osservando prima sofferenza e poi morte. Nella stazione ML è stato riportato stress negli esemplari testati (LOEC), mentre per PTv è stata stimata una NOEC (ad eccezione di una larva morta a 1 mg/L). Scarsi effetti tossici sono stati rilevati nelle esposizioni con furosemide: le larve sono risultate stressate per PTm (LOEC), non riportando alcun effetto in PTv e ML.

L'unica specie che ha presentato una LC50 stimata inferiore a quella teorica è *B. alpinus*. Per furosemide questo valore è risultato inferiore per PTm ma incrementato e superiore al valore teorico di LC50 per PTv; trimethoprim ha mostrato lo stesso andamento. Per ibuprofene l'LC50 stimata è risultata lievemente superiore a quella teorica, mentre per tutte le altre molecole le LC50 sono risultate superiori ai valori di riferimento. Per le specie rimanenti, tutte le LC50 sono risultate superiori ai valori di riferimento.

Stagione estiva

Sucralosio

I risultati ottenuti confermano i dati di letteratura (Tabella 46) di bassa tossicità del sucralosio che riportano valori di LC50 96h superiori a 10 g/L. Tuttavia per i Baetidae, pur superando di quattro volte la concentrazione riportata in letteratura, si sono raggiunti a 48 ore valori di LC molti vicini all'LC50, in particolare con *B. alpinus* del sito PTm (LC47).

Diamesa zernyi

Per *D. zernyi* gli effetti più significativi sono risultati dall'esposizione ai pesticidi, in particolare captan, chlorpyrifos e metolachlor, per i quali è stato possibile stimare le LC10 e le LC50. Con captan l'LC10 24h ($3,14 \pm 1,04$ mg/L) non è lontana dall'LC50 teorica di *D. magna* (7-10 mg/L) (Kamrin, 1997); lo stesso vale per chlorpyrifos, di cui l'LC10 48h è pari a $1,06 \pm 0,19$ µg/L confrontabili con l'LC50 48h di *D. magna* (1,0 µg/L, Kersting, 1992) e l'LC50 96h di *C. tentans* è (0,47 µg/L, Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life – Chlopyrifos, 2008). Per CHL l'LC10 è circa 10^3 volte la concentrazione ambientale (7,72 ng/L). Per metolachlor l'LC10 72h ($27,40 \pm 2,1$ mg/L) è superiore ai valori teorici di *C. plumosus* (LC50 48h 3,8-4,4 mg/L), ma confrontabile con l'EC50 48h (immobilità) per *D. magna* (15,4-26 mg/L, USEPA/OPP, 2000). La concentrazione ambientale rilevata per PR0 era di 5,60 ng/L, oltre 10^6 volte l'LC10 stimata. La terbutilazina ha presentato effetti letali moderati (LC20 96h calcolata) alla concentrazione di 25 mg/L, oltre 10^6 volte superiore a quella ambientale (2,02 ng/L). Questo valore è confrontabile con i dati in letteratura per *D. magna* di EC50 ma si discosta molto dall'LC50 96h di *A. bahia* (109 µg/L). Boscalid, anche alla più alta concentrazione testata (500 µg/L = NOEC), non ha invece portato ad effetti evidenti sugli animali.

Per quanto riguarda le prove con miscela, MIX 1K ha prodotto un basso tasso di mortalità (3%), nonostante un contenuto in CHL oltre 10 volte superiore all'LC50 48h stimato. Con MIX 10K si è calcolata una LC13 a 24h (con 40% sofferenti), senza però raggiungere i livelli di mortalità delle prove con il CHL (100% morti alle 24 ore).

L'esposizione a vari tipi di farmaci non ha fatto registrare percentuali di mortalità paragonabili a quelle date dai pesticidi. L'effetto più marcato si è registrato con ibuprofene (LC33 96h calcolata), seguito da triclocarban (LC7 96h calcolata), trimethoprim (LOEC 96h) e furosemide (NOEC 96h). Infine tonalide (LC7 96h calcolata) e sucralosio (LC10 96h calcolata), hanno determinato i tassi di mortalità più bassi tra le molecole testate.

Confronto tra *Diamesa cinerella* e *Diamesa zernyi*

Le due specie di *Diamesa* provengono da siti e periodi differenti. *D. cinerella* è stata raccolta in inverno in PTm e dal PTv, mentre *Diamesa zernyi* è stata raccolta in PR0 in estate.

Il primo confronto può essere effettuato tra i test di tossicità acuta di *D. zernyi* e di *D. cinerella* del PTm. L'esposizione di *D. cinerella* all'IBU (100 mg/L) ha determinato una mortalità inferiore a quella registrata per *D. zernyi*, del PR0, esposta a IBU. Alle 96 ore,

infatti, è stata calcolata una LC7 per *D. cinerella*. Si tratta di una mortalità molto inferiore a quella calcolata per *D. zernyi* (LC33). *D. zernyi* ha presentato, inoltre, una certa sofferenza (7%) alle 96 ore. La FUR (500 mg/L) non ha avuto effetti sulla mortalità di *D. zernyi* (NOEC) e di *D. cinerella* (NOEC, con presenza di numerose pupe alle 96 ore). L'esposizione alla concentrazione di TMP (400 mg/L) che ha causato sofferenza in *D. zernyi* (53%) (LOEC), non ha avuto effetti su *D. cinerella* (NOEC) alle 96 ore. Il TCC (100 µg/L) determina una LC13 calcolata alle 96 ore e una pupazione evidente (60%) in *D. cinerella*. Questa LC è leggermente superiore a quella di *D. zernyi* (LC7 calcolata alle 96 ore). In *D. zernyi* si evidenzia anche una certa sofferenza alle 96 ore (13%).

Spostandosi sul confronto tra *D. zernyi* del PR0 e *D. cinerella* del PTv, la concentrazione di IBU (100 mg/L) che ha causato mortalità (LC33 calcolata alle 96 ore) e sofferenza (7%) in *D. zernyi* non ha avuto effetti alle 96 ore (NOEC) su *D. cinerella*. Come accade per *D. cinerella* del PTm, il FUR (500 mg/L) non ha avuto effetti anche su *D. cinerella* del PTv (NOEC, con presenza di pupe alle 96 ore). Questo risultato per il FUR è confrontabile con quello di *D. zernyi* del PR0 (NOEC). Concentrazioni elevate di FUR (250-500 mg/L) sembrano incentivare la pupazione in *D. cinerella* a 96 ore di esposizione (sia al PTm che al PTv). Il TMP, alla concentrazione di 400 mg/L, ha determinato una mortalità calcolata del 7% (LC7) in *D. cinerella* del PTv, ma nessun sintomo di sofferenza a differenza di ciò che accade per *D. zernyi* (LOEC con 53% di sofferenti). L'esposizione di *D. cinerella* del PTv a TCC (100 µg/L) ha determinato una LC33 calcolata alle 96 ore. Si tratta di un valore di mortalità superiore sia a quello di *D. zernyi* (LC7 calcolata) che a quello di *D. cinerella* del PTm (LC13).

Dai risultati dei test di tossicità acuta, sembra che *D. zernyi*, del PR0, risenta maggiormente dell'esposizione ad ibuprofene (100 mg/L) rispetto a *D. cinerella* dei due siti del PT. Il furosemide (500 mg/L) non ha effetti sulla sopravvivenza delle due specie. Il trimethoprim (400 mg/L) non ha effetti evidenti su *D. cinerella* del PTm ed effetti limitati su *D. cinerella* del PTv (LC7 calcolata). Non si osserva mortalità per *D. zernyi* esposta a TMP (400 mg/L) ma la sofferenza è molto alta (53%). Il triclocarban sembra avere un effetto più marcato su *D. cinerella* di entrambi i siti del PT rispetto a *D. zernyi* del PR0.

3.15.4 Obiettivo 3.4: Test di genotossicità (febbraio 2016-aprile 2016, settembre 2016, febbraio-marzo 2017)

Materiali e Metodi

Tra i test indicatori di genotossicità, il Test della Cometa (Comet assay) noto anche come elettroforesi su singola cellula (SCGE=single-cell gel electrophoresis) si è recentemente rivelato particolarmente efficace e sarà usato in questo progetto. Il saggio misura, nelle singole cellule, le rotture del filamento di DNA, considerate lesioni potenzialmente pre-mutageniche e marcatori sensibili di danni genotossici. Il test è usato in diversi ambiti di ricerca e come biomarcatore non specifico di genotossicità nel monitoraggio ambientale (Park and Choi, 2008).

Complessivamente sono stati eseguiti 125 test in inverno e 140 in estate su 11 specie.

Preparazione delle larve

Le larve utilizzate per i test di Comet assay sono state raccolte e trattate come quelle impiegate nei test di tossicità. Il monitoraggio dei danni al DNA è stato condotto in vivo a seguito dell'esposizione delle larve delle specie selezionate alla LC10 oppure alla concentrazione di tossico più elevata a cui, dopo 96h, le larve sono state trovate tutte vive (NOEC) o morte con % molto basse (<LC33) (LOEC) – in questi ultimi casi i dati non consentivano di costruire la curva di tossicità e calcolare un valore significativo di LC10 o LC50. Aumentare la Cmax non sarebbe stato possibile in quanto essa corrispondeva già alla massima solubilità della molecola in acqua (anche con DMSO). Il tempo di esposizione delle larve utilizzate è quello a cui è stata calcolata o stimata la concentrazione per il test (LC10 o LOEC o NOEC). Se alla NOEC o LOEC, i test sono stati eseguiti sia a 96 che a 24 ore. Il test è stato eseguito solo sulle larve rinvenute vive allo scadere del tempo di esposizione.

A ciascuna concentrazione è stato associato un controllo (con il solvente), come visibile nella seguente Tabella 62.

Tabella 62 - Setup usato durante la fase di esposizione delle larve per le prove di Comet assay; t = tempo di esposizione

LC10		Massima conc. non letale		
C _{0h}	C _t	C _{0h}	C _{24h}	C _{96h}
LC10 _t		Cmax _{24h}		Cmax _{96h}

Materiali

- Vetrini da microscopia trattati per Comet assay
- Vetrini coprioggetto, 24 mm x 60 mm
- Buffer di sospensione
- Buffer di lisi
- Buffer alcalino (e di elettroforesi)
- Micropipettatori manuali (0.5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL)
- Alcol etilico 70%

- Acqua distillata
- Bromuro di etidio (10 µg m/L) (Tamura et al. 2013)
- Low Melting Point Agarose (LMPA) gel 1%, in PBS (Sigma - Aldrich A9414)
- Pistre petri in vetro
- Tubi da centrifuga (1,5 mL, 15 mL, 50 mL)
- Pestelli per tubi da centrifuga da 1,5 mL
- Centrifuga da banco (D3024 High Speed Micro-Centrifuge, SCILOGEX)
- Microscopio ad epifluorescenza (Eclipse Ci con filtro G2-A, Nikon)
- Sistema di acquisizione per microscopio ad epifluorescenza (DS – Ri2, Nikon)
- Filtri per cellule con maglie da 100 µm
- Sistema per elettroforesi orizzontale (E0303, ENDURO)
- Camera di Neubauer per conta cellulare
- Colorazione trypan blue, soluzione 2%
- Software R con pacchetto *drc* (Dose-Response Curves)

Preparazione dei vetrini per il test

- Vetrini da microscopia con banda sabbiata
- Agarosio per biologia molecolare, soluzione 1% in acqua
- Metanolo (per la pulizia dei vetrini)

È stato disciolto agarosio in acqua distillata (soluzione 1% in acqua), la soluzione di agarosio è portata a 55 °C in bagno termostato e vi sono stati immersi i vetrini precedentemente lavati fino ad arrivare a circa un terzo dell'area sabbiata (i vetrini sono stati lavati con metanolo per eliminare grassi ed eventuali residui di lavorazione). Il lato inferiore dei vetrini immersi è stato ripulito dall'agarosio e sono stati posti in una cappa a flusso laminare per almeno 30 minuti per permettere la completa asciugatura dell'agarosio ed evitare la deposizione di polvere o altri contaminanti.

Preparazione delle soluzioni

Buffer di sospensione (1 L) (Olive and Banath, 2006)

- Acqua distillata
- PBS 1x
- EDTA 20 mM
- DMSO 10%, aggiunto prima dell'utilizzo

Buffer di lisi (1 L, pH 10) (Lee et al., 2006)

- Acqua distillata
- Tris 10 mM
- EDTA 100 mM
- NaCl 2,5 M
- DMSO 10%, aggiunto prima dell'utilizzo
- Triton X-100 1%, aggiunto prima dell'utilizzo

Buffer alcalino e per elettroforesi (1 L, pH > 13)

- Acqua distillata
- NaOH 300 mM
- EDTA 1 mM

Dopo la preparazione, tutte le soluzioni sono state conservate in frigorifero a 4 °C fino al momento dell'utilizzo.

Procedura del test

L'intera procedura di Comet assay è stata eseguita in completa oscurità o con luce rossa, per eliminare o comunque minimizzare il danno al DNA causato da radiazione ultravioletta. Le larve trovate al termine dell'esposizione, sono state trasferite in tubi da centrifuga da 1,5 mL contenenti 300 µL di buffer di sospensione a 4 °C. Come indicato in precedenza, per ogni prova sono stati utilizzati da 1 a 5 esemplari (in base a quanto ne sono stati esposti e quanti sono sopravvissuti).

Ciascun campione è stato poi omogeneizzato con un pestello e filtrato con un filtro per cellule a maglie da 100 µm per rimuovere resti di esoscheletro e cellule non separate. Nel caso di animali predatori, prima di procedere all'omogeneizzazione, è stato rimosso l'intestino per evitare di analizzare anche le cellule delle loro prede talvolta ancora integre.

Ciascun campione, una volta portato il volume finale a 1,5 mL con l'aggiunta di ulteriore buffer di sospensione, è stato centrifugato per 15 minuti a 2500 rpm con rotore raffreddato in freezer per evitare alle cellule il rischio di shock termico. Scartato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 300 µL di buffer di sospensione.

La concentrazione della sospensione cellulare risultante è stata misurata in camera di Neubauer: 10 µL di sospensione sono stati miscelati con 10 µL di colorazione trypan blue; 10 µL della miscela sono stati caricati in camera di Neubauer ed è stata eseguita la conta cellulare al microscopio ottico. Qualora la concentrazione fosse superiore a ≈ 1000 cellule/µL, la sospensione è stata diluita con buffer di sospensione fino a raggiungere questo valore.

Successivamente sono stati uniti 200 µL della risultante sospensione a 600 µL di soluzione di LMPA all'1%, e 600 µL della miscela sono stati caricati su vetrino da microscopia trattati. E' stato poi aggiunto un vetrino coprioggetto, che per capillarità permette di livellare e stendere la miscela sull'opportuna area del vetrino; dopo 2 minuti a 4 °C (a gel solidificato) il coprioggetto è stato rimosso. A questo punto tutti i campioni sono stati immersi in buffer di lisi in unapietra Petri (30 mL per vetrino da trattare) e mantenuto al buio a 4 °C per l'intera notte. Rispetto a protocolli con lisi di 1 ora, un tempo più prolungato permette di raddoppiare la sensibilità del test, senza alterare il rapporto segnale/rumore (Lee et al., 2006).

Il giorno seguente il buffer di lisi è stato scartato ed i vetrini sono stati posti per 15 minuti in piastre Petri pulite contenenti buffer alcalino (30 mL per campione). Dopo aver ripetuto per altre due volte il trattamento in buffer alcalino, i vetrini sono stati trasferiti nell'apparato per elettroforesi orizzontale. Come tampone di corsa è stato utilizzato il buffer alcalino, e la corsa è stata effettuata per 25 minuti a 1 V/cm e 300 mA, a 4 °C in completa oscurità. Al termine dell'elettroforesi i vetrini sono stati trasferiti in Petri pulite e posti 10 minuti in acqua distillata a 4 °C. Ripetuta due volte questa operazione, è

stato effettuato un lavaggio finale in alcol etilico al 70% per 5 minuti a 4 °C. Infine i campioni sono stati posti ad asciugare in cappa a flusso laminare e conservati in contenitori oscurati per la successiva acquisizione.

Acquisizione al microscopio

I vetrini essiccati sono stati colorati tramite bagno per 20 minuti in soluzione di bromuro di etidio a 4 °C (10 µg m/L) (Banáth et al., 2001), quindi brevemente risciacquati in acqua distillata per rimuovere l'eccesso di colorazione. Le immagini sono state acquisite dal microscopio ad epifluorescenza mediante il software "NIS-Elements Basic Research". La successiva analisi delle immagini è stata effettuata con il plugin "OpenComet 1.3" (Schindelin et al., 2015) del software FIJI/ImageJ (Olive and Banath 2006), di cui di seguito sono riportati i principali parametri esaminati (Tabella 63).

Tabella 63 - Principali parametri, con definizione e formula

Parametro	Definizione
Tail % DNA	$100 - \text{Head \% DNA}$
Tail Length	$(\text{Tail from center}) \text{ Tail Extent} + \text{Head Extent}/2$ $\text{Tail Length} = \text{Tail Extent}$
Tail Moment	$\text{Tail Length} * \text{Tail \% DNA}/100$
Olive Tail Moment	$(\text{Tail Mean} - \text{Head Mean}) * \text{Tail \% DNA}/100$

La *tail length* (lunghezza della coda) rappresenta la distanza coperta dalla migrazione del DNA dal centro del nucleo, ed è utilizzata per valutare l'entità del danneggiamento subito dal DNA. Il *tail moment* è definito come il prodotto tra la lunghezza della coda e la frazione di DNA totale presente nella coda stessa. Il *tail moment* incorpora sia una misurazione della dimensione più piccola rilevabile dei frammenti di DNA migrato (dalla lunghezza della coda) che la quantità di frammenti danneggiati o rilasciati di DNA (rappresentati dall'intensità di DNA nella coda). Le due figure di seguito sintetizzano alcune fasi del test (Figura 53 e Figura 54).

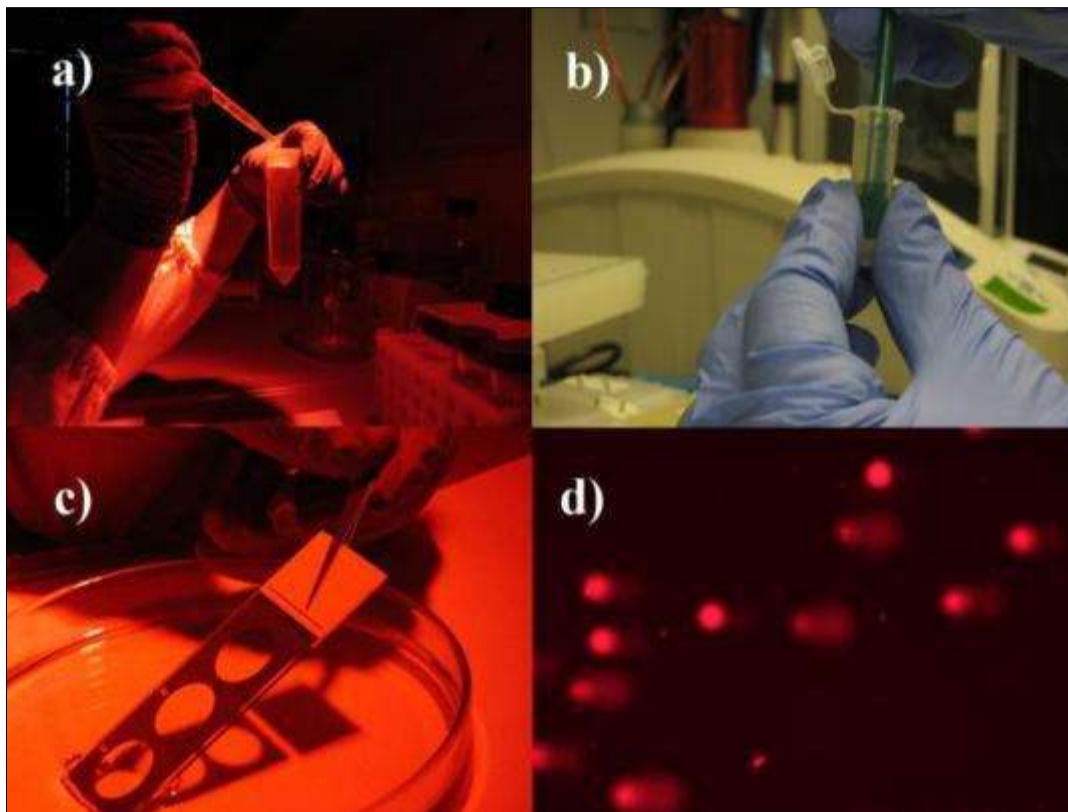


Figura 53 - Quattro fasi del Comet assay: a) Preparazione delle soluzioni dei tossici b) Omogeneizzazione delle larve dopo l'esposizione c) Lavaggio dei vetrini in buffer alcalino d) Acquisizione delle immagini con microscopio ad epifluorescenza (Photo © MUSE).

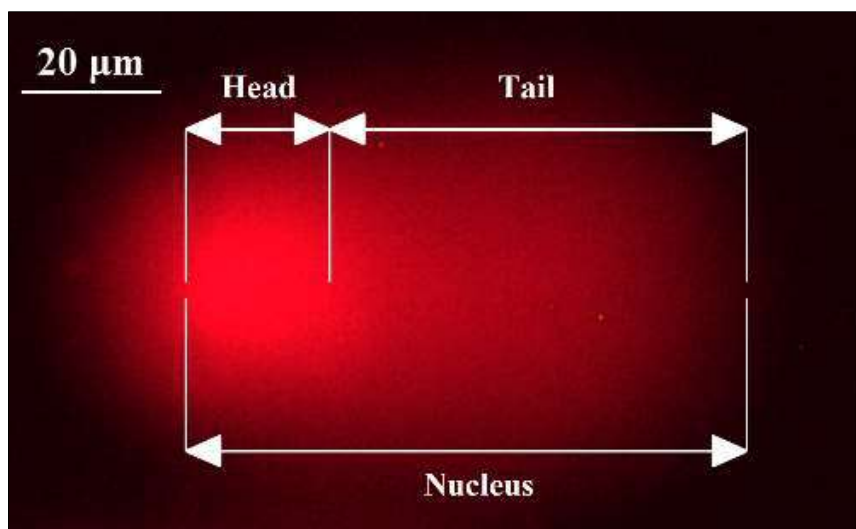


Figura 54 - Cellula sottoposta a Comet assay. Testa (head) e coda (tail) sono state evidenziate (*Rhyacophila torrentium*, C 24h).

Risultati

Stagione invernale

Risposte per specie

Baetis alpinus

Immagini esempio di cellule di *B. alpinus* sottoposte al test di Comet controllo o esposte a ibuprofene, furosemide, trimethoprim, e triclocarban sono riportate in Figura 55.



Figura 55- Risultati del Comet assay per *B. alpinus* esposto a: a) controllo, b) ibuprofene, c) furosemide, d) trimethoprim, e) triclocarban.

Le misure di *Olive Tail Moment* calcolate per le stazioni ML, TP-Up, TP-Dw e sono riportate in Figura 56A. Si osservano differenze significative fra i valori ottenuti per il sito ML e i due siti del Passo del Tonale (PTm, PTv) dove il danno basale al DNA è risultato inferiore. La Figura 56B mostra invece i risultati dell'analisi del danno genotossico causato dall'esposizione di *B. alpinus* a furosemide, ibuprofene, trimethoprim e triclocarban come valore di *Relative Olive Tail Moment* (relativo al rispettivo controllo) per i siti PTm e PTv. L'ibuprofene determina una genotossicità significativa sia per la stazione a monte che per quella a valle del depuratore. Il furosemide è risultata genotossica invece solo per la popolazione a monte (PTm). Non sono invece rilevate differenze significative per trimethoprim e triclocarban in entrambe le stazioni. Per la stazione ML (Figura 56C) è stato testato solo l'ibuprofene la cui esposizione determina un aumento significativo del danno al DNA di *B. alpinus* rispetto al suo controllo.

Baetis rhodani

I risultati per *B. rhodani* raccolto al sito d'indagine ML sono riportati in Figura 57. L'esposizione a furosemide e ibuprofene risulta essere genotossica. trimethoprim e triclocarban portano invece ad una diminuzione significativa del danno al DNA rispetto agli animali controllo.

Diamesa cinerella

E' possibile osservare in i dati relativi al danno basale misurato per *D. cinerella* nei siti PTm e PTv. Come si può osservare il danno risulta essere significativamente maggiore a valle del depuratore. La Figura 58B mostra i risultati del livello di danno accumulato da *D. cinerella* in seguito all'esposizione a contaminanti emergenti e pesticidi. Si può notare che *D. cinerella* risulta essere molto resistente ai contaminanti emergenti e pesticidi sia la popolazione raccolta a monte che quella a valle del depuratore. L'unica molecola che

determina un aumento significativo del danno al DNA è infatti l'ibuprofene per la popolazione del sito PTv. La Figura 58C e la Figura 58D mostrano invece il danno causato dall'esposizione breve (24h, Figura 58C e durata (96h, Figura 58D) a furosemide, ibuprofene, trimethoprim e triclocarban nei due siti del Passo del Tonale. Per il sito a monte tutte le molecole testate sono risultate significativamente genotossiche per le larve di *D. cinerella* dopo una esposizione di 24 ore, ma solo il triclocarban ha causato danno al DNA anche dopo 96h di esposizione. Per il sito a valle invece, l'esposizione di 24h ad IBU, TMP e TCC ha portato ad un aumento significativo di danno al DNA e, dopo 96h, solo l'esposizione a IBU.

In generale in tutti i campioni del sito a monte esposti ai prodotti farmaceutici e di cura della persona è stato rilevato un danno maggiore rispetto alle prove a valle e, per lo stesso tossico, l'esposizione breve (24h) ha portato ad un danno maggiore rispetto all'esposizione prolungata (96h). *D. cinerella* risulta essere invece molto resistente ai contaminanti emergenti e pesticidi.

Pseudodiamesa branickii

La Figura 59 mostra i risultati di Relative Olive Tail Moment di *P. branickii* riferiti ai siti PTm (Figura 57B) e PTv (Figura 57C). Nel pannello A è riportato il confronto tra la popolazione a monte e quella a valle, che evidenzia un danno maggiore (anche se non significativo) a valle dello scarico. Per l'ibuprofene e il furosemide, per le quali è stato possibile determinare una LC10, le larve sono state esposte solo ad un tempo (48 e 72h rispettivamente) ad eccezione del sito a valle in cui anche l'ibuprofene è stato testato alla sua NOEC per 24 e 96h, mentre due diversi tempi di esposizione (24 e 96h) sono stati testati per triclocarban e trimethoprim (rispettivamente alla NOEC e LOEC calcolate) sia a monte che a valle. Nel sito a monte (Figura 59B) un aumento significativo di Olive Tail Moment è stato rilevato dopo esposizione a IBU e dopo esposizione breve a TMP e TCC. Per il sito a valle (Figura 58C) invece, l'esposizione a FUR e l'esposizione breve a IBU, TMP e TCC hanno portato ad un aumento significativo del Relative Olive tail Moment.

In generale, anche per *P. branickii*, l'esposizione breve (24h) porta ad un maggior danno al DNA rispetto all'esposizione di 96h. A differenza di *D. cinerella* invece, non si è osservata per *P. branickii* una maggiore sensibilità ai tossici delle larve della popolazione a monte del depuratore rispetto a quella a valle.

Rhyacophila spp.

E' possibile vedere in Figura 60A i dati riferiti al danno basale al DNA per le specie *R. occidentalis* e *R. tristis* per i siti di indagine PTm, PTv e ML (quest'ultimo solo per *R. occidentalis*). Per *R. occidentalis* i controlli presentano un valore crescente di danno basale dal sito a monte al sito ML ed anche per *R. tristis* il danno basale è più alto per la stazione a valle del depuratore rispetto a quella a monte. Questo risultato è in accordo con quello già ritrovato per *B. alpinus* (Figura 56A) e *D. cinerella* (Figura 58A). *R. occidentalis* è stata poi esposta a furosemide e ibuprofene in tutti e tre i siti d'indagine: PTm e PTv (Figura 60B) e ML (Figura 60C). Solo l'esposizione all'ibuprofene della popolazione raccolta a monte del depuratore ha evidenziato un aumento del danno statisticamente significativo, corroborando i risultati ottenuti per *Diamesa cinerella*, dove

la popolazione a monte del depuratore che presenta un danno basale inferiore sarebbe più sensibile al danno da tossici rispetto alla popolazione a valle del depuratore.

Risposte per sito

PTm

Si può osservare in Figura 61A il confronto dei Relative *Olive Tail Moment* delle specie campionate nel sito PTm ed esposte ad ibuprofene. *B. alpinus* presenta un livello di danno considerevolmente elevato assieme a *D. cinerella* (24h di esposizione) e *R. occidentalis*, mentre *P. branickii* e *D. cinerella* (esposta per 96h) presentano valori significativamente inferiori. Nelle analisi effettuate con furosemide (Figura 61B), *D. cinerella* risulta invece la specie con il livello di danno più elevato, presentando però un danno elevato a 24h (Dc LOEC 24h) e non a 96h (Dc LOEC 96h), *P. branickii* (Pb LC10 72h) risulta invece la meno danneggiata come per l'esposizione all'ibuprofene. *P. branickii* è risultata invece la specie più sensibile al trimethoprim (Figura 61C) con un andamento decrescente rispetto al tempo di esposizione da 24h (Pb LOEC 24h) a 96h (Pb LOEC 96h). Lo stesso andamento è presentato anche da *D. cinerella*, che segue *P. branickii* con valori decrescenti da 24h (Dc LOEC 24h) a 96h (Dc LOEC 96h). *B. alpinus* mostra il più basso livello di danno, confrontabile con *P. branickii* a 96h e con *D. cinerella* a 96h. Dopo esposizione a triclocarban (Figura 61D) *D. cinerella* mostra ancora i valori più elevati con trend decrescente tra 24h e 96h, seguita da *P. branickii* (Pb LOEC 24h). *B. alpinus* presenta un bassissimo livello di danno confrontabile con il livello ritrovato per Dc e Pb dopo 96h. *R. occidentalis* non è stata invece esposta né a trimethoprim né a triclocarban.

PTv

Tra le specie esposte ad ibuprofene per la stazione PTv (Figura 62A), il danno maggiore è stato rilevato in *P. branickii* esposta 24h mentre il livello di danno cala notevolmente dopo 96h. Seguono come entità di danno *B. alpinus* e *D. cinerella* (con valori decrescenti da 24h a 96h) ed infine *R. occidentalis* presenta il valore più basso ritrovata. Il livello di danno ritrovato dopo esposizione a furosemide (Figura 62B) è molto basso per tutte le specie testate, rispetto al danno causato dall'ibuprofene. *B. alpinus* e *D. cinerella* (Dc LOEC 24h) sono gli unici a mostrare, infatti, un danno superiore a quello basale del controllo. Per il trimethoprim (Figura 62C) è *P. branickii* la specie che mostra il livello di danno più elevato (Pb NOEC 24h). Le altre specie testate mostrano invece livelli di danno statisticamente più bassi di *P. branickii* e tutti confrontabili tra loro. Nei test con triclocarban (Figura 62D) la specie con maggior danno risulta ancora una volta *P. branickii* (Pb NOEC 24h), le altre specie testate hanno un livello di danno inferiore non differente tra loro. Come per la stazione PTm, *R. occidentalis* non è stata esposta a trimethoprim e triclocarban.

ML

B. rhodani è la specie che presenta il danno più elevato tra quelle esposte ad ibuprofene presso la stazione ML (

Figura 63A), seguita da *B. alpinus*. Il valore più basso appartiene a *R. occidentalis* (Ro NOEC 24h). Il furosemide (Figura 63B) è stato testato solamente su due specie *B. rhodani* e *R. occidentalis* ed è osservabile come *B. rhodani* risulti significativamente più danneggiato di *R. occidentalis*. trimethoprim e triclocarban sono stati testati unicamente su *B. rhodani* (con valori rispettivamente di 0.48 ± 0.03 e 0.46 ± 0.02).

Danno basale

Confrontando il livello di danno basale al DNA nelle specie campionate al sito PTm (Figura 64A), si osserva come *D. cinerella* e le due specie di *Rhyacophila* presentino il più elevato valore di *Olive Tail Moment* (statisticamente non differente tra loro). *B. alpinus* e *P. branickii* presentano valori simili tra loro, ma significativamente inferiori ai campioni di *Rhyacophila* e *Diamesa*. Come nella stazione a monte, il valore più elevato di danno basale per la stazione PTv (Figura 64B) appartiene a *D. cinerella*, seguita anche in questa stazione dalle due specie di *Rhyacophila*, le quali presentano valori confrontabili tra loro ma in questo caso significativamente inferiori rispetto alla *D. cinerella*. I valori più bassi di danno basale sono stati ritrovati invece, come per il sito a monte, per *B. alpinus* e *P. branickii*. Nella stazione ML (Figura 64C) *R. occidentalis* è risultata invece la specie con il più alto valore di *Olive Tail Moment*, seguita da *B. alpinus* e da *B. rhodani*. Le specie *D. cinerella* e *P. branickii* non sono stati testate per questa stazione.

Stagione estiva

Risposte per specie

Baetis alpinus

I risultati del danno basale calcolato tramite il test della cometa per *B. alpinus* (raccolto alla stazione PTm) sono riportati in Figura 65A. Similmente a quanto già osservato per varie specie della stagione invernale anche tra le diverse popolazioni di *B. alpinus* raccolte alle tre stazioni di indagine in estate si sono registrate delle differenze significative. Il campione raccolto al PTm risulta infatti aver un danno basale al DNA più basso rispetto agli altri. Il campione raccolto al PTv è superiore al PTm, ma significativamente inferiore al campione del sito ML. I risultati del danno genotossico per *B. alpinus* esposto a furosemide, ibuprofene, trimethoprim, triclocarban e sucralosio per le stazioni a monte a valle del depuratore del passo del Tonale sono invece riportati in Figura 65 B. Per il sito a monte l'esposizione a FUR, IBU, TCC e TMP ha portato ad un aumento significativo del danno, solo il SUCR non ha portato a genotossicità, anzi il livello di danno dopo esposizione è risultato di molto inferiore a quello degli animali controllo. Per il sito a valle del depuratore invece solo l'IBU ha portato ad un aumento significativo di danno rispetto al controllo, risultato che come quello ottenuto per la stagione invernale fa ipotizzare una maggiore resistenza ai tossici della popolazione a valle del depuratore rispetto a quella a monte. Similmente al sito a monte invece il SUCR ha portato ad una diminuzione significativa del danno. A Mezzolombardo (ML) (Figura 65C) l'unica sostanza testata nelle prove di genotossicità è stato l'ibuprofene. L'esposizione a questo farmaco è in grado di causare un aumento del danno al DNA

agli esemplari di *B. alpinus* raccolti in questa stazione rispetto agli animali della stessa stazione non esposti al farmaco.

Baetis rhodani

Gli esemplari di *B. rhodani* su cui sono state eseguite le prove di “Comet assay” dopo esposizione a quattro contaminanti emergenti (FUR, IBU, TMP, TCC) provengono tutti dalla stazione ML. In Figura 66 sono rappresentati graficamente i valori medi del Relative Olive Tail Moment e gli errori standard corrispondenti. L'esposizione a furosemide e ibuprofene ha determinato un aumento del danno al DNA di questi animali rispetto agli animali controllo, il triclocarban non ha portato a nessuna differenza mentre il trimethoprim ad una diminuzione del danno.

Diamesa zernyi

I risultati del test della cometa sulle larve di *D. zernyi* raccolte alla stazione PRO ed esposte a undici differenti contaminanti emergenti più due miscele di contaminanti sono riportati nella Figura 67. In particolare sono stati testati: ibuprofene (IBU), furosemide (FUR), trimethoprim (TMP), triclocarban (TCC), tonalide (TON), sucralosio (SUCR), boscalid (BOS), captan (CAP), metolachlor (MET), terbutilazina (TER) e chlorpyrifos (CPF). Inoltre sono state preparate due miscele di pesticidi: MIX 1K = 103 x concentrazione ambientale (EC) di CPF, MET and TER e MIX 10K = 104 x EC di CPF, MET and TER. La maggior parte delle molecole testate ha evidenziato la capacità di causare danno al DNA nelle larve di *D. zernyi* ad eccezione di captan, terbutilazina e chlorpyrifos. Il danno maggiore viene determinato dalla miscela di pesticidi MIX 10k seguito dal boscalid e poi, con valori confrontabili, da tutti gli altri tossici e miscele.

Diamesa latitarsis

Sulle larve di *D. latitarsis* raccolte alla stazione PRO è stato valutato solo l'effetto del CPF. Nella Figura 68 è riportato il grafico dell'Olive Tail Moment relativo. L'esposizione al pesticida CPF, così, come già osservato per *D. zernyi* della stessa stazione, non determina un aumento significativo del danno al DNA rispetto alle larve controllo.

Rhyacophila occidentalis

E' possibile vedere in Figura 69A i dati riferiti al danno basale al DNA per la specie *R. occidentalis* per i siti d'indagine PTm, PTv e ML. Differentemente da quanto ottenuto per la stagione invernale, in estate la stazione nella quale il danno basale è più alto è la stazione PTm che presenta un valore significativamente maggiore rispetto sia al PTv che al sito ML. PTv e ML presentano invece valori confrontabili fra loro di danno. Nella Figura 69B sono riportati i dati dell'analisi delle comete per *R. occidentalis* raccolta al sito PTv ed esposta a FUR, IBU e SUCR. Tutti e tre i contaminanti determinano un aumento significativo del danno genotossico rispetto agli animali controllo, con il valore più alto ottenuto dopo l'esposizione al farmaco ibuprofene. I risultati di *R. occidentalis* raccolto a mezzolombardo (ML) sono in Figura 69C. In questo caso sono state testate solo furosemide e ibuprofene. Gli animali raccolti in questa stazione sono risultati resistenti a questi due contaminanti (per quanto riguarda il danno al DNA), e per quanto

riguarda FUR si è osservata persino ad una diminuzione significativa del danno rispetto al controllo.

Rhyacophila tristis

In Figura 70A sono riportati i valori di danno basale al DNA ottenuti dal test della cometa per *R. tristis* della stazione PTm e PTv. Differentemente dal trend trovato per *R. occidentalis* della stagione estiva, ma similmente a quanto osservato per la stessa *R. tristis* e per *R. occidentalis* raccolta in inverno (Figura 60) il valore più alto di danno basale è stato calcolato per gli esemplari raccolti a valle del depuratore. Gli esemplari di *R. tristis* raccolti nella stazione PTm sono stati inoltre esposti a FUR, IBU e SUCR. Solo l'esposizione a FUR ha determinato un aumento significativo del danno al DNA (Figura 70B). Gli esemplari che sono stati raccolti al sito ML sono stati invece esposti solo al farmaco ibuprofene che è risultato essere genotossico per questa specie in questa stazione e stagione (Figura 70C).

Risposte per sito

PR0

In Figura 71 si può osservare il confronto dei Relative *Olive Tail Moment* delle due specie di *Diamesa* campionate nel sito PR0 ed esposte al pesticida chlorpyrifos (CPF). *D. latitarsis* mostra un valore di danno statisticamente maggiore rispetto a *D. zernyi*, ma va sottolineato come entrambe le specie non evidenzino un aumento significativo del danno rispetto al controllo (che è stato settato a livello 1, linea tratteggiata nel grafico). Il CPF non sembra in definitiva avere effetti genotossici sulle specie del genere *Diamesa* testate in questo sito.

PTm

Tra le due specie esposte ad ibuprofene per la stazione PTm (Figura 72A), il danno maggiore è stato rilevato per *B. alpinus*; mentre *R. tristis* non accumula danno genotossico se esposta a questo farmaco. Il livello di danno ritrovato dopo esposizione a furosemide (Figura 72B) è risultato invece non differente per le due specie testate. Una differenza statisticamente significativa è stata invece osservata fra le due specie dopo esposizione a sucralosio, dove *R. tristis* presenta un livello di danno maggiore (Figura 72C). In questo caso però entrambe le specie presentano un livello di danno inferiore a quello ritrovato nel controllo.

PTv

Si può osservare in Figura 73A il confronto dei Relative *Olive Tail Moment* delle tre specie campionate nel sito PTv ed esposte ad ibuprofene. *R. occidentalis* e *R. tristis* presentano un livello di danno simile tra loro e più elevato di quello ritrovato per *B. alpinus*. Nelle analisi effettuate con furosemide (Figura 73B), *R. occidentalis* risulta invece la specie con il livello di danno più elevato; in *B. alpinus* il livello è invece più basso e non differente da quello del controllo. *R. occidentalis* è risultata la specie anche più sensibile all'esposizione a sucralosio; il danno causato da questo contaminante in *B.*

alpinus è invece risultato praticamente nullo e di molto inferiore al livello del controllo (Figura 73C).

ML

I confronti per le prove con l'ibuprofene al sito d'indagine ML sono riportati in Figura 74A. Sono state tre le specie su cui è stato testato l'ibuprofene. I risultati mostrano un livello di danno maggiore per *B. alpinus* rispetto al *B. rhodani* e *R. occidentalis*, le quali presentano un livello simile tra loro e non differente dal livello del controllo. furosemide è stata invece testata solo su due specie (Figura 74B), di cui *B. rhodani* è risultata essere la più sensibile al danno causato da questo contaminante.

Danno basale

Confrontando il livello di danno basale al DNA nelle specie campionate al sito PR0 (Figura 75A), si osserva come, fra le due specie di *Diamesa*, è la *D. latitarsis* quella che ha un maggior danno al DNA in natura. Per quanto riguarda il sito PTm invece, la specie *R. occidentalis* presenta un livello di danno notevolmente superiore a quello delle altre due specie testate (*B. alpinus* e *R. tristis*) che presentano un danno simile tra loro (Figura 75B). Differentemente al sito a valle del depuratore (PTv), è la *R. tristis* che presenta il livello di danno basale maggiore, seguita da *R. occidentalis* che mostra un livello di poco superiore a quello di *B. alpinus* che è risultato essere il meno danneggiato di tutti (Figura 75C). Il confronto per il sito ML evidenzia invece la *R. occidentalis* come la specie più danneggiata (similmente a quanto trovato al sito a monte del depuratore) seguita da *B. alpinus* e da *B. rhodani* (Figura 75D).

Confronto Stagione estiva/invernale

B. alpinus

In Figura 74 è riportato il confronto per la specie *B. alpinus* per le stagioni inverno ed estate. In particolare in Figura 76A sono mostrati i livelli di danno basale al DNA nelle tre stazioni d'indagine nelle tue stagioni. L'andamento è molto conservato tra le stagioni; infatti si evidenzia sempre un livello di DNA basale maggiore nella stagione estiva rispetto alla stagione invernale. Dopo esposizione ai tossici invece la risposta non è sempre così conservata; nel sito PTm, per esempio (Figura 76B), il danno causato da FUR è simile fra le due stagioni, quello causato da IBU è sensibilmente maggiore nella stagione invernale (quando il danno basale è inferiore), mentre per TMP e TCC un maggior danno basale sembrerebbe portare anche ad una maggiore sensibilità all'effetto genotossico nella stagione estiva. Il confronto fra le stagioni per il sito a valle (PTv) ha generalmente evidenziato una risposta genotossica simile fra le due stagioni per tutti i tossici testati ad eccezione del TCC che porta ad un livello di danno più alto nella popolazione invernale (Figura 76C). Infine per il sito ML è stato testato in entrambe le stagioni solo l'IBU. Il confronto evidenzia una maggiore tossicità per gli animali della popolazione estiva (Figura 76D).

Diamesa spp.

In Figura 77A è riportato il confronto fra il danno al DNA della stagione estiva ed invernale in *Diamesa* spp. causato dall'esposizione acuta a contaminanti emergenti e pesticidi. Come si può osservare la popolazione estiva di *Diamesa* risulta essere molto più sensibile all'esposizione a contaminanti emergenti e pesticidi rispetto a quella invernale. Infatti 4 tossici dei 7 testati hanno portato ad un aumento significativo del danno genotossico rispetto alla popolazione estiva dove per il sito a monte nessun tossico ha mostrato tossicità e per quello a monte solo uno su 7. Un risultato simile si trova se si confronta la risposta all'esposizione a prodotti farmaceutici e per la cura della persona fra le due stagioni (Figura 75B). Dei 4 tossici testati nella stagione estiva tutti e 4 hanno portato ad un aumento del danno mentre solo uno su 4 per le popolazioni invernali dei due siti del tonale.

Grafici genotossicità⁵

Stagione invernale

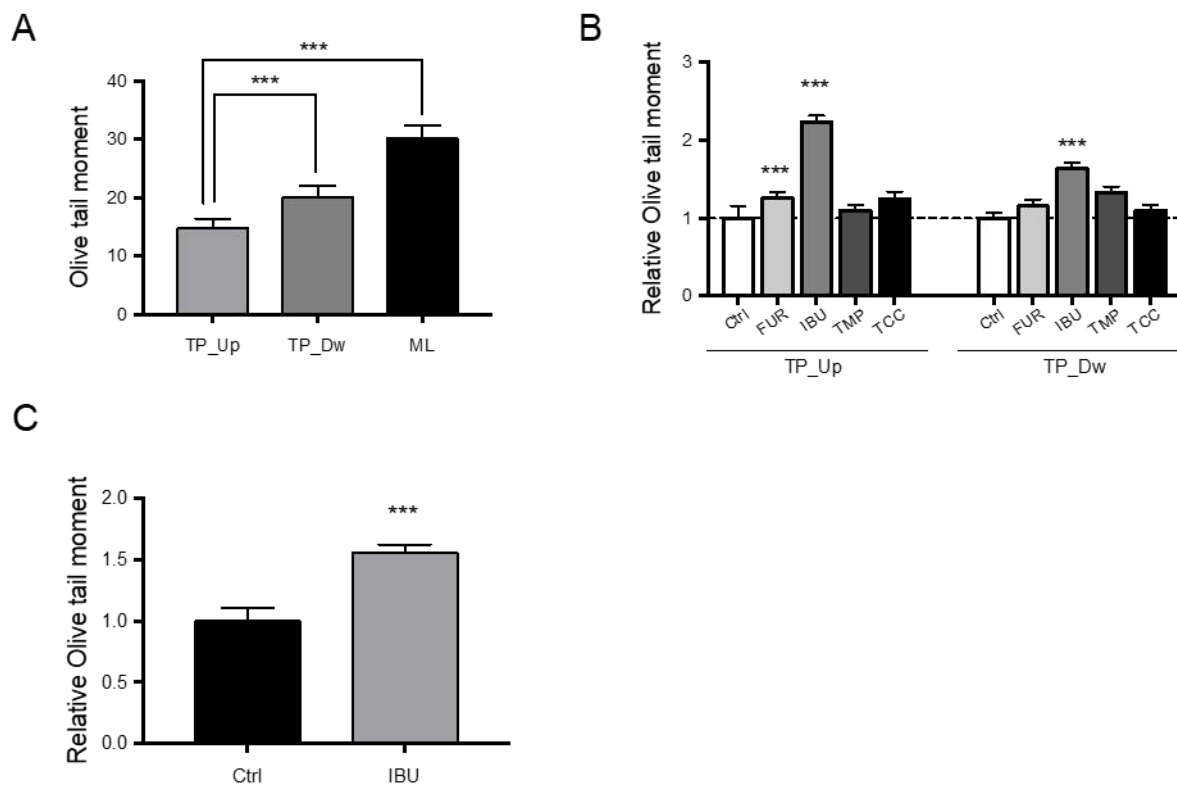


Figura 56 – Danno basale al DNA di *B. alpinus* misurato tramite l'Olive Tail Moment per i siti d'indagine ML, TP_Up e TP_dw. Danno al DNA misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione acuta a contaminanti emergenti in *B. alpinus* per i siti d'indagine TP_Up (A) e TP_dw (B) e ML (C). FUR = furosemide, IBU = ibuprofene, TMP = trimethoprim, TCC = triclocarban. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Differenze significative (test di ANOVA e test confronti multipli post-hoc Tuckey o test di t-Student) dal corrispondente gruppo controllo (** $p \leq 0.001$).

⁵ Se non specificato, il tempo di esposizione a NOEC/LOEC/LC calcolata <50% è di 96h. Se LC stimata (Weibul) il tempo di esposizione è indicato in Tabella 59.

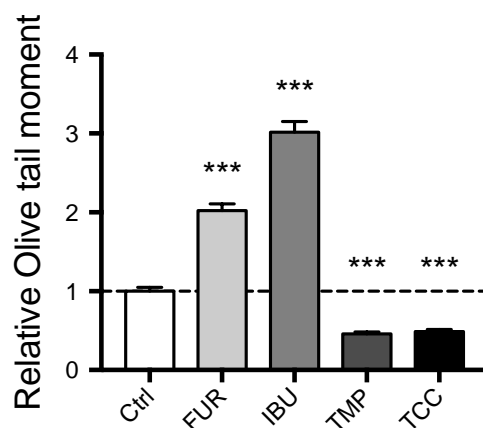


Figura 57 - Danno al DNA misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione acuta a contaminanti emergenti in *B. rhodani* per il sito d'indagine ML. FUR = furosemide, IBU = ibuprofene, TMP = trimethoprim, TCC = triclocarban. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Differenze significative (test di ANOVA, test confronti multipli post-hoc Tuckey) dal corrispondente gruppo controllo (***) ($p \leq 0.001$).

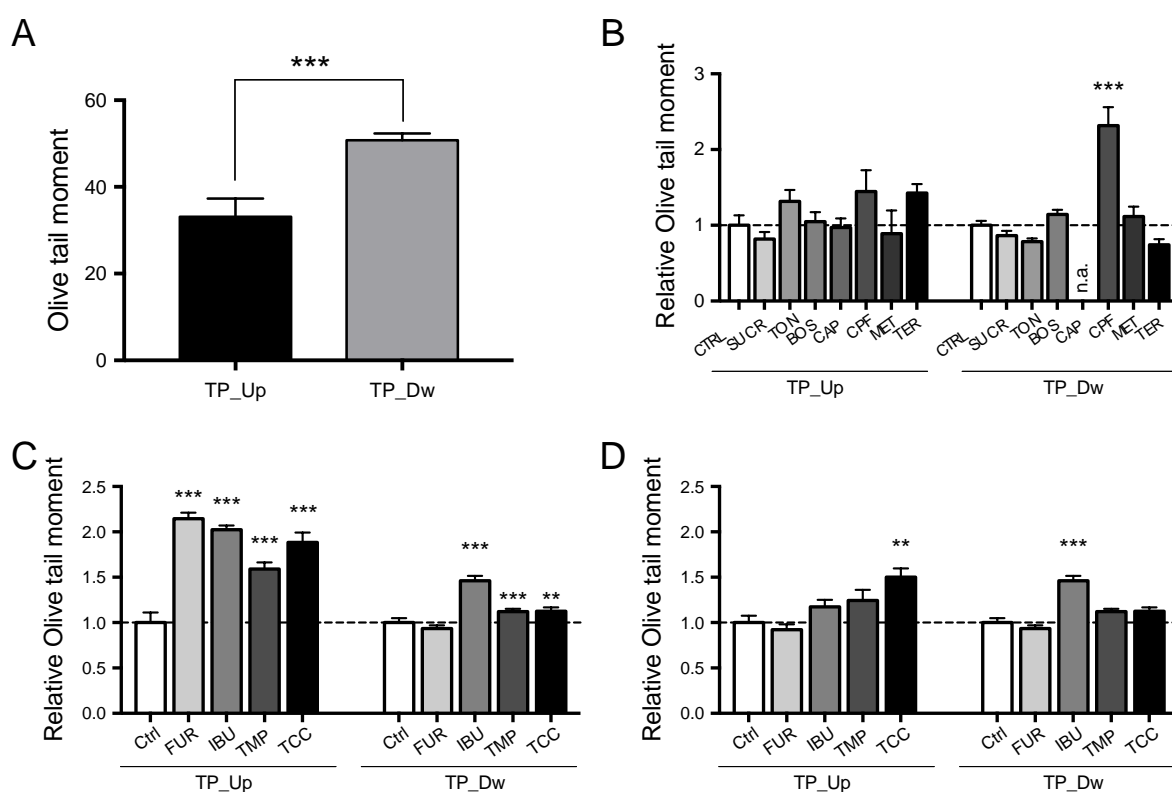


Figura 58 - (A) Danno basale al DNA di *D. cinerella* misurato tramite l'Olive Tail Moment per i siti d'indagine TP_Up e TP_dw. (B) Danno al DNA misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione breve (24h) a contaminanti emergenti e pesticidi in *D. cinerella* per i siti d'indagine TP_Up e TP_dw. (C-D) Danno al DNA misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione breve (24h) a prodotti farmaceutici e per la cura della persona in *D. cinerella* per i siti d'indagine TP_Up e TP_dw per esposizione breve (24h) (C) e lunga (96h) (D). FUR = furosemide, IBU = ibuprofene, TMP = trimethoprim, TCC = triclocarban. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Differenze significative (test di ANOVA e

test confronti multipli post-hoc Tuckey o test di t-Student) dal corrispondente gruppo controllo (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

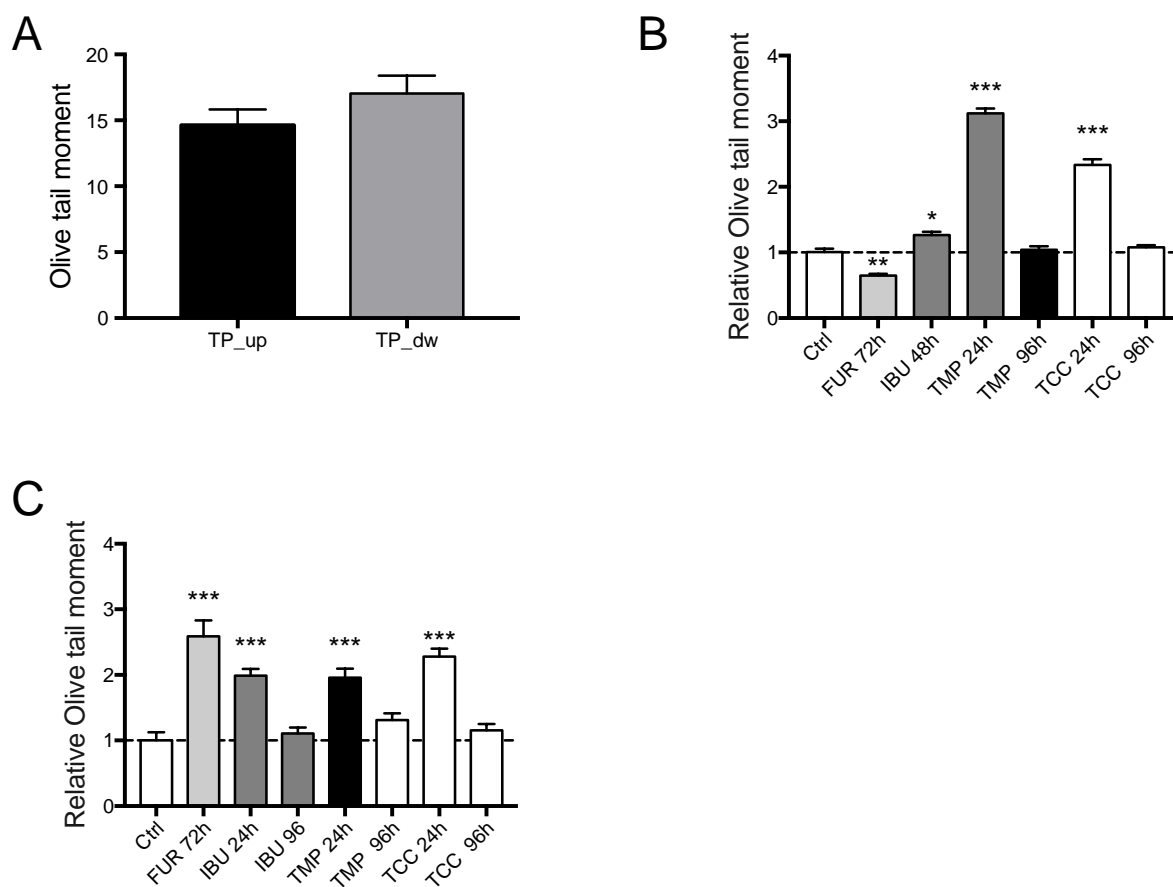


Figura 59 - (A) Danno basale al DNA di *P. branickii* misurato tramite l'Olive Tail Moment per i siti d'indagine TP_Up e TP_dw. Danno al DNA misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione a contaminanti emergenti in *P. branickii* per i siti d'indagine TP_Up (B) e TP_dw (C). FUR = furosemide, IBU = ibuprofene, TMP = trimethoprim, TCC = triclocarban. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Differenze significative (test di ANOVA, test confronti multipli post-hoc Tuckey) dal corrispondente gruppo controllo (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

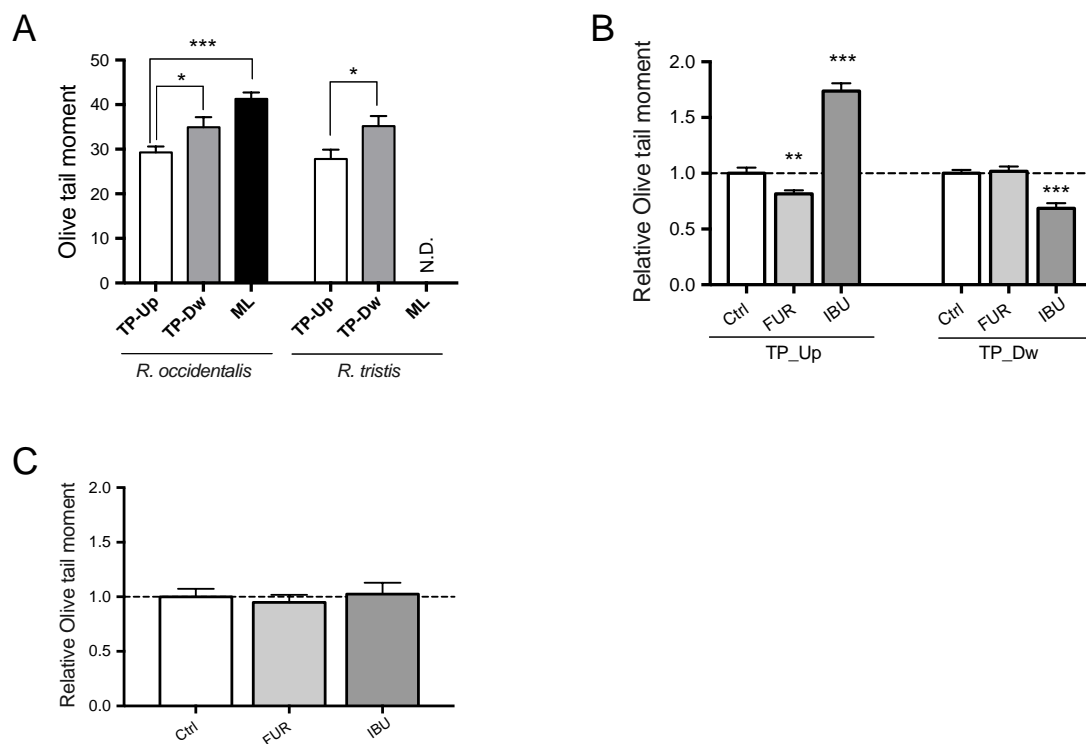


Figura 60 - (A) Danno basale al DNA di *Rhyacophila occidentalis* e *Rhyacophila tristis* misurato tramite l'Olive Tail Moment per i siti d'indagine TP_Up e TP_dw e ML. Danno al DNA misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione acuta a contaminanti emergenti in *R. occidentalis* per i siti d'indagine TP_Up e TP_dw (B) e ML (C). FUR = furosemide, IBU = ibuprofene, Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Differenze significative (test di ANOVA e test confronti multipli post-hoc Tuckey o test di t-Student) dal corrispondente gruppo controllo (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

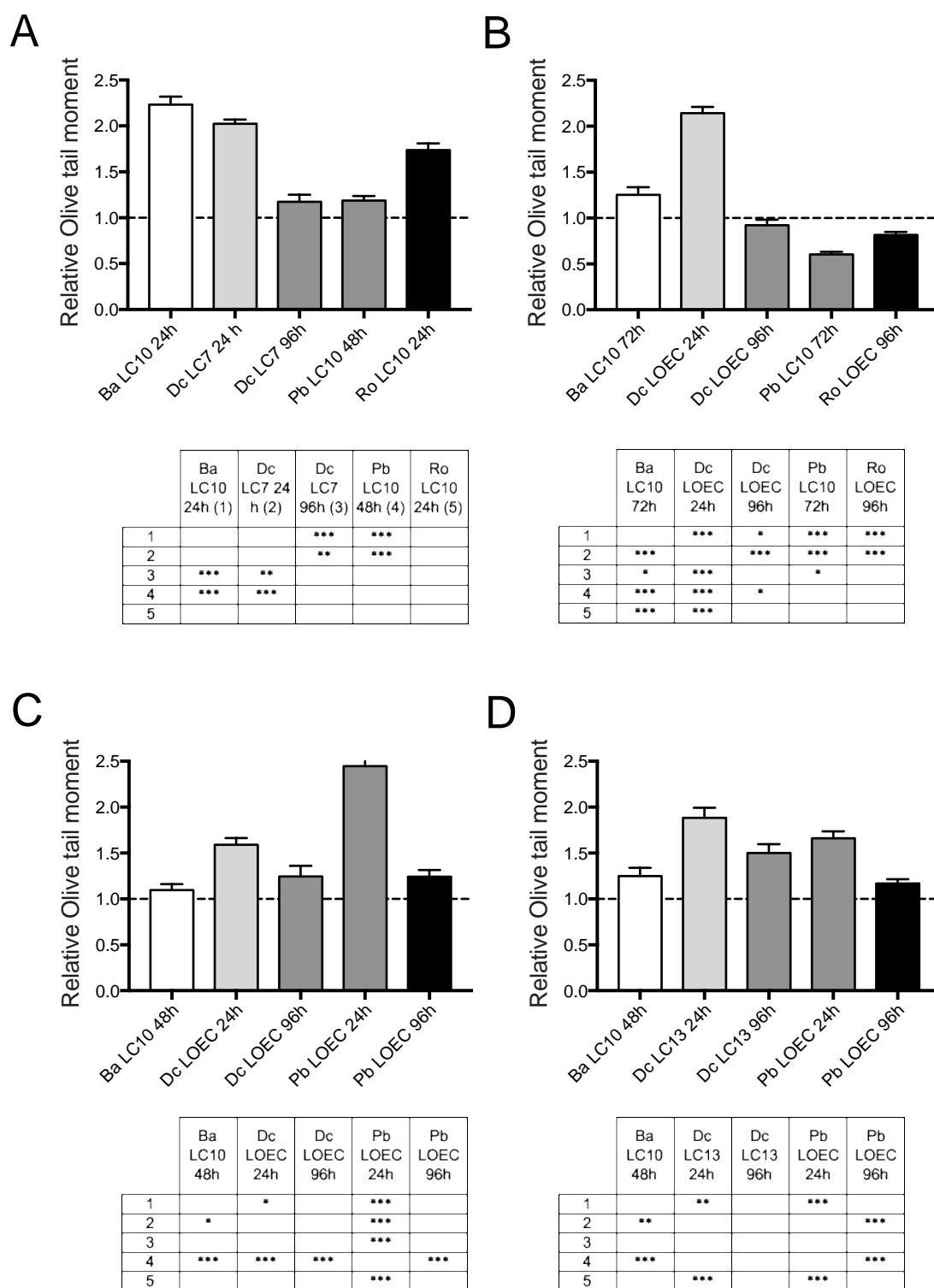


Figura 61 - Danno al DNA misurato tramite l'*Olive Tail Moment* causato dall'esposizione acuta a (A) ibuprofene, (B) furosemide, (C) trimethoprim e (D) triclocarban per il sito d'indagine TP_Up. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Le Tabelle riportano i risultati dei confronti multipli ottenuti, dopo analisi di ANOVA, con il test post-hoc di Tuckey (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

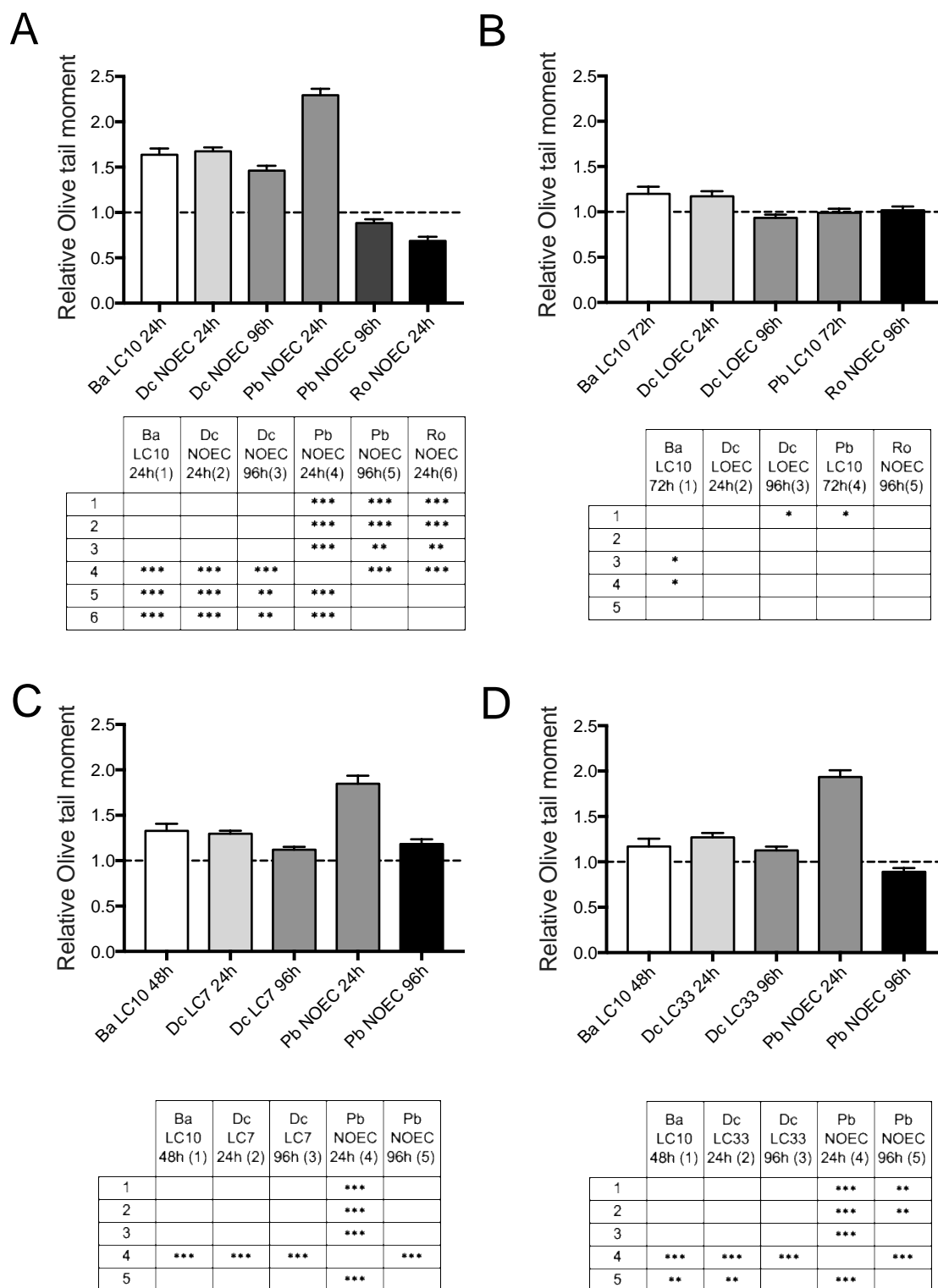


Figura 62 - Danno al DNA misurato tramite l'*Olive Tail Moment* causato dall'esposizione acuta a (A) ibuprofene, (B) furosemide, (C) trimethoprim e (D) triclocarban per il sito d'indagine TP_Dw. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Le Tabelle riportano i risultati dei confronti multipli ottenuti, dopo analisi di ANOVA, con il test post-hoc di Tuckey (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

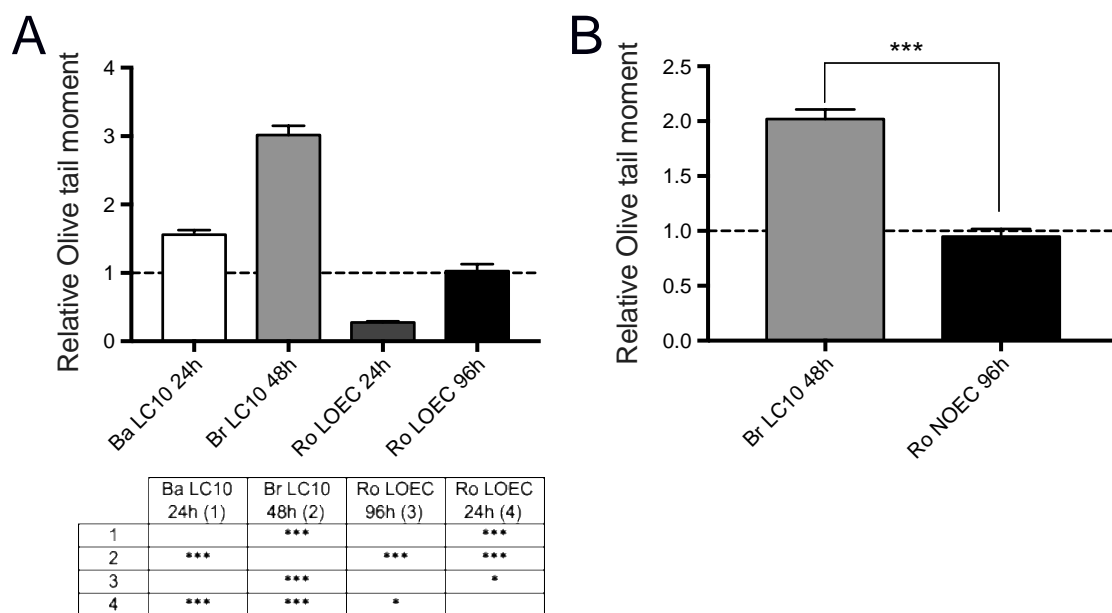


Figura 63 - Danno al DNA misurato tramite l'*Olive Tail Moment* causato dall'esposizione acuta a (A) ibuprofene e (B) furosemide per il sito d'indagine ML. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. La Tabella sotto grafico (A) riporta i risultati dei confronti multipli ottenuti, dopo analisi di ANOVA, con il test post-hoc di Tuckey (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). Per il grafico (B): test di t-Student (*** $p \leq 0.001$).

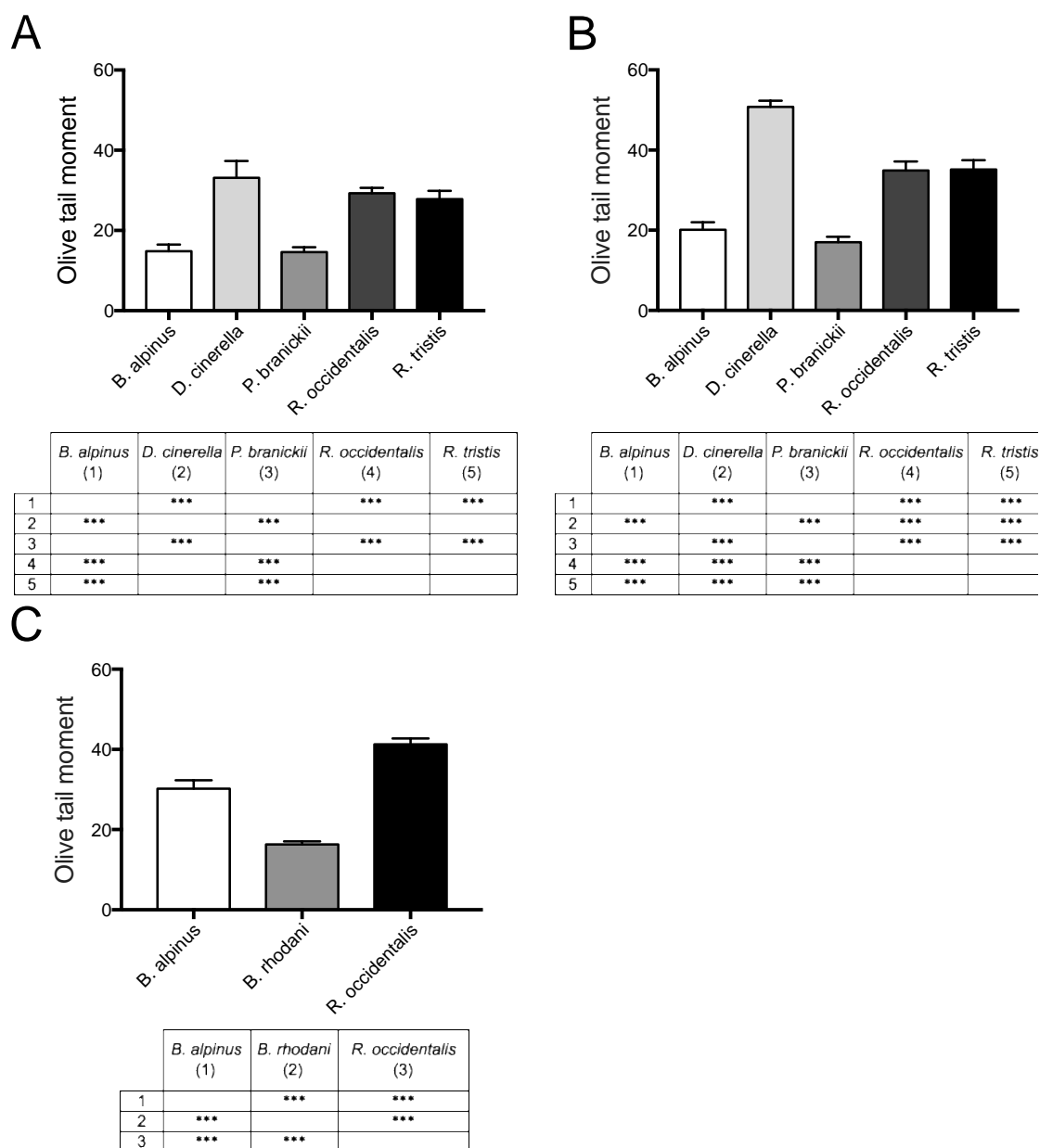


Figura 64 - Danno basale al DNA misurato tramite l'Olive Tail Moment per i siti di indagine (A) TP_Up e (B) TP_Dw e (C) ML. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Le Tabelle sotto grafico riportano i risultati dei confronti multipli ottenuti, dopo analisi di ANOVA, con il test post-hoc di Tuckey (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

Stagione estiva

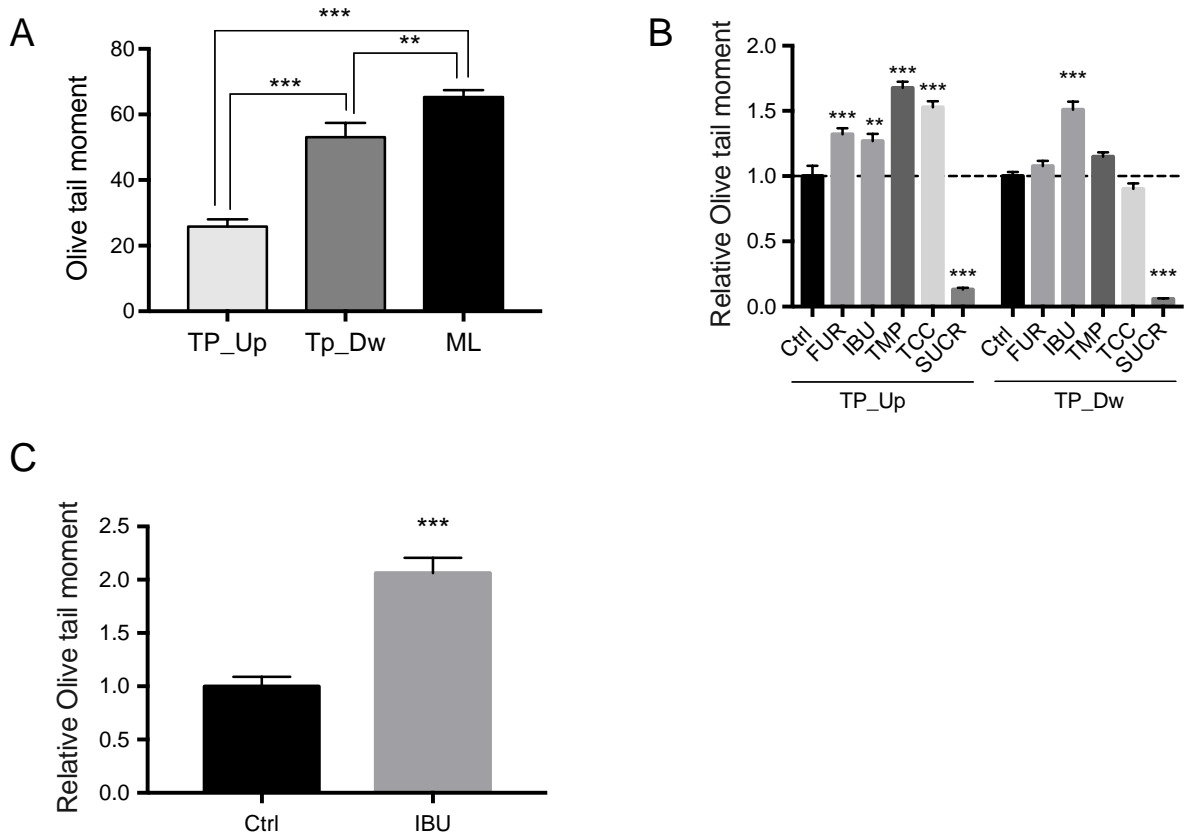


Figura 65 - (A) Danno basale al DNA di *B. alpinus* misurato tramite l'Olive Tail Moment per i siti d'indagine ML, TP_Up e TP_dw. Danno al DNA misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione acuta a contaminanti emergenti in *B. alpinus* per i siti d'indagine TP_Up e TP_dw (B) e ML (C). FUR = furosemide, IBU = ibuprofene, TMP = trimethoprim, TCC = triclocarban, SUCR = sucralosio. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard del Relative Olive Tail Moment. Differenze significative (test di ANOVA e test confronti multipli post-hoc Tuckey o test di t-Student) dal corrispondente gruppo controllo (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

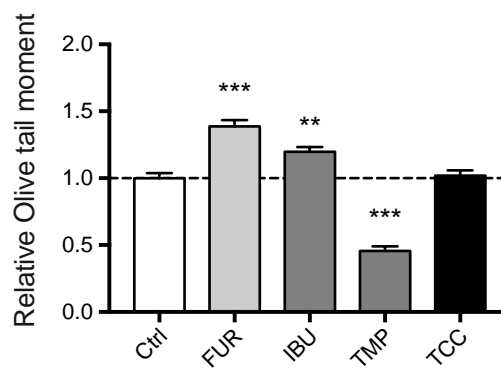


Figura 66 - Danno al DNA misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione acuta a contaminanti emergenti in *B. rhodani* per il sito d'indagine ML. FUR = furosemide,

IBU = ibuprofene, TMP = trimethoprim, TCC = triclocarban. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Differenze significative (test di ANOVA, test confronti multipli post-hoc Tuckey) dal corrispondente gruppo controllo (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

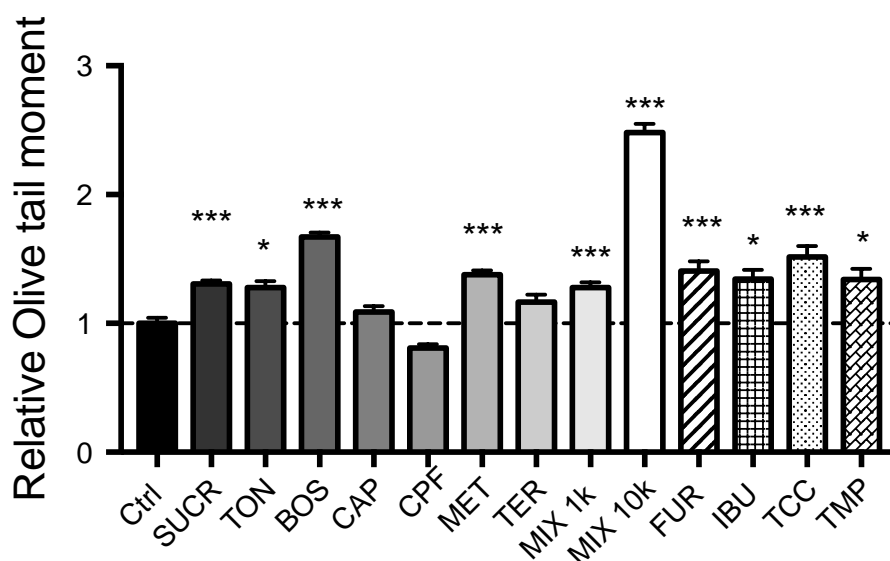


Figura 67 - Danno al DNA misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione acuta a contaminanti emergenti in *D. zernyi* per il sito d'indagine PR0. SUCR = sucralosio; TON = tonalide, BOS = boscalid, CAP = captan, CPF = chlorpyrifos, MET = metolachlor, TER = terbutilazina, MIX1K = 103 x EC of CHL, MET, TER; MIX10K = 104 x EC of CHL, MET, TER. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Differenze significative (test di ANOVA, test confronti multipli post-hoc Tuckey) dal corrispondente gruppo controllo (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

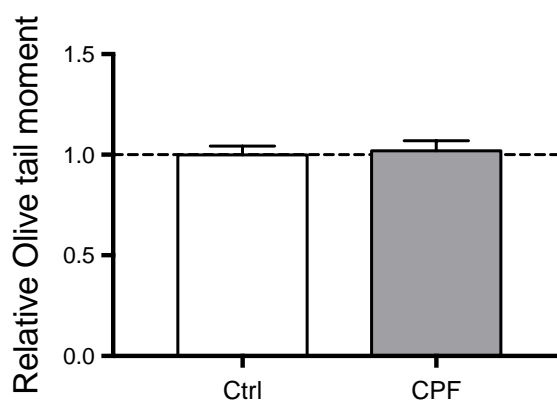


Figura 68 - Danno al DNA misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione acuta all'insetticida chlorpyrifos (CPF) in *D. latitarsis* per il sito d'indagine PR0. L'istogramma mostra la media \pm errore standard. Differenze significative (test t-Student) dal corrispondente gruppo controllo (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

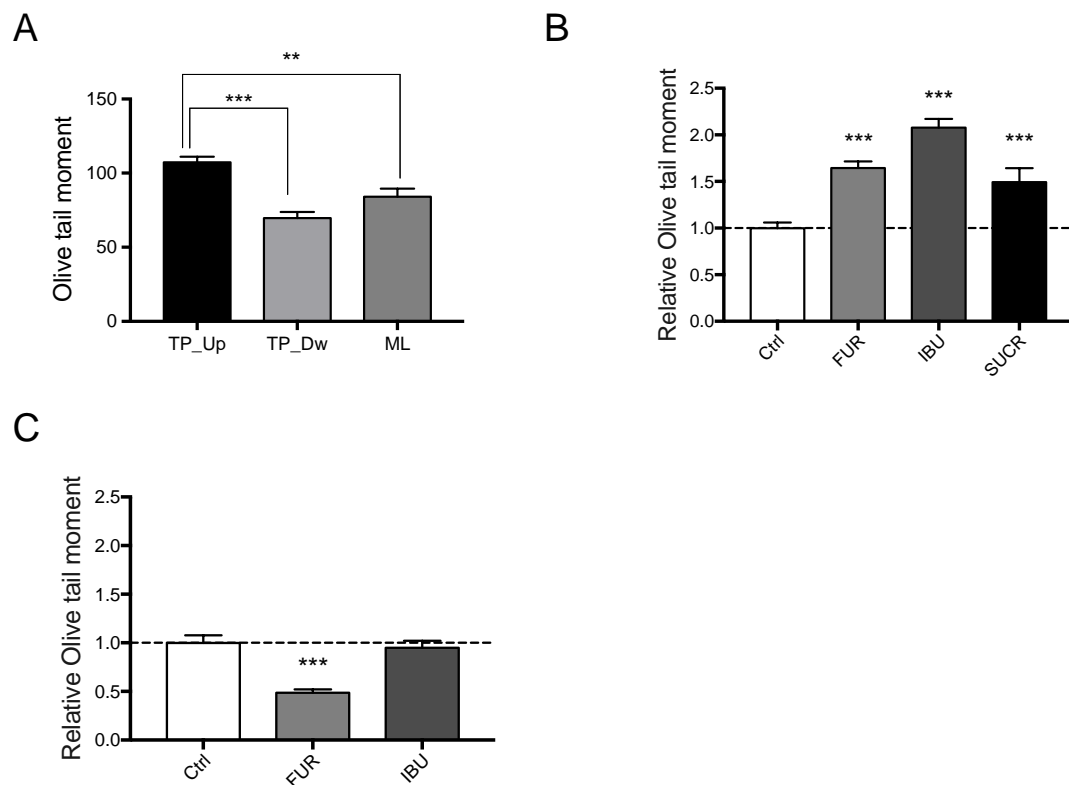


Figura 69 - (A) Danno basale al DNA di *Rhyacophila occidentalis* misurato tramite l'Olive Tail Moment per i siti d'indagine TP_Up e TP_dw e ML. Danno al DNA misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione acuta a contaminanti emergenti in *R. occidentalis* per i siti d'indagine TP_dw (B) e ML (C). FUR = furosemide, IBU = ibuprofene, SUCR = sucralosio. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Differenze significative (test di ANOVA e test confronti multipli post-hoc Tuckey) dal corrispondente gruppo controllo (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

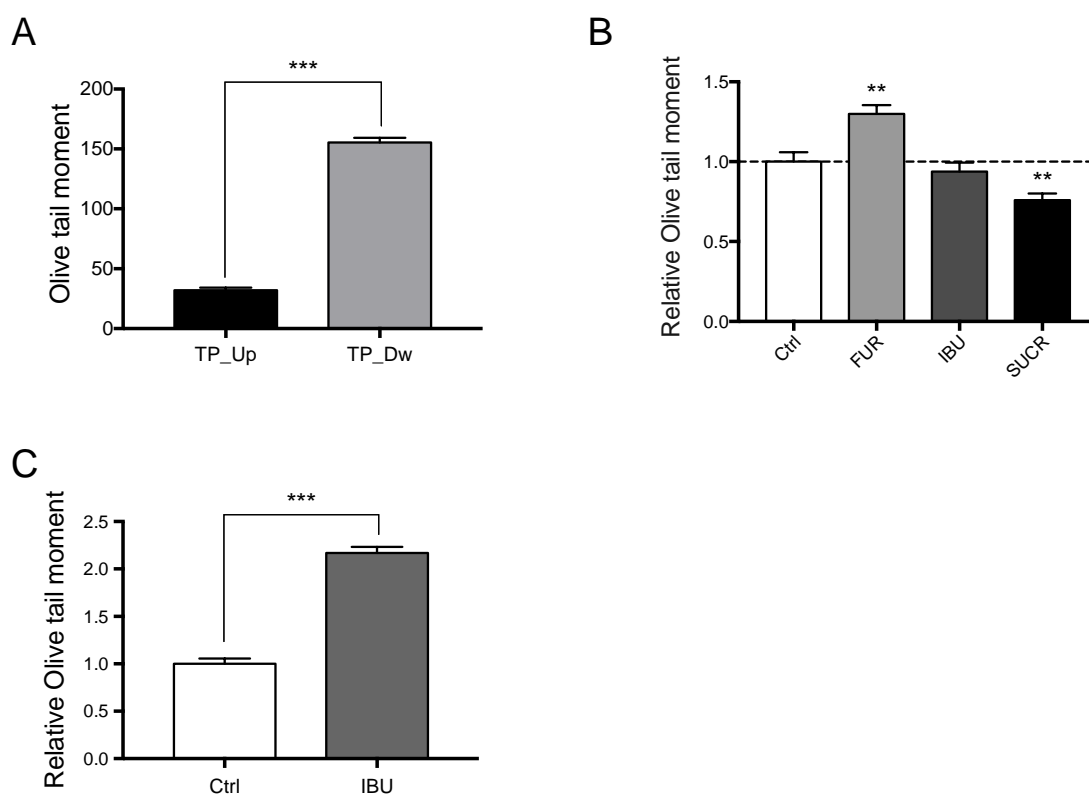


Figura 70 - (A) Danno basale al DNA di *Rhyacophila tristis* misurato tramite l'Olive Tail Moment per i siti d'indagine TP_Up e TP_Dw. Danno al DNA misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione acuta a contaminanti emergenti in *R. tristis* per i siti d'indagine TP_Up (B) e TP_Dw (C). FUR = furosemide, IBU = ibuprofene, SUCR = sucralosio. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Differenze significative (test di ANOVA e test confronti multipli post-hoc Tuckey o test t-Student) dal corrispondente gruppo controllo (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

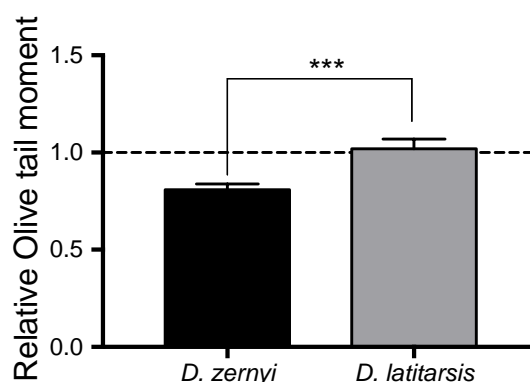


Figura 71 - Danno al DNA misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione acuta CPF per il sito d'indagine PR0. L'istogramma mostra la media \pm errore standard. Differenze significative (test t-Student) dal corrispondente gruppo controllo (** $p \leq 0.001$).

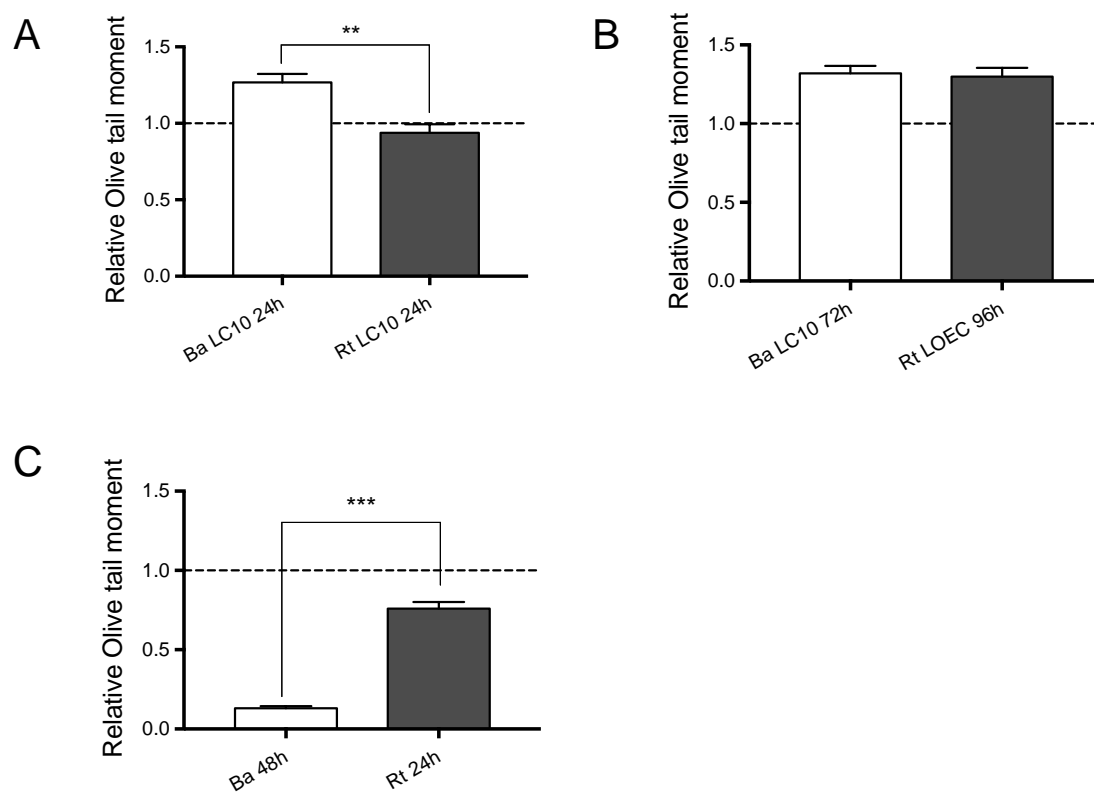


Figura 72 - Danno al DNA misurato tramite l'*Olive Tail Moment* causato dall'esposizione acuta a (A) ibuprofene e (B) furosemide e (C) sucralosio per il sito d'indagine TP_Up. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Test di t-Student (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

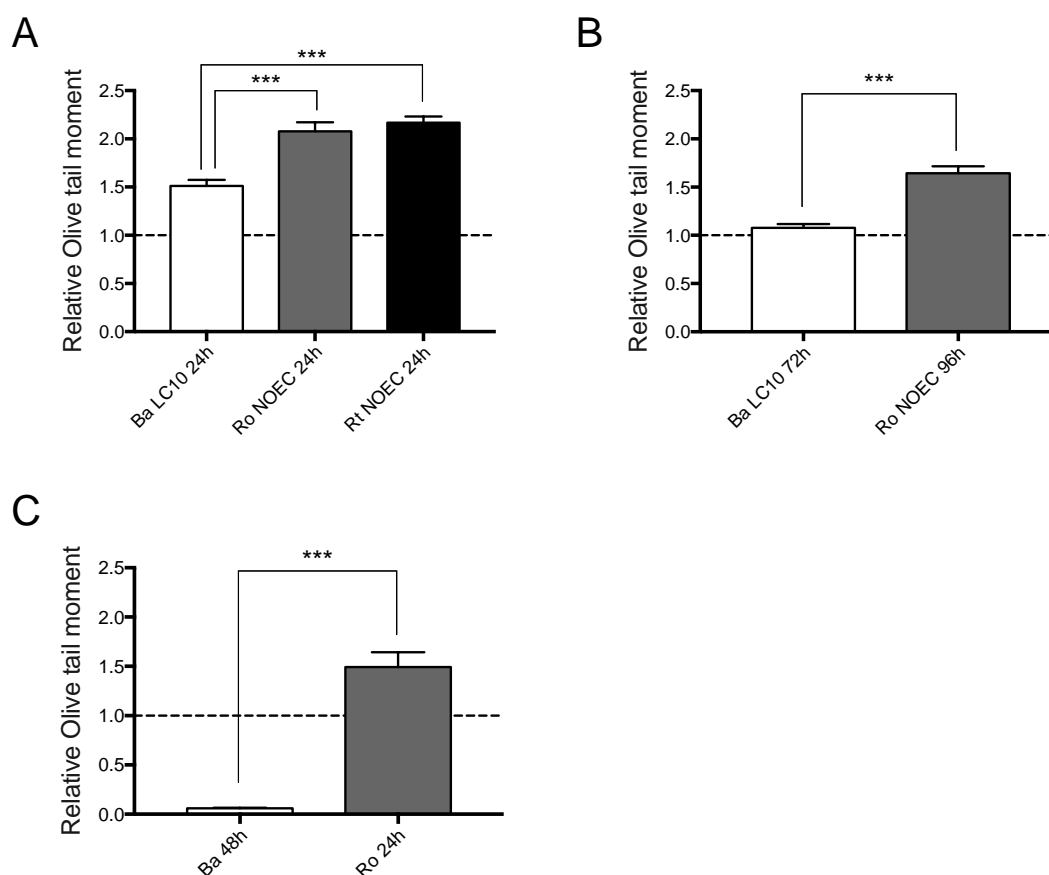


Figura 73 - Danno al DNA misurato tramite l'*Olive Tail Moment* causato dall'esposizione acuta a (A) ibuprofene e (B) furosemide e (C) sucralosio per il sito d'indagine TP_Dw. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Analisi di ANOVA, con il test post-hoc di Tuckey o test di t-Student (** $p \leq 0.001$)

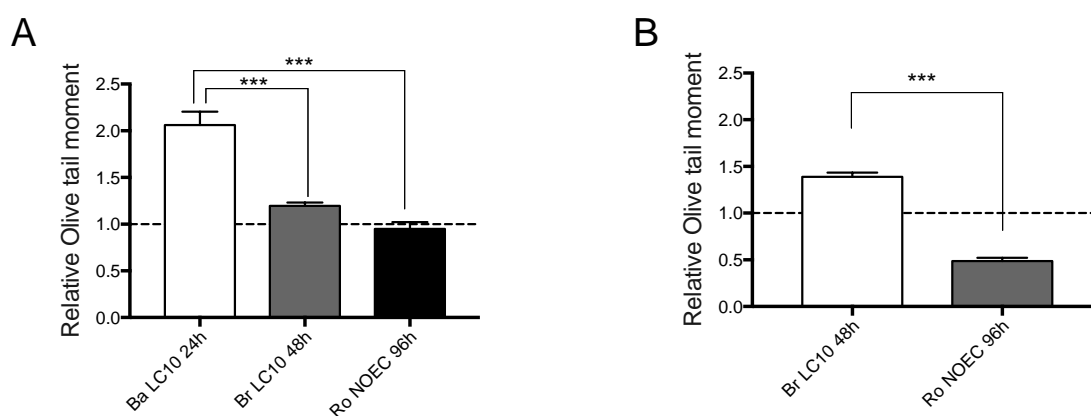


Figura 74 - Danno al DNA misurato tramite l'*Olive Tail Moment* causato dall'esposizione acuta a (A) ibuprofene e (B) furosemide per il sito d'indagine ML. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Analisi di ANOVA, con il test post-hoc di Tuckey o test di t-Student (** $p \leq 0.001$).

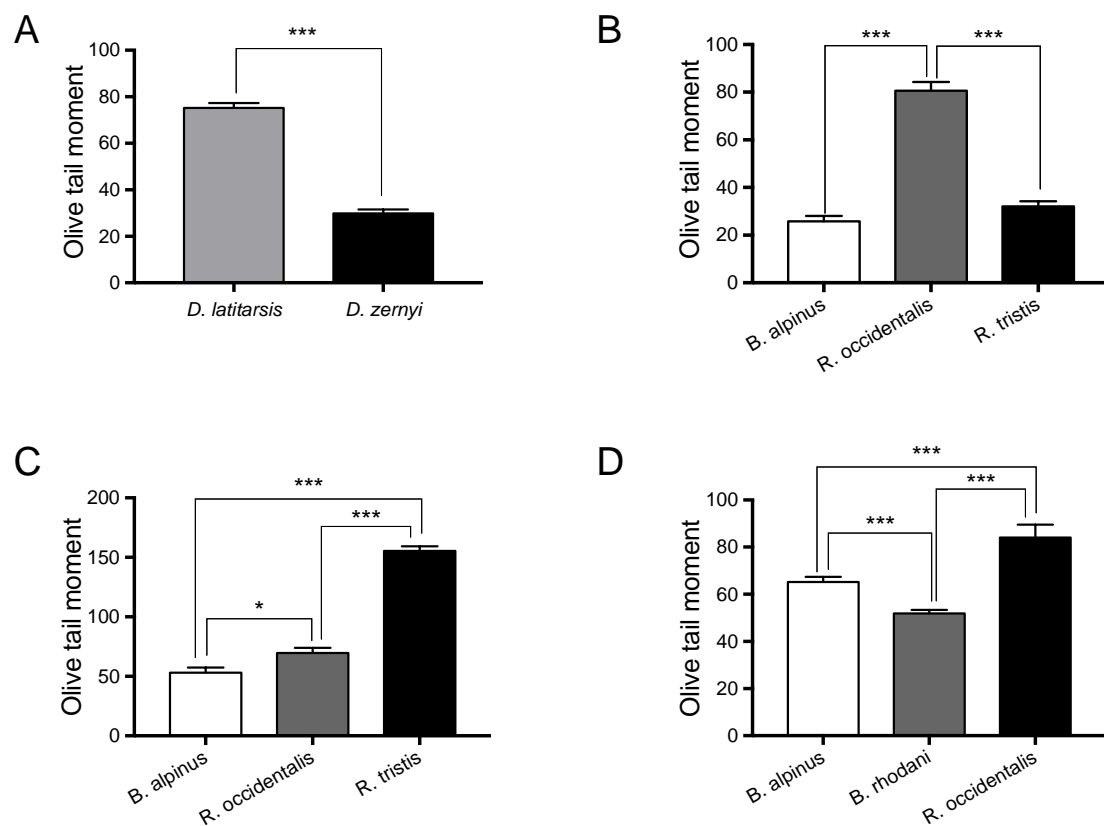


Figura 75 - Danno basale al DNA misurato tramite l'*Olive Tail Moment* per i siti di indagine (A) PR0 (B) TP_Up, (C) TP_Dw e (D) ML. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Analisi di ANOVA, con il test post-hoc di Tuckey o test di t-Student (* $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$).

Confronto stagione invernale/estiva

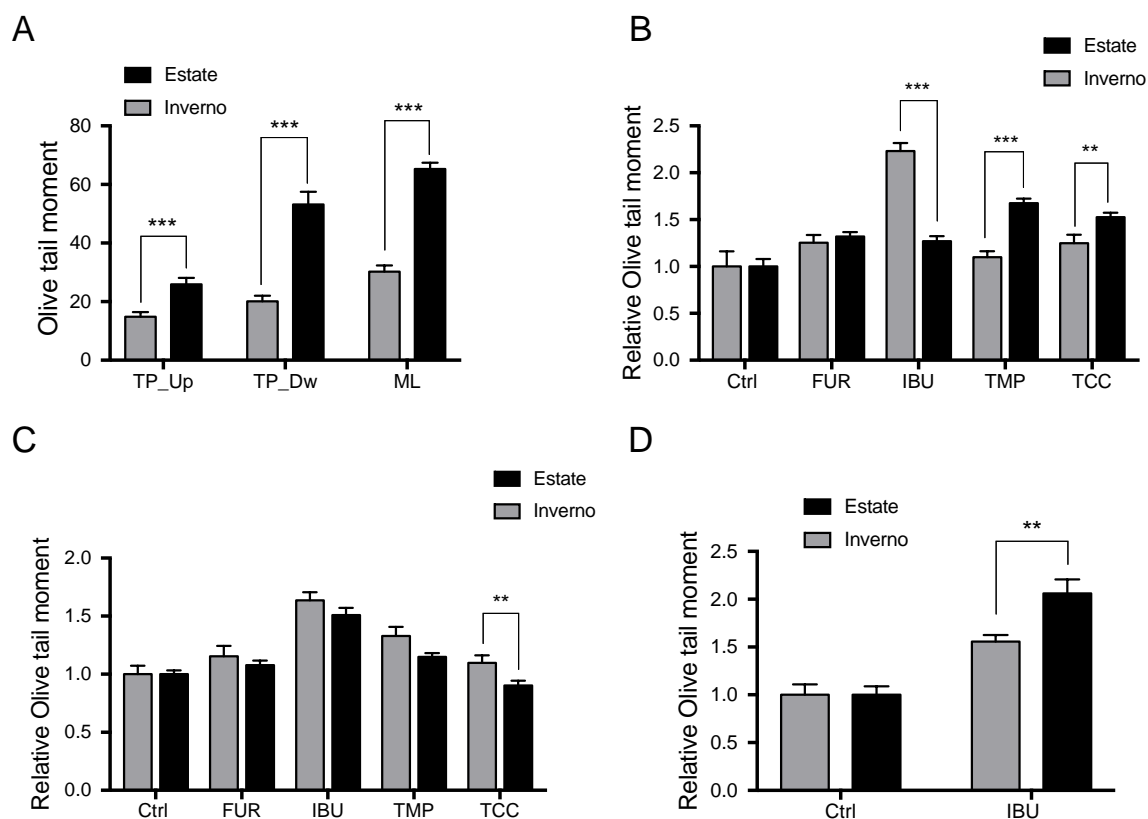


Figura 76 – (A) Danno basale al DNA di *B. alpinus* misurato tramite l'Olive Tail Moment per i siti d'indagine ML, TP_Up e TP_dw nelle due stagioni: inverno ed estate. Danno al DNA misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione acuta a contaminanti emergenti in *B. alpinus* per i siti d'indagine (B) TP_Up, (C) TP_dw e (D) ML. FUR = furosemide, IBU = ibuprofene, TMP = trimethoprim, TCC = triclocarban. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Differenze significative (test di t-Student) (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

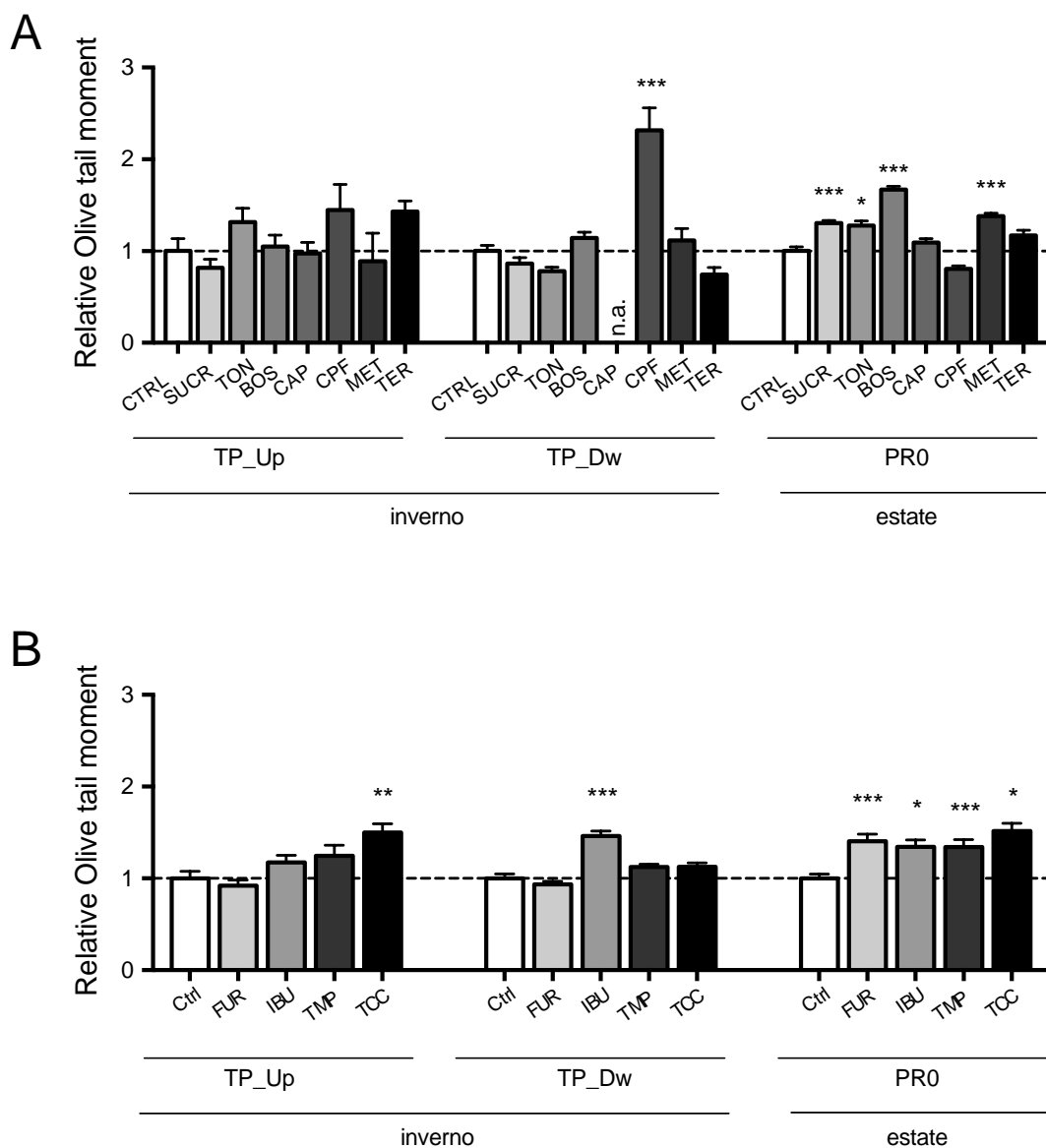


Figura 77 - (A) Danno al DNA in *Diamesa* spp. misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione acuta a contaminanti emergenti e pesticidi nelle due stagioni: inverno ed estate. Danno al DNA in *Diamesa* spp. misurato tramite l'Olive Tail Moment causato dall'esposizione acuta prodotti farmaceutici e di igiene personale nelle due stagioni: inverno ed estate. Gli istogrammi mostrano la media \pm errore standard. Differenze significative (Analisi di ANOVA, con il test post-hoc di Tuckey o test di t-Student) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

Discussione

Stagione invernale

Risposte per specie

Baetis alpinus

I controlli provenienti dalla stazione a monte del depuratore hanno mostrato un livello di danno basale inferiore a quelli provenienti dalla stazione a valle, suggerendo che la popolazione a valle dell'impianto di trattamento acque reflue presenti un maggiore livello di danno basale e sia in uno stato fisiologico di maggiore stress. Questi risultati confermano l'ipotesi di un impatto negativo sulla popolazione acquatica causato dagli scarichi dell'impianto di trattamento acque reflue. Nella stazione di ML, i controlli hanno presentato un livello ancora più alto di danno. Si è inoltre evidenziata una particolare sensibilità del *B. alpinus* al farmaco ibuprofene che è risultato genotossico per gli esemplari raccolti in tutti e tre i siti di indagine.

Baetis rhodani

Similmente a quanto osservato per l'altra specie del genere *Baetis* testata (*B. alpinus*) ibuprofene e furosemide sono risultate in grado di creare genotossicità in questa specie.

Diamesa cinerella

Anche in *D. cinerella*, come in *B. alpinus*, i controlli provenienti dalla stazione a monte del depuratore hanno mostrato un livello di danno basale inferiore a quelli provenienti dalla stazione a valle; evidenziando una condizione di stress degli animali in natura determinata dagli scarichi dell'impianto di trattamento acque reflue. *D. cinerella* è risultata però sorprendentemente resistente alla maggioranza dei contaminanti emergenti e pesticidi testati. In generale, inoltre, in tutti i campioni del sito a monte esposti ai prodotti farmaceutici e per la cura della persona è stato rilevato un danno maggiore rispetto ai campioni del sito a valle e, per lo stesso tossico, l'esposizione breve (24h) ha portato ad un danno maggiore rispetto all'esposizione prolungata (96h). La riduzione di genotossicità all'aumentare del tempo di esposizione potrebbe essere dovuta all'attivazione di meccanismi di difesa antiossidanti e di riparazione del DNA come già osservato in altri organismi (Santa-Gonzalez et al., 2016).

Pseudodiamesa branickii

A differenza di *D. cinerella* nel caso di *P. branickii* non si assiste ad un chiaro aumento del danno nella popolazione a monte del depuratore rispetto a quella a valle. 3 delle 4 molecole testate infatti sono risultate essere genotossiche sia a monte che a valle (IBU, TCC e TMP) e solo la FUR è risultata essere più dannosa a valle del depuratore. In generale, però, anche per *P. branickii*, l'esposizione breve (24h) porta ad un maggior danno al DNA rispetto all'esposizione di 96h.

Rhyacophila spp.

Valutando complessivamente i risultati al livello di genere (*R. occidentalis* + *R. tristis*), nei siti TP i controlli hanno mostrato un andamento crescente di stress monte verso valle, corroborando i risultati ottenuti per *B. alpinus* e *Diamesa cinerella*, dove la popolazione a monte del depuratore sembrerebbe in una condizione fisiologica meno stressata rispetto a quella a valle degli scarichi dell'impianto di trattamento acque reflue. La popolazione a monte è risultata essere inoltre più sensibile all'ibuprofene, molecola che a valle porta persino ad una riduzione del danno al DNA rispetto al controllo. Il furosemide ha presentato una tendenza inversa, con danno a PTv più elevato ma non diverso dal controllo. Per quanto concerne il sito ML, i livelli di danno sono risultati inferiori a quelli osservati per gli esemplari di PT, e nessuno significativamente diverso dal danno dei controlli.

Risposte per sito

PTm

Tra i predatori, *P. branickii* ha presentato i livelli più bassi di danno nelle esposizioni con ibuprofene e furosemide ma alti livelli per trimethoprim e triclocarban. Fra i non predatori *B. alpinus* è risultato quello con maggior danno nei test con ibuprofene, mentre *D. cinerella* nei test con furosemide.

PTv

Differentemente dal sito PTm, *P. branickii* ha presentato il valore più elevato di danno nel test con ibuprofene, mentre per furosemide nessuna specie ha evidenziato un significativo aumento del danno. Il predatore *P. branickii* è invece la specie che sembra soffrire maggiormente dell'esposizione a trimethoprim e triclocarban.

ML

In questo sito, *B. rhodani* ha mostrato il livello di danno più elevato nell'esposizione ad ibuprofene, mentre *R. occidentalis* ha mostrato il livello più basso di danno tra le specie testate. *B. rhodani* ha mostrato anche il livello più alto di danno con furosemide, significativamente più alto di quello mostrato da *R. occidentalis*. I valori di NOEC di questa specie nel sito ML è però di molto inferiore a quello calcolato per la stessa specie nei siti TP, suggerendo una maggiore sensibilità della popolazione di ML di *R. occidentalis* nei confronti di questa molecola.

Danno basale

In tutti i siti di campionamento, *Diamesa cinerella* e *Rhyacophila spp.* hanno presentato il più elevato livello di danno basale. *D. cinerella* ha inoltre mostrato il maggiore incremento di danno da PTm a Ptv: è quindi tra le specie che mostrano più sofferenza di altre agli scarichi dell'impianto di trattamento acque reflue.

Stagione estiva

Risposte per specie

Baetis alpinus

Similmente a quanto già osservato per varie specie della stagione invernale anche tra le diverse popolazioni di *B. alpinus* raccolte alle tre stazioni d'indagine in estate si sono registrate delle differenze significative. Il campione raccolto al PTm risulta infatti aver un danno basale al DNA più basso rispetto agli altri. Il campione raccolto al PTv è superiore al PTm, ma significativamente inferiore al campione del sito ML.

Dalle prove di genotossicità causata da prodotti farmaceutici e per la cura della persona svolte con *B. alpinus*, si può inoltre ipotizzare che la popolazione a valle del depuratore abbia una maggiore resistenza a questi tossici. Un risultato interessante è stato quello del sucralosio alla stazione PTm. L'*Olive Tail Moment* ottenuto è molto più basso sia del controllo corrispondente sia a monte che a valle. Sembra che l'esposizione di *B. alpinus* al SUCR porti ad una riduzione del danno al DNA o favorisca la sua riparazione. Questa risposta al SUCR è confermata anche dalla prova su *B. alpinus* del PTv. Anche in questo caso, infatti, l'esposizione al SUCR ha dato risultati molto più bassi di quelli del controllo corrispondente.

Baetis rhodani

L'esposizione al furosemide e all'ibuprofene ha avuto effetti significativi su *Baetis rhodani* di ML. Il danno maggiore è dato dal furosemide. L'esposizione a TMP sembra invece portare a una riduzione del danno al DNA. Un effetto di questo tipo, però, non è stato osservato nelle prove su *B. alpinus* del PT, in quei casi, infatti, non sono stata ottenuta una riduzione significativa del danno tra TMP e controllo (ma un aumento a PTm e nessuna variazione a PTv).

Diamesa zernyi

Tra le sostanze testate nelle prove con *D. zernyi* il danno maggiore è stato causato dal MIX 10K. Un danno così intenso al DNA conferma la tossicità del Mix di pesticidi osservata nel test di tossicità acuta. Anche il boscalid ha fatto registrare un'evidente azione di danno al DNA. Questo risultato permette di avere maggiori informazioni sull'azione di questo fungicida, che se pur non ha causato mortalità tra le larve ne ha danneggiato il DNA. I farmaci causano un danno di livello simile tra loro. L'esposizione al SUCR ha un effetto positivo inversamente a quello che si è visto per *Baetis alpinus*. Per il captan e il chlorpyrifos, testati all'LC10 stimata, il danno è stato non differente da quello dei controlli corrispondenti. Pur causando mortalità acuta, sembrano non agire direttamente sul DNA.

Diamesa latitarsis

L'esposizione a chlorpyrifos, pur determinando mortalità, non determina nessun accumulo di danno al DNA in questa specie. Questo risultato valida il quello trovato per l'altra specie di *Diamesa* campionata nello stesso sito: *D. zernyi*.

Rhyacophila occidentalis

La relazione osservata per il danno basale di *B. alpinus* del PTm, PTv e ML non si ripresenta in *Rhyacophila occidentalis*. In PTm il controllo è più alto del corrispondente del PTv e anche di quello di ML. I test con le sostanze evidenziano però una maggiore sensibilità della popolazione PTv rispetto a quella di ML, anche se il livello di danno basale non differiva tra le due.

Rhyacophila tristis

Se si osservano i controlli del PTm e del PTv per *R. tristis* si ripropone lo schema visto in *B. alpinus* e *D. cinerella*, con i controlli del PTm con danno basale inferiore a quelli del PTv e quindi evidenziano un possibile danno degli scarichi dell'impianto di trattamento acque reflue sulla popolazione di *R. tristis*. Solo l'esposizione al furosemide delle larve del PTm ha portato ad un danno al DNA superiore a quello del controllo corrispondente, mentre per la popolazione PTv l'ibuprofene ha portato ad un significativo aumento. Ancora una volta per il sito PTm il SUCR sembra avere un ruolo nella riparazione del danno al DNA.

Risposte per sito

PR0

Al PR0 *D. latitarsis* ha mostrato un danno causato dall'esposizione al chlorpyrifos superiore a quello di *D. zernyi*.

PTm

L'esposizione all'ibuprofene ha determinato un danno maggiore in *B. alpinus* rispetto a *R. tristis*, inversamente al sucralosio che, pur determinando una riduzione del danno in entrambe le specie rispetto ai controlli, sembra essere più dannoso nella *R. tristis*. La risposta al furosemide è risultata simile nelle due specie testate.

PTv

Il confronto in PTv è sempre tra *B. alpinus* e le due specie del genere *Rhyacophila*. In questo caso, per tutte le sostanze testate il danno al DNA per le *Rhyacophila sp.* è superiore a quello di *B. alpinus*.

ML

Le prove di ML hanno interessato *B. alpinus*, *B. rhodani* e *R. occidentalis*. Per l'esposizione con l'ibuprofene, *B. alpinus* mostra, come già visto per il sito PTm, livelli di danno più alti, mentre per l'esposizione al furosemide *B. rhodani* mostra un danno superiore a *R. occidentalis*.

Danno basale

Per quanto riguarda il sito PRO, il confronto fra le due specie del genere *Diamesa* ha evidenziato un danno basale nettamente inferiore in *D. zernyi* rispetto alla *D. latitarsis*. Per il sito PTm e ML *R. occidentalis* ha evidenziato il danno più alto fra le tre specie testate; mentre sempre una specie di *Rhyacophila* è risultata la più danneggiata a livello basale (*R. tristis*) per il sito PTv.

Confronto stagione invernale/estiva

Osservando i risultati ottenuti per quanto riguarda il danno basale in *B. alpinus* raccolto nelle due stagioni testate possiamo concludere che gli animali nella stagione fredda sembrano essere in una condizione fisiologica meno stressata.

Confrontando invece la risposta all'esposizione ai tossici degli esemplari delle due stagioni nei tre siti di indagini, si può concludere che la risposta non è univoca, ed è difficile trarre una conclusione generale sull'effetto della stagione nella resistenza ai tossici. Per esempio osservando il sito a monte del depuratore si può vedere come gli esemplari di *B. alpinus* abbiano una maggiore resistenza all'ibuprofene in estate (quando presentano il danno basale superiore), mentre per TMP e TCC sono più resistenti in inverno. Nel sito a valle fra inverno ed estate si sono ritrovate poche differenze, con solo il TCC che causa più danno d'estate. Al sito ML è stato testato solo l'ibuprofene che però dà una risposta inversa rispetto a quella del sito PTm, ossia una maggiore genotossicità in estate. È chiaro quindi che la risposta degli animali alle sostanze tossiche non è univoca. Questo suggerisce che, è necessario analizzare esemplari provenienti da siti diversi e in stagioni diverse per trarre conclusioni sugli effetti e il comportamento di una determinata sostanza su una specie.

Osservando invece il genere *Diamesa* e il suo comportamento in risposta all'esposizione ai tossici nelle due stagioni si può notare come sia per quanto riguarda i contaminanti emergenti che, in generale, per quanto riguarda i prodotti farmaceutici e per la cura della persona, gli animali della stagione estiva sembrano essere quelli più sensibili al danno al DNA causato da questi tossici. Questo risultato, più chiaro ma differente da quello ottenuto per *B. alpinus*, porta alla luce la necessità di utilizzare differenti specie, meglio se appartenenti a livelli trofici differenti, per trarre conclusioni sugli effetti e il comportamento di una sostanza a livello di ecosistema.

3.15.5 Obiettivo 3.5: Valutazione di stress ossidativo da chlorpyrifos in *Diamesa* spp. (settembre 2016-febbraio 2018)

Lo stress ossidativo è stato valutato attraverso il rilievo di alterazioni indotte su proteine e lipidi, ovvero con la quantificazione della perossidazione lipidica e della carbonilazione delle proteine. Lo stress ossidativo è un insieme di modifiche che avvengono a livello di tessuti, cellule e macromolecole biologiche, dovute all'esposizione di queste ad agenti ossidanti (Betteridge, 2000). Gli agenti ossidanti possono essere di tipo endogeno (esempio prodotti da un processo antiinfiammatorio) o di tipo esogeno (esempio prodotti da esposizione a inquinanti, tossici, radiazioni ecc). Quando le sostanze ossidanti, tra cui le più importanti sono le specie reattive dell'ossigeno (ROS), prevalgono e/o le difese antiossidanti si riducono, si instaura una condizione di stress ossidativo nella cellula può portare a diverse disfunzioni, quali danno cellulare, apoptosi

e necrosi (Sies, 1991). I ROS sono molecole altamente instabili caratterizzate da un'elevata reattività chimica. Sono in grado di ossidare le catene degli acidi grassi, gli amminoacidi delle proteine, i carboidrati e le basi azotate degli acidi nucleici, compromettendone, nei casi estremi, la funzione (Betteridge, 2000). Lo studio dello stress ossidativo si avvale principalmente di metodi in grado di rilevare le alterazioni indotte su proteine, lipidi: fra questi il rilevamento/quantificazione della perossidazione lipidica e della carbonilazione delle proteine.

Perossidazione lipidica

La perossidazione dei lipidi è causata dai ROS e il danno si osserva a livello degli acidi grassi polinsaturi, contenuti in elevate concentrazioni soprattutto nelle membrane cellulari (Mylonas and Kouretas, 1999). Il processo consiste in una serie di reazioni a catena in cui gli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi di membrana si trasformano gradualmente in perossidi lipidici. Questi ultimi possono decomorsi facilmente in diverse altre specie quali tra le quali la malonildialdeide (MDA) rappresenta uno dei maggiori prodotti terminali (Uchida, 2000). In seguito a tali cambiamenti, le membrane della cellula diventano rigide perdendo la loro fluidità e di conseguenza alterando la funzione di permeabilità selettiva che le contraddistingue (Spiteller, 2006) ed è essenziale per la sopravvivenza e funzionalità cellulare.

La Malondialdeide (MDA) è uno dei biomarcatori più utilizzati per la valutazione della perossidazione lipidica. Questo composto, che si forma in seguito all'azione dei ROS sui lipidi, è un'aldeide reattiva che causa citotossicità ed è in grado di reagire il DNA (Marnett, 1999). Per stimare lo stress ossidativo si può andare ad analizzare il livello di MDA nelle cellule.

Carbonilazione delle proteine

Per quanto riguarda le proteine, le reazioni ossidative provocate dai ROS (carbonilazione) hanno come conseguenza finale la proteolisi (degradazione delle proteine) o la loro aggregazione (Dalle Donne et al., 2003). Infatti i ROS reagendo con i residui amminoacidici sono in grado di alterare completamente le proprietà chimico-fisiche della proteina stessa (variazione del punto isoelettrico; alterazione del peso molecolare ecc). Questi cambiamenti attivano specifici enzimi proteolitici della cellula con conseguente degradazione del peptide (Dalle Donne et al., 2003). Se la carbonilazione avviene in maniera lieve, essa porta all'eliminazione della proteina da parte del proteasoma e viene mantenuta la sopravvivenza cellulare. L'eccessiva carbonilazione porta però a un fenomeno di aggregazione proteica, che rende le proteine resistenti alla degradazione proteolitica e determina l'insorgenza della morte cellulare (Dalle Donne et al., 2006). La quantificazione dei gruppi carbonilici sulle proteine è una delle misurazioni più usate per studiare il livello di stress ossidativo.

Materiali e metodi

Preparazione delle larve

Le larve utilizzate per i test di stress ossidativo (perossidazione lipidica e carbonilazione delle proteine) sono state raccolte e trattate come quelle impiegate nei test di tossicità

acuta. Il monitoraggio dello stress ossidativo è stato condotto a seguito dell'esposizione al pesticida chlorpyrifos delle larve di *D. zernyi* (alla concentrazione LC10 = 0.13 µg/L) e *D. cinerella* (alle concentrazioni i) LC50 = 5.24 µg/L, ii) 1/10 LC50 = 0.524 µg/L e iii) 1/40 LC50 = 0.13 µg/L) per 48 ore a 4°C. Il rilevamento di stress ossidativo sono stati eseguiti anche su due popolazioni naturali di *D. cinerella* raccolte nello stesso giorno al sito a monte (PTm) e a valle (PTv) del depuratore, per valutare in questo modo il possibile stress ossidativo causato dagli scarichi dell'impianto di trattamento acque reflue.

I test di rilevamento di stress ossidativo sono stati poi eseguiti solo sulle larve rinvenute vive allo scadere del tempo di esposizione. A ciascuna concentrazione è stato associato un controllo di larve trattate nello stesso modo ma senza l'esposizione al CPF.

Preparazione degli omogenati

20/25 larve fresche o congelate in precedenza a -80°C sono state omogeneizzate in 300 µl di MDA Lysis Buffer cui sono stati aggiunti 3 µl di BHT (butylated hydroxytoluene) 100X che serve per prevenire la perossidazione artificiale dei lipidi durante l'esecuzione del test. L'omogenato è stato quindi centrifugato a 13000 g per 10 minuti a 4°C per rimuovere il materiale insoluto e il surnatante è stato quindi raccolto in una nuova eppendorf. 20 µl di omogenato sono stati conservati per il dosaggio delle proteine mentre il resto congelato a -80°C per i test successivi.

Dosaggio delle proteine

Il dosaggio delle proteine è stato effettuato tramite il metodo di Bradford (Bradford, 1976). 1µl di omogenato è stato mescolato con 200 µl di reattivo Bradford (Sigma-Aldrich) in una microcuvetta (UV-Cuvette micro, Brand) e dopo 5 minuti è stata misurata l'assorbanza a 595 nm mediante lettura allo spettrofotometro (Lambda Bio (PerkinElmer)). Concentrazioni note (da 1.4 a 0.03125 mg/ml) di albumina di siero bovino (BSA, Sigma), sono state utilizzate come standard.

Saggio di quantificazione del Malondialdeide (MDA)

La quantificazione del MDA come indicatore di perossidazione lipidica e quindi di stress ossidativo è stata condotta utilizzando il Lipid Peroxidation (MDA) Assay kit (Colorimetric/Fluorometric) (Abcam) seguendo il protocollo consigliato dalla ditta. Questo saggio consente di determinare la quantità di malondialdeide (MDA) nel campione omogenato. Il metodo si basa sulla reazione fra l'MDA presente nel campione con l'acido tiobarbiturico (TBA) per generare un composto che può essere facilmente quantificato per via spettrofotometrica (assorbanza a 532nm). In dettaglio:

- A 200 µL di omogenato (diluito con MDA Lysis buffer per arrivare ad una concentrazione di proteine pari a 10 mg/ml) sono stati aggiunti 600 µL di TBA e il tutto è stato incubato per 60 minuti a 95°C.
- La soluzione è stata poi raffreddata per 10 minuti in ghiaccio, centrifugata per 5 minuti a 13000 g e alla fine 200 µL di surnatante sono stati trasferiti in una microcuvetta per la lettura dell'assorbanza a 532 nm.

Per calcolare le nanomoli di MDA presenti nel campione ci si è avvalsi di standard a concentrazione nota di MDA (da 1 a 20 nmoli) con cui si è costruita una curva di taratura.

Il risultato finale è stato espresso in nanomoli (nmol) di MDA per mg di proteine.

Saggio di quantificazione dei carbonili proteici (PCC)

La quantificazione dei gruppi carbonilici delle proteine, usata come indicatore di stress ossidativo, è stato invece eseguito utilizzando il Protein Carbonyl Content Assay Kit (Abcam) e seguendo il protocollo consigliato dalla ditta. Il saggio descritto per la prima volta da Levine et al. (1990) è una quantificazione spettrofotometrica (lunghezza d'onda d'assorbimento = 375 nm) che consente di valutare i prodotti di reazione (idrazoni) della dinitrofenilidrazina (DNPH) con i gruppi carbonilici delle proteine. Nel dettaglio:

- 100 µL di omogenato di larve (diluito con H₂O ad una concentrazione di 10 mg/ml) è stato trattato con 10 µL di Streptozocina per 15 minuti a temperatura ambiente. Questo passaggio è necessario per rimuovere gli acidi nucleici che potrebbero alterare i risultati del test.
- L'omogenato è stato poi centrifugato a 13000 g per 5 minuti e il surnatante trasferito in una nuova eppendorf.
- 100 µl di DNPH sono stati quindi aggiunti ad ogni campione, e dopo una breve vortexata, la soluzione è stata incubata per 10 minuti a temperatura ambiente.
- 30 µl di TCA sono stati quindi aggiunti ad ogni campione, la soluzione è stata vortexata e incubata in ghiaccio per 5 minuti prima di essere centrifugata a 130000 g per 2 minuti. Il surnatante è stato quindi rimosso facendo attenzione a non disturbare il pellet, che è stato poi lavato due volte con 500 µl di acetone freddo.
- Il pellet è stato quindi risospeso in 200 µl di Soluzione di Guanidina (6M), sonicato brevemente e incubato a 60°C per 60 minuti per facilitarne la risospensione.
- La soluzione è stata centrifugata brevemente per precipitare materiale insolubile e il surnatante trasferito in una micro-cuvetta per la lettura dell'assorbanza a 375 nm.

Le nmoli di carbonili proteici per mg di proteine totali sono stati infine calcolati mediante le equazioni:

$$1. C = (\text{Abs } 375\text{nm}/0.22) \cdot 100$$

$$2. CP = C/P$$

Dove:

C = Nmoli di carbonili proteici nel campione

0.22 = coefficiente di estinzione molare calcolato per la cuvetta usata

P = mg di proteine nel campione

CP = Nmoli di carbonili proteici per mg di proteine

Risultati

Saggio di quantificazione del Malondialdeide (MDA)

Diamesa zernyi

In Figura 78 sono riportate le nmoli di MDA per mg di proteine calcolate per le larve di *D. zernyi* controllo o esposte a 0.13 µg/L di chlorpyrifos (CPF) per 48 ore a 4°C. Questa concentrazione di CPF determina nelle larve di *D. zernyi* una bassa mortalità (10%). Come si può osservare l'esposizione a CPF porta ad un lieve aumento della presenza di malondialdeide (MDA), dovuto all'azione tossica dei ROS sui fosfolipidi di membrana e quindi ad un inizio di stress ossidativo. La differenza però non è risultata statisticamente significativa dovuto ad una alta variabilità fra i campioni biologici (n=3).

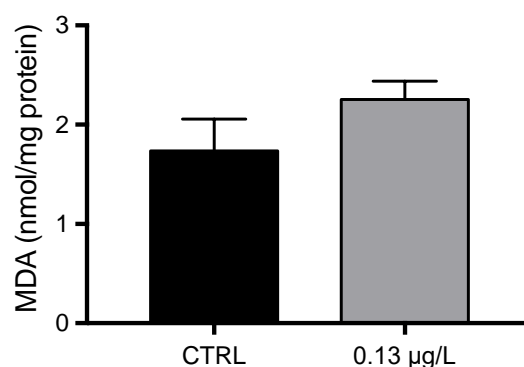


Figura 78 - Livello di perossidazione lipidica (nmol MDA per mg protein) in larve di *D. zernyi* controllo (CTRL) o esposte al CPF (0.13 µg/L = LC10). Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM (n = 3). t-Student test (*p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, ***p \leq 0.001).

Diamesa cinerella

Per quanto riguarda *D. cinerella* i risultati della quantificazione della malondialdeide (MDA) come indicatore di stress ossidativo sono riportati in Figura 79. In Figura 79A sono riportati i risultati ottenuti nel confronto tra il livello di MDA per le larve campionate nella stessa giornata nel sito a monte ad a valle del depuratore. Come si può osservare i valori ritrovati sono del tutto confrontabili e questo indicherebbe un'assenza di stress ossidativo nelle larve di *D. cinerella* causato dagli scarichi dell'impianto di trattamento acque reflue.

In questa specie l'esposizione al CPF è stata condotta testando 4 differenti concentrazioni: la più alta corrispondente alla concentrazione alla quale il 50% delle larve testate non sopravviveva (LC50 = 5.24 µg/L) e due diluizioni di questa concentrazione: 1/10 della LC50 (= 0.524 µg/L) e 1/40 della LC50 (=0.13 µg/L). I risultati, riportati in Figura 79B, evidenziano un livello di stress ossidativo simile in tutti i campioni ad eccezione di quello esposto alla più alta concentrazione di CPF dove si assiste ad un modesto aumento della presenza del prodotto di degradazione dei lipidi di membrana (MDA). Pur essendo quest'aumento importante, anche in questo caso come nel caso di *D. zernyi*, il test statistico non ha restituito una significatività dovuto alla

altissima variabilità biologica dei campioni. Il valore di p value calcolato nel confronto tra CTRL e 5.24 $\mu\text{g/L}$ che è molto vicino alla soglia di significatività ($p = 0.0563$) rendono però questo aumento di stress ossidativo per le larve di *D. cinerella* esposte alla loro LC50 di CPF credibile. Un incremento in futuro del numero di replicati biologici ($n=3$) potrà aiutare a validare questo risultato.

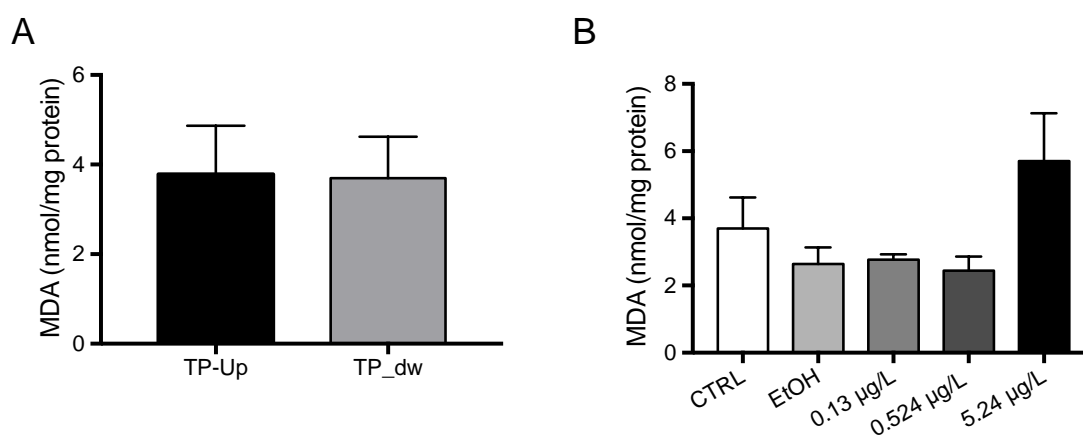


Figura 79 - (A) Livello di perossidazione lipidica (nmol MDA per mg protein) in larve di *D. cinerella* raccolte nella stessa giornata al sito di indagine a monte (PTm=TP_Up) e a valle del depuratore (PTv=TP_Dw). (B) Livello di perossidazione lipidica (nmol MDA per mg protein) in larve di *D. cinerella* controllo (CTRL) o esposte a 3 concentrazioni crescenti di CPF ((i) 5.24 $\mu\text{g/L}$ = LC50, (ii) 0.524 $\mu\text{g/L}$ = 1/10 LC50, (iii) 0.13 $\mu\text{g/L}$ = 1/40 LC50). Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM ($n = 3$). t-Student test (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

Confronto fra le specie

Il confronto fra i risultati ottenuti per *D. zernyi* e *D. cinerella* sono riportati in Figura 80. In Figura 80A è riportato il confronto per il livello di stress ossidativo “basale” (ritrovato in natura) per le larve di *D. cinerella* raccolte al Passo del Tonale nelle stazioni PTm e PTv e per le larve di *D. zernyi* raccolte alla stazione PR0. *D. zernyi* nel torrente Presena presenta un livello di stress ossidativo rispetto a quello osservato per *D. cinerella* al passo del Tonale. Dopo esposizione alla stessa concentrazione di CPF (= 0.13 $\mu\text{g/L}$) che corrisponde alla LC10 per *D. zernyi* e a 1/40 della LC50 per *D. cinerella* la risposta delle due specie è risultata diversa (Figura 80B). Infatti, in *D. zernyi* si è assistito a un lieve aumento del livello di MDA mentre in *D. cinerella* quest’aumento non è assolutamente osservabile.

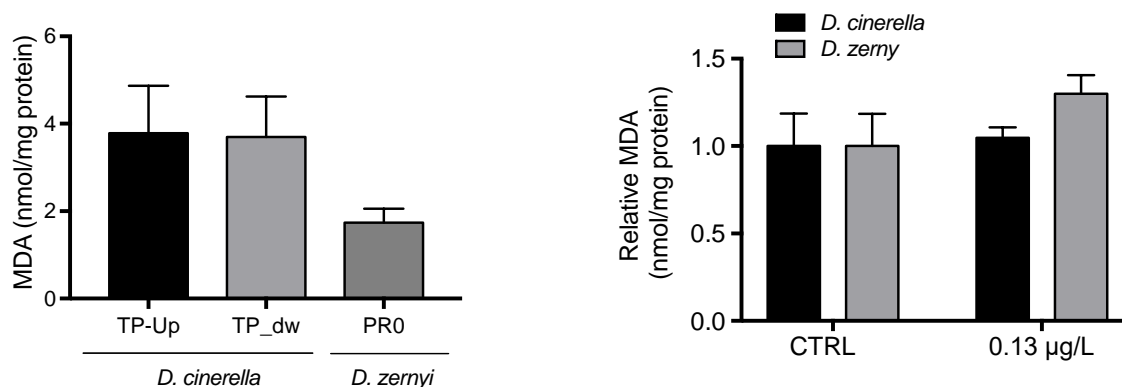


Figura 80 - (A) Livello di perossidazione lipidica (nmol MDA per mg protein) in larve di *Diamesa* spp. raccolte ai siti di indagine PTm (=TP_Up) PTv (=TP_Dw) e PR0. (B) Livello di perossidazione lipidica relativa al controllo (relative nmol MDA per mg protein) in larve di *D. cinerella* e *D. zernyi* esposte a 0.13 µg/L di CPF. Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM (n = 3). t-Student test (*p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, ***p \leq 0.001).

Saggio di quantificazione dei carbonili proteici (PCC)

Diamesa zernyi

In Figura 81 sono riportate le nmoli di carbonili proteici per mg di proteine calcolate per le larve di *D. zernyi* controllo o esposte a 0.13 µg/L di chlorpyrifos (CPF = LC10) per 48 ore a 4°C. Come si può osservare l'esposizione a CPF porta, similmente a quanto osservato per la perossidazione lipidica, a un lieve aumento di stress ossidativo (aumento della quantità di carbonili proteici). Anche in questo caso però l'aumento non è statisticamente significativo a causa di una alta variabilità fra i campioni biologici (n=4).

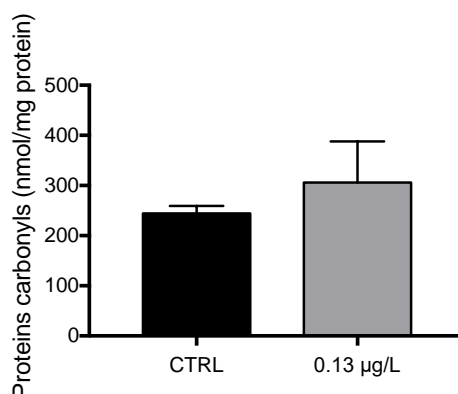


Figura 81 - Livello di carbonilazione delle proteine (nmol carbonili proteici per mg protein) in larve di *D. zernyi* controllo (CTRL) o esposte al CPF (0.13 µg/L = LC10). Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM (n = 3). t-Student test (*p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, ***p \leq 0.001).

Diamesa cinerella

Per quanto riguarda *D. cinerella* i livelli di carbonilazione proteica ritrovati sono riportati in Figura 82. Nella Figura 82A si osserva il confronto tra il livello di stress basale nei due siti

campionati: PTm e PTv. A differenza di quanto ritrovato con il test di perossidazione lipidica in questo caso i valori sono differenti per i due siti con un valore inferiore per il sito a valle. Questa differenza non è comunque significativa dal punto di vista statistico. I risultati dopo esposizione al CPF sono invece molto confrontabili con quelli ottenuti per il saggio dell'MDA: si osserva infatti un aumento significativo di stress dopo esposizione alla LC50.

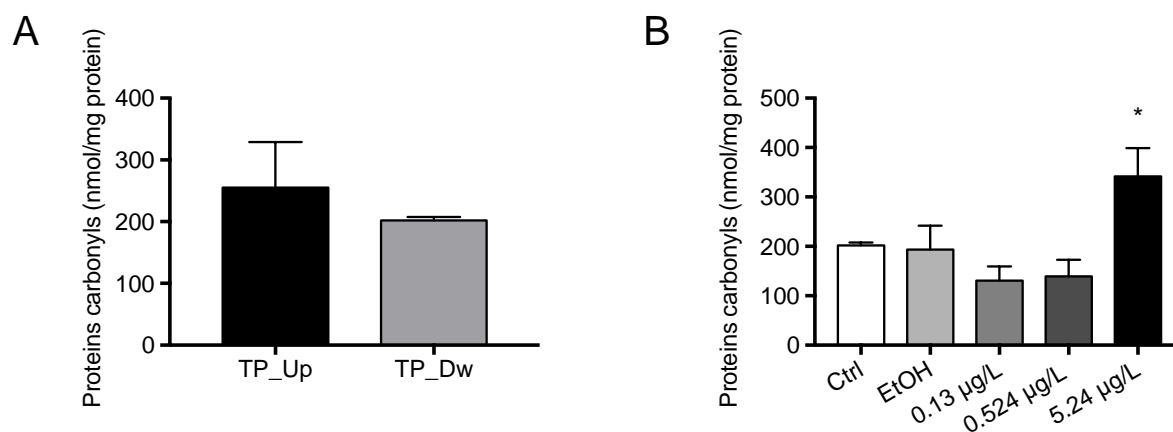


Figura 82 - (A) Livello di carbonilazione delle proteine (nmol carbonili proteici per mg protein) in larve di *D. cinerella* raccolte nella stessa giornata al sito di indagine a monte (PTm=TP_Up) e a valle del depuratore (PTv=TP_Dw). (B) Livello di carbonilazione delle proteine (nmol carbonili proteici per mg protein) in larve di *D. cinerella* controllo (CTRL) o esposte a 3 concentrazioni crescenti di CPF ((i) 5.24 µg/L = LC50, ii) 0.524 µg/L = /10 LC50, iii) 0.13 µg/L = 1/40 LC50). Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM (n = 3). t-Student test (*p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, ***p \leq 0.001).

Confronto fra le specie

Confrontando i risultati ottenuti nel test di carbonilazione delle proteine nelle due specie (Figura 83A) si evidenzia come fra i livelli basali, diversamente da quanto osservato analizzando la perossidazione lipidica, non si osservano differenze degne di nota. Il risultato dopo esposizione a basse concentrazioni di CPF invece evidenzia un comportamento differente delle due specie: *D. zernyi* sembra essere lievemente stressata dall'esposizione che invece non determina nessun aumento nella *D. cinerella* (Figura 83B).

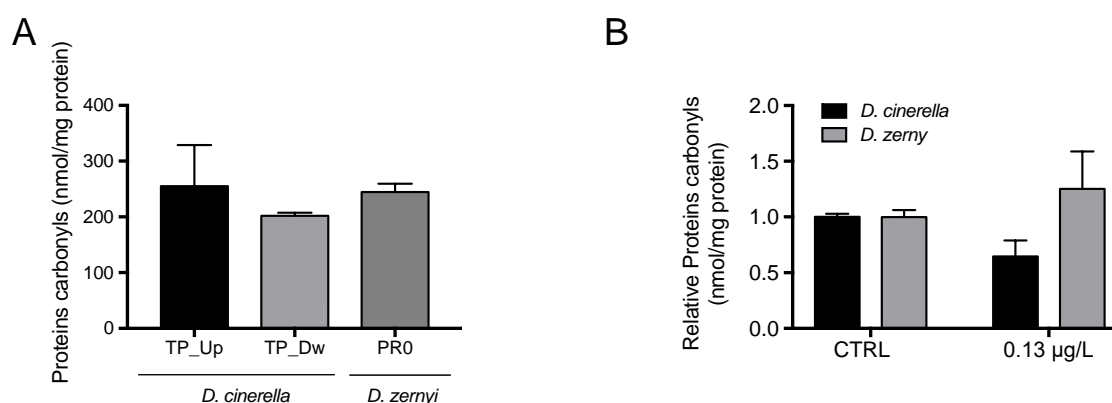


Figura 83 - (A) Livello di carbonilazione delle proteine (nmol carbonili proteici per mg protein) in larve di *Diamesa* spp. raccolte ai siti di indagine PTm (=TP_Up) PTv (=TP_Dw) e PR0. (B) carbonilazione delle proteine (nmol carbonili proteici per mg protein) relativo al controllo (relative protein carbonyls per mg protein) in larve di *D. cinerella* e *D. zernyi* esposte a 0.13 µg/L di CPF. Gli istogrammi rappresentano la media \pm SEM (n = 3). t-Student test (*p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, ***p \leq 0.001).

Discussione

In *D. zernyi* l'esposizione a basse concentrazioni di CPF porta ad un lieve aumento della presenza di malonildialdeide (MDA), dovuto all'azione tossica dei ROS sui fosfolipidi di membrana e quindi ad un inizio di stress ossidativo. Differentemente, la stessa bassa concentrazione di CPF non porta a nessuna tendenza di aumento di stress in *D. cinerella*; specie nella quale bisogna alzare l'esposizione fino alla concentrazione capace di causare il 50% di mortalità per osservare un aumento di stress ossidativo. *D. cinerella*, che presenta a livello basale in natura uno stress ossidativo superiore, sembrerebbe, utilizzando questo saggio come indicatore di resistenza al CPF, essere meno sensibile all'esposizione a questo pesticida rispetto a *D. zernyi*. Similmente a quanto osservato con il test di quantificazione dell'MDA anche analizzando il danno a livello proteico si può osservare una maggiore sensibilità di *D. zernyi* al pesticida CPF rispetto a *D. cinerella*. In questo caso però il livello basale ritrovato è risultato confrontabile fra le due specie. Per quanto riguarda il danno causato dagli scarichi dell'impianto delle acque reflue, utilizzando questi test per analizzare le popolazioni di *D. cinerella* a monte ed a valle del depuratore non si è osservato, a differenza dei risultati ottenuti con il test di genotossicità, un aumento di stress ossidativo basale dovuto alla presenza degli scarichi del depuratore nel sito a valle.

In generale comunque, i risultati ottenuti per i test di stress ossidativo evidenziano che per osservare una risposta di tipo ossidativo bisogna esporre le larve a concentrazioni molto più alte di quelle necessarie per osservare genotossicità. Questo risultato può essere dovuto al fatto che l'azione del CPF determina in maniera più specifica danno al DNA rispetto ad attivare la produzione di ROS nella cellula o al fatto che i test utilizzati per testare lo stress ossidativo sono meno sensibili (e quindi in grado di rilevare solo cambiamenti molto importanti) rispetto al test della Cometa utilizzato per valutare il danno al DNA.

3.15.6 Obiettivo 3.6: Valutazione di effetti sub-letali (comportamento) di Invertebrati esposti a CE (In collaborazione con UNIMIB, dott.ssa Sara Villa, dott.ssa Valeria Di Nica, dott.ssa Tanita Pescatore)

Con il termine comportamento si intende un effetto a livello di organismo definito come azione, reazione o funzionamento di un sistema in un insieme di circostanze ambientali specifiche (Hellou, 2011). Gli endpoint comportamentali consistono, pertanto, in una molteplicità di azioni quali ad esempio la fuga per evitare l'esposizione ad un contaminante, il cambiamento delle proprie abitudini alimentari, la modifica della modalità di locomozione o anche della frequenza respiratoria (Clotfelter et al., 2004). Alla base vi sono alterazioni di vie metaboliche e processi biochimici. Comportamenti come la cattura efficace delle prede e la fuga dai predatori sono essenziali per la crescita e la sopravvivenza individuali ma anche necessari per il mantenimento della fitness della popolazione. A differenza dei comuni indici biotici ed ecologici (es. quelli utilizzati per valutare la qualità e lo stato ecologico dei fiumi basati sui macroinvertebrati: Indice STAR_ICMi e indice IBE) che considerano solo presenza/assenza dei diversi gruppi tassonomici e loro rapporti di abbondanza, lo studio delle risposte comportamentali consente di valutare se i taxa presenti sono in uno stato fisiologico "sano" integrando processi biochimici e fisiologici.

In ambito regolatorio, i test standard non prendono in considerazione endpoint comportamentali che potrebbero fornire segnali precoci di allarme sulla salute delle popolazioni esposte. È dimostrato che gli endpoint comportamentali possono essere da 10 a 100 volte più sensibili degli endpoint derivanti da test acuti o cronici (L(E)C50) (Gerhardt, 2007), poiché le risposte comportamentali possono essere indotte anche da concentrazioni sub-letali delle sostanze chimiche (Amiard-Triquet, 2009).

A causa della mancanza di idonei strumenti per l'acquisizione di immagini e della limitata conoscenza scientifica sul comportamento naturale di molti organismi, gli studi sulle risposte comportamentali indotte da contaminanti non hanno ricevuto in passato molta attenzione. Recentemente, lo sviluppo di nuove tecnologie di video-tracking ha consentito una migliore quantificazione di molti endpoint comportamentali. Di pari passo è aumentata la conoscenza scientifica sull'importanza del comportamento per la salute e la forma fisica degli organismi (Amiard-Triquet, 2009; Little and Brewer, 2001; Sloman and McNeil, 2012). Entrambi gli aspetti hanno portato ad un nuovo interesse sull'analisi dei cambiamenti comportamentali degli organismi (vertebrati e invertebrati) in presenza di contaminanti.

La sensibilità delle specie di macroinvertebrati a vari fattori ambientali è legata ai tratti morfologici e/o fisiologici (es. un singolo tratto e/o loro combinazione, come ad es. tipo di respirazione, preferenza di temperatura e/o di velocità della corrente acquatica) (Jesus, 2008). In ecosistemi estremamente freddi come gli ambienti alpini, gli organismi hanno sviluppato dei tratti morfologici e/o fisiologici che possono avere una influenza significativa sulla loro sensibilità verso i contaminanti (Chapman, 2016). Recentemente, tra i macro-invertebrati, i ditteri chironomidi sono stati proposti come tra i migliori bioindicatori della qualità delle acque ad alta quota in quanto dominano, in termini di abbondanza e numero di specie, la fauna di questi ambienti (Lencioni, 2018). Tra i chironomidi, le specie del genere *Diamesa* Meigen 1835 sono spesso associate a condizioni di acqua incontaminata (Lencioni et al., 2012).

In letteratura sono presenti pochi studi sulle risposte comportamentali delle larve di chironomidi esposte a stress ambientali (Azevedo-Pereira et al., 2011; Kim et al., 2006;

Nath et al., 2015), e tutti sono riferiti al genere *Chironomus* che è tipico di acque lente di fondovalle. Gli studi effettuati nell'ambito di questo progetto di ricerca sono i primi eseguiti su specie di chironomidi alpini del genere *Diamesa*.

Nell'ambito dell'obiettivo 3.6 sono stati eseguite le seguenti attività:

1. sviluppo di un protocollo sperimentale per studiare il cambiamento comportamentale in larve appartenenti al genere *Diamesa*;
2. studio delle risposte comportamentali in larve di *Diamesa cinerella* gr. come segnale di early warning per il monitoraggio delle acque reflue provenienti dal depuratore di Passo del Tonale;
3. studio delle risposte comportamentali di larve di *Diamesa zernyi* gr. esposte a concentrazioni sub-letali (Lowest Observed Effect Concentration – LOEC) di 7 contaminanti emergenti;
4. studio delle risposte comportamentali di larve di *Diamesa cinerella* gr. esposte a concentrazioni sub-letali decrescenti dell'insetticida chlorpyrifos e dell'erbicida metholaclor;
5. studio delle risposte comportamentali di larve di *Diamesa zernyi* gr. esposte a concentrazioni sub-letali decrescenti dell'insetticida chlorpyrifos e a quattro differenti temperature.
6. I test sono stati eseguiti sulle larve al quarto stadio di due gruppi di specie di *Diamesa*, *D. cinerella* gr. (raccolta nel Torrente Vermigliana a monte e a valle del depuratore di Passo Tonale in inverno, febbraio 2017) e *D. zernyi* gr. (raccolta nel Rio Presena pochi metri a valle della fronte del ghiacciaio, settembre 2016 e settembre 2017).

Messa a punto di un protocollo sperimentale per lo studio del cambiamento comportamentale in larve di *Diamesa spp.* (settembre 2016-2017; febbraio 2017)

Le larve di *Diamesa spp.* sono state raccolte, smistate sul campo e trasportate come descritto nell'obiettivo 3.2. Entro 24 ore dal campionamento è stata eseguita dai ricercatori del MUSE la conferma della specie mediante uno stereomicroscopio (MZ 7.5; Leica Microsystems, Germania; 50x) secondo la metodologia specificata nel lavoro di Rossaro e Lencioni (2015). Gli animali sono stati mantenuti in acquari di vetro da 1L con acqua corrente in una camera termostatica (ISCO, modello FTD250-plus, Teledyne Isco Inc., Lincoln, Nebraska) a 4°C e sotto aerazione per mantenere l'ossigeno disciolto ad un livello di saturazione superiore all'80%. La temperatura di incubazione (4°C) è stata tenuta vicina alla temperatura dell'acqua misurata nel torrente con una sonda multiparametrica (Hydrolab Quanta, Hydrolab Corporation®, Texas, USA).

Ventiquattro ore prima della conduzione degli esperimenti, le larve sono state acclimatate alle condizioni di esposizione; pertanto sono state trasferite in beaker da 500 mL contenenti 200 mL di acqua ricostituita (circa 40 larve per beaker) in accordo alla metodologia riportata in Lencioni et al. (2016). Durante l'acclimatazione e la successiva esposizione, le larve sono state mantenute in una camera termostatica a 4 ± 1 °C senza luce e cibo ma con aerazione.

Per effettuare le riprese, le larve sono state trasferite in un beaker da 50 mL e ricollocate nella camera termostatica, dove è stata installata la strumentazione per la registrazione dei video. Le riprese sono state effettuate dopo 24, 48, 72 e 96 ore di esposizione. I video di durata compresa tra 120-180 secondi sono stati effettuati con una fotocamera

digitale HD (Raspberry Pi 3 con Camera Module v2) ad alta risoluzione (1920×1080 pixel). Durante il tempo di registrazione del video la temperatura dell'acqua è stata monitorata con un termometro portatile (Koch 13211) al fine di controllare che l'eventuale variazione di temperatura rimanesse compresa nell'intervallo di 4-5 °C.

Sono state eseguite quattro serie di video: 1. Settembre 2016: su larve di *D. zernyi* gr. esposta a una plethora di 7 CE; 2. Febbraio-marzo 2017: su larve di *D. cinerella* gr. esposte a chlorpyrifos e metholaclor; 3. Marzo 2017: su larve di *D. cinerella* gr. esposte allo scarico del depuratore e sue diluizioni; 4. Settembre 2017: su larve di *D. zernyi* gr. esposte a chlorpyrifos, a diverse temperature. I video sono stati analizzati, presso l'Università degli studi di Milano Bicocca (Partner 1), utilizzando il software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>), un programma di elaborazione di immagini Java di pubblico dominio. Il plugin e una descrizione dettagliata del monitoraggio degli animali sono disponibili all'indirizzo <http://www.phage.dk/plugins/wrmtrck.html> (Brooks et al., 2016). I parametri del software sono stati ottimizzati e calibrati per il monitoraggio di tre endpoint comportamentali relativi alle larve *Diamesa spp.*, ovvero:

- la distanza cumulativamente coperta (mm) (Distance moved);
- la velocità media del movimento espressa in mm s⁻¹ (AvgSpeed);
- la frequenza delle curvature del corpo (BBps = piegamenti corporei al secondo).

I risultati ottenuti dalla misura di questi endpoint comportamentali sono stati analizzati mediante il test t di Student al fine di rilevare differenze statisticamente significative di ciascun gruppo trattato rispetto alle condizioni di controllo ai diversi tempi di esposizione.

L'esistenza di valori anomali è stata studiata utilizzando il test di Grubbs con il software statistico XLSTAT (Addinsoft, 1995-2017). La significatività statistica, valutata usando il software R-project (R Core Team, 2017), è stata indicata da asterischi: ****: P <0,0001; ***: P <0,001; **: P <0,01; *: P <0,05. Il presente studio rappresenta il primo tentativo di standardizzare un protocollo sperimentale (Figura 84) per la valutazione di cambiamenti comportamentali indotti nei macro-invertebrati tipici di ecosistemi alpini. L'ottimizzazione dei parametri del software di video-tracking (elencati nella

Tabella 64) ha permesso di rilevare anche i più piccoli cambiamenti nella forma e nella posizione di tutte le larve monitorate. Ciò ha consentito di scegliere i tre parametri indicati sopra come i più importanti da considerare per l'analisi comportamentale. Uno dei risultati interessanti ottenuti nel presente studio riguarda la standardizzazione del tempo di esposizione.

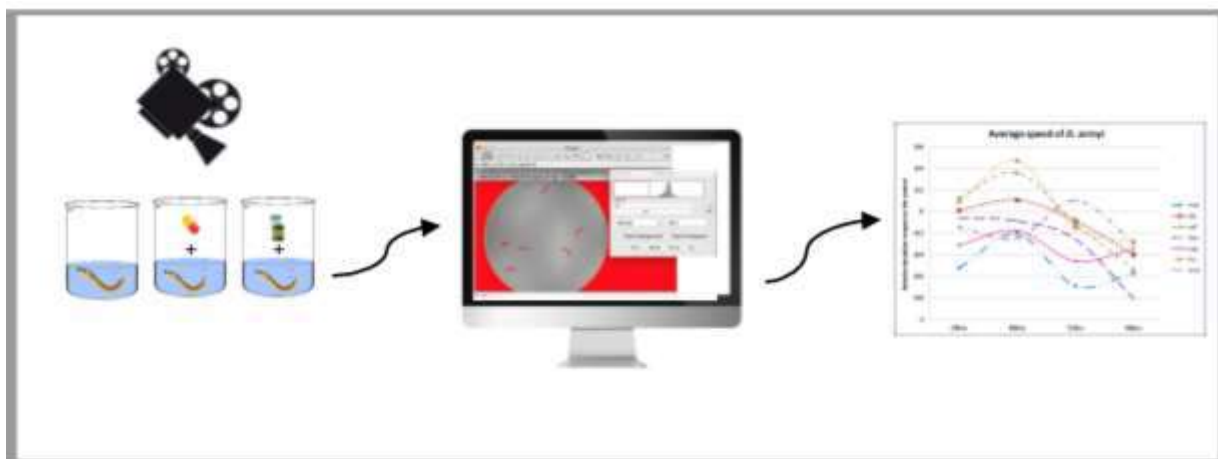


Figura 84 – Rappresentazione grafica del protocollo sperimentale sviluppato

Tabella 64 - Ottimizzazione dei parametri usati per analizzare il comportamento delle larve di *Diamesa* spp.

Parametri wrMTrck	Default	<i>Diamesa</i>
minSize - Minimum Object Area (pixels ²)	100	10
maxSize - Maximum Object Area (pixels ²)	400	400
maxVelocity - Maximum velocity (pixels/frame)	10	100
maxAreaChange - Maximum area change (%)	30	75
minTrackLenght - Minimum track length (frames)	50	50
bendTreshold - Treshold for turn	2	2
Binsize - Size of bin for speed histogram (pixels/frames)	0	0
bendDetected (0 = off, 1 = Angle, 2 = AspetcRatio, 3 = AR+Histogram)	2	1
FPS – frames/s (0 = try to load from file)	30	30

Dai risultati ottenuti è stato dimostrato che l'ottimizzazione del sistema ha consentito di rilevare significativi effetti comportamentali in tutti i test condotti.

Studio delle risposte comportamentali in larve di *Diamesa* come segnale di “early warning” per il monitoraggio delle acque reflue del depuratore di Passo del Tonale

La contaminazione dei corsi d'acqua è diventata una delle principali minacce per la sopravvivenza degli organismi acquatici (Reid et al., 2013). Gli effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue (STP; sewage treatment plant) sono riconosciuti come una delle principali vie di ingresso negli ecosistemi acquatici di contaminanti emergenti,

inclusi i principi attivi (p.a.) contenuti in prodotti farmaceutici e in prodotti per la cura personale (EC, 2016). Nell'ambito dell'Unione Europea, le normative ambientali miranti a ridurre l'inquinamento delle acque superficiali da immissione degli effluenti dei depuratori (EC, 2000) richiedono che gli Stati Membri garantiscano il continuo monitoraggio dello scarico delle acque reflue e la valutazione dei suoi effetti (Farré et al., 2001). Di particolare rilevanza è il controllo della qualità dello scarico di effluenti in sistemi acquatici alpini poiché si tratta di ambienti intrinsecamente fragili (Kaul, 1993) che forniscono acqua alle aree circostanti (Alpine Convention, 2009).

La sola valutazione dei parametri chimico-fisici non è sufficiente ad ottenere informazioni esaurienti sulla pericolosità degli effluenti trattati (Metcalf and Eddy., 2003; Movahedian et al., 2005; Teodorović et al., 2009). Per questo motivo, in combinazione alle analisi chimico-fisiche condotte di routine, vengono eseguiti anche test di tossicità su organismi acquatici. Uno dei test biologici più utilizzati per monitorare la tossicità degli effluenti è il test di tossicità acuta eseguito su *Daphnia magna* (Koçbaş e Oral, 2015). Recentemente, per la sorveglianza della qualità degli effluenti dei depuratori è stato proposto l'uso del biomonitoraggio on-line (Allan et al., 2006; Jeong et al., 2008; Jeong et al., 2014; Häder e Erzinger, 2017a, b). Questo approccio consente di determinare la tossicità integrata dello scarico, senza dover necessariamente procedere a costose analisi per l'identificazione di tutti gli inquinanti che potenzialmente vi possono essere presenti (Chen et al., 2013). Il biomonitoraggio online si basa sullo studio di vari endpoint comportamentali che forniscono una risposta misurabile a livello dell'intero organismo (Gerhardt, 1995). Quando un organismo affronta un cambiamento nella qualità dell'acqua o una condizione di tossicità il suo comportamento cambia marcatamente. *Daphnia magna* è l'organismo più frequentemente utilizzato in queste attività di biomonitoraggio, in quanto considerato organismo rappresentativo degli invertebrati negli ecosistemi acquatici (EC, 2002, 2003, 2006). Tuttavia, questa ipotesi non è sempre valida (Wogram e Liess, 2001; Maltby et al., 2005; Wiberg-Larsen et al., 2016). Infatti, come descritto sopra, la sensibilità delle specie di macroinvertebrati può essere correlata a specifici tratti ecologici. Secondo l'approccio basato sui "biological traits", è stato dimostrato che le specie di *Chironomus* (Diptera Chironomidae, sottofamiglia Chironominae) sono più sensibili ad alcune categorie di inquinanti come i pesticidi organoclorurati e i neonicotinoidi rispetto a *D. magna* (Rico et al., 2015). Non è noto se i chironomidi siano più sensibili dei daphnidi anche verso altri contaminanti acquatici che potrebbero essere presenti negli effluenti dei depuratori come i p.a. contenuti in prodotti farmaceutici e in prodotti per la cura personale. La sensibilità ai contaminanti potrebbe essere influenzata dalle condizioni estreme presenti in ecosistemi freddi come quelli alpini, dove gli organismi hanno evoluto una serie di strategie per resistere alle basse temperature (cold hardness Lencioni et al., 2015) che potrebbero conferire loro anche una certa resistenza ai tossici (Chapman, 2016). In questo contesto, l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di analizzare la sensibilità di una popolazione naturale del chironomide alpino *Diamesa cinerella* (sottofamiglia Diamesinae) esposta a diverse diluizioni dell'effluente del Passo del Tonale, nelle Alpi italiane (NE Italia). Il genere *Diamesa* prevale nelle sorgenti e viene spesso associato ad ambienti incontaminati (Lencioni et al., 2012; Niedrist e Fuereder, 2016).

Campionamento ed esecuzione dei test comportamentali

Campioni di acqua di scarico dal depuratore di Passo del Tonale sono stati prelevati in data 6 marzo 2017 dal gruppo di ricerca del MUSE. È stata scelta tale data in quanto immediatamente successiva alla settimana di carnevale che risulta essere caratterizzata da elevata presenza turistica e quindi da presumibile elevato consumo di farmaci e prodotti per la cura e l'igiene personale. Tutti i campioni sono stati raccolti in bottiglie da 1L sterili graduate in PP (da LP Italiana, Milano, Italia), conservati in frigorifero durante il trasporto al laboratorio e successivamente conservati a -20 °C. Per i dettagli relativi ai test condotti si rimanda al paragrafo precedente.

Mortalità delle larve di *D. cinerella* esposte a diluizioni progressive delle acque di scarico del depuratore

Non è stata osservata mortalità negli organismi esposti al controllo (CTRL) (Tabella 65), pertanto i test effettuati risultano validi. Inoltre, non è stata riportata la morte di alcun organismo esposto alle diverse diluizioni dell'effluente dopo 24 e 48 ore, con la sola eccezione di un organismo morto alla massima diluizione dopo 24 ore. Questi dati, integrati con i dati ottenuti dal partner UNIMIB nel WP2 e WP1, offrono importanti informazioni circa la pericolosità reale degli scarichi del depuratore nel periodo di massima affluenza turistica..

Tabella 65 - Valori medi per gli endpoint comportamentali Body Bend per second (in $n \cdot s^{-1}$), Average Speed ($mm \cdot s^{-1}$) e total Distance moved (mm) misurati nelle larve di *Diamesa cinerella* nei campioni CTRL, STP, STP/10, STP/100 and STP/1000 dopo 24 e 48 ore di esposizione.

Trattamento	morti	BBps			Avg. Speed			Distance moved		
	N	M	SD	RSD	M	SD	RSD	M	SD	RSD
24hrs										
CTRL	0	0.68	0.29	0.43	0.74	0.29	0.36	6.67	5.38	0.81
STP	0	0.73	0.35	0.48	0.75	0.35	0.31	5.95	3.80	0.78
STP/10	0	0.84	0.38	0.45	0.77	0.38	0.58	3.41	1.94	0.79
STP/100	0	0.81	0.23	0.28	0.84	0.23	0.25	3.70	3.08	0.84
STP/1000	1	0.76	0.31	0.41	0.58	0.31	0.19	2.56	1.31	0.51
48hrs										
CTRL	0	0.67	0.36	0.54	0.85	0.21	0.25	8.70	5.36	0.62
STP	0	0.63	0.37	0.59	0.78	0.32	0.41	8.69	6.29	0.72
STP/10	0	0.91	0.53	0.58	0.79	0.39	0.49	4.67	2.76	0.59
STP/100	0	0.65	0.19	0.29	0.84	0.17	0.2	4.86	2.77	0.57
STP/1000	0	0.99	0.48	0.48	0.93	0.38	0.4	9.23	7.70	0.83

N= n. delle osservazioni; M = media; SD = deviazione standard; RSD = deviazione standard relativa

Test comportamentali

Tutti i dati misurati sono riportati in dettaglio nella Tabella 65 e rappresentati graficamente nella Figura 85.

Capire come si modifica il comportamento in popolazioni naturali di specie tipiche degli ecosistemi alpini è di grande importanza per comprendere i potenziali effetti indesiderati di contaminanti presenti in questi ambienti e conseguentemente gestire al meglio eventuali interventi di recupero. La Figura 85 mostra la deviazione rispetto al controllo dei parametri “velocità media”, “distanza percorsa” e “frequenza delle piegature del corpo” a differenti diluizioni dello scarico del depuratore e a differenti tempi di esposizione. Sorprendentemente le maggiori deviazioni comportamentali dal controllo sono state registrate nelle larve esposte alle più alte diluizioni dell’effluente dopo 24 e 48 ore di esposizione.

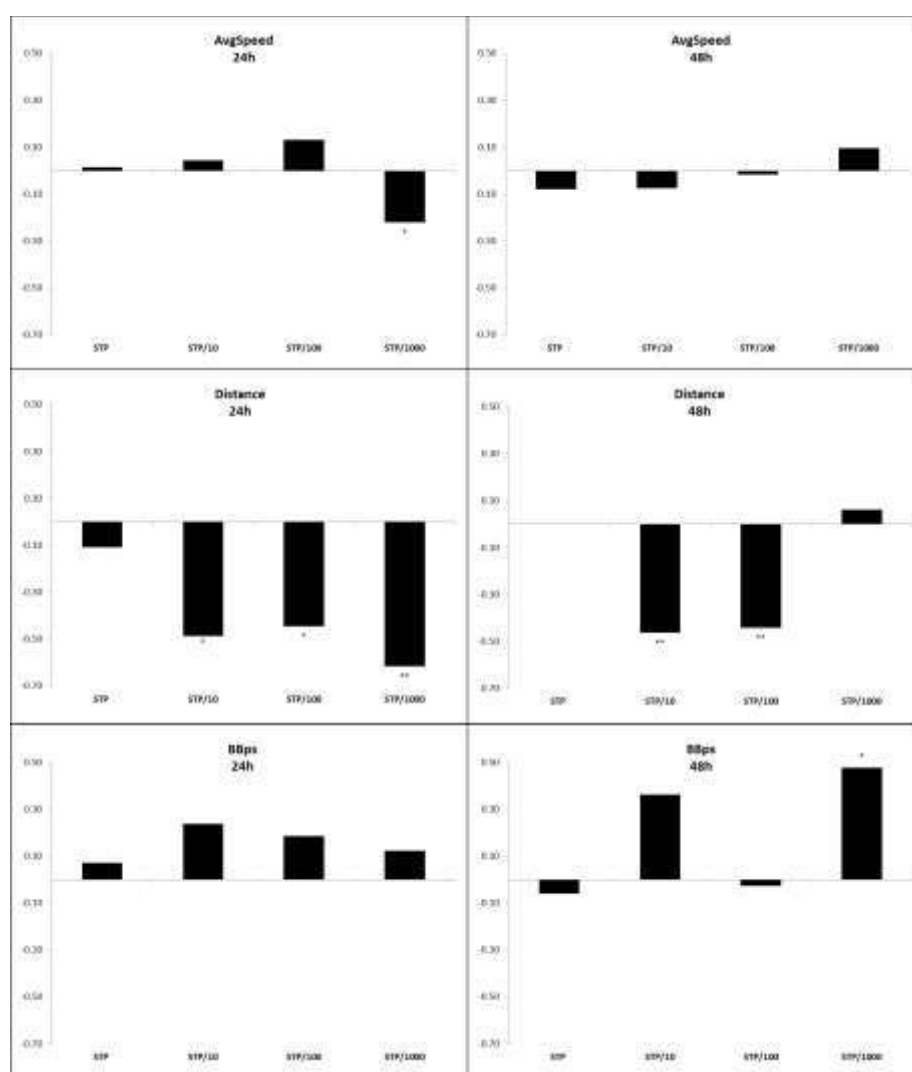


Figura 85 - Deviazioni rispetto al controllo dei parametri comportamentali (velocità media, distanza percorsa e frequenza delle curvature del corpo) delle larve di *D. cinerella* esposte a diverse diluizioni dello scarico. Gli asterischi indicano l'esistenza di una differenza statisticamente significativa dal controllo (significatività: **: <0,01; *: <0,05).

Dall'analisi dei risultati è stato visto che:

- La velocità media non sembra essere influenzata per tutto il tempo dell'esposizione, ad eccezione degli organismi esposti a STP/1000 dopo 24 ore per i quali si è registrata una riduzione significativa della velocità di nuoto ($P < 0,05$).
- La distanza percorsa è diminuita significativamente a tutte le diluizioni dello scarico per entrambi i tempi di esposizione. Per la diluizione STP/1000 si è registrato tuttavia un recupero dopo 48 ore di esposizione.
- Non sono state osservate variazioni significative nel parametro BBps durante entrambi i periodi di esposizione, ad eccezione degli organismi esposti alla più alta diluizione dell'effluente (STP/1000) dopo 48 ore di esposizione, per i quali è stato registrato un aumento della frequenza di piegatura del corpo.

L'esposizione a varie diluizioni dell'effluente proveniente dal depuratore di Passo del Tonale ha causato alcune alterazioni comportamentali in *D. cinerella*. Al contrario, l'effluente tal quale in uscita dal depuratore non ha influenzato il comportamento delle larve.

Da questi risultati si è visto che il parametro più influenzato è la distanza cumulativamente percorsa dall'organismo che mostra una significativa riduzione a quasi tutte le diluizioni dell'effluente trattato sia dopo 24 che 48 ore.

A questo livello di studio non è facile dare una spiegazione dei risultati ottenuti. Una possibile spiegazione può essere legata alle strategie utilizzate dagli organismi acquatici per fronteggiare le sopravvenute condizioni ambientali sfavorevoli. Da letteratura (Untersteiner et al., 2003; Binelli et al., 2011), in organismi bentonici come la *Diamesa*, la strategia utilizzata per contrastare la presenza di contaminanti potrebbe essere quella di attivare meccanismi di adattamento che coinvolgono gli enzimi antiossidanti e disintossicanti. Questo comporta un rilevante dispendio energetico che potrebbe riflettersi anche in una minore mobilità degli organismi. Il cambiamento nel comportamento (come la distanza normalmente percorsa) di una specie chiave come *Diamesa* può dar luogo a effetti imprevedibili a livelli più alti della catena alimentare (es. modificando il normale rapporto preda-predatore). Nella comunità bentonica del tratto del Torrente Vermigliana investigato *D. cinerella* rappresenta in inverno il 21-23% degli invertebrati rinvenuti (Tabella 43), quindi, come detritivoro-erbivoro (grazer), rappresenta uno dei principali consumatori primari. Sono prede di predatori quali per esempio plecoteri perlodidi e tricoteri riacofilidi colonizzatori dello stesso tratto di torrente (WP3). L'esposizione all'effluente tal quale non ha indotto alcuna modifica comportamentale sulle larve testate. Risultati simili sono stati osservati in *Gammarus pulex* e *Chironomus riparius* (De Lange et al., 2006; Azevedo-Pereira et al., 2011). La comprensione di questi risultati necessita di ulteriori studi.

In ultima analisi, gli effluenti provenienti dal depuratore del Passo del Tonale diluiti nel torrente Vermigliana non causano eventi di mortalità significativi, ma hanno il potenziale di influenzare il comportamento delle larve inibendone la mobilità.

I dati ottenuti in questo studio sono in fase di pubblicazione come lavoro dal titolo "Effects of a treated sewage effluent on behavioural traits in *Diamesa cinerella* and *Daphnia magna*" sulla rivista internazionale *Journal of Limnology*.

Studio delle risposte comportamentali di larve di *Diamesa zernyi* esposte a 7 contaminanti emergenti alle più basse concentrazioni di effetto osservato (Lowest-Observed-Effect Concentrations (LOEC))

Larve di *Diamesa zernyi* raccolte nel Rio Presena (N46°13.596', E010°34.929') a 2685 m. slm (bacino del fiume Noce, TN) sono state esposte per 96 ore a sette contaminanti appartenenti alla categoria dei pesticidi (chlorpyrifos [CPF], metholachlor [MET], boscalid [BOS] e captano [CAP]) e alla categoria dei farmaci (ibuprofene [IBU], furosemide [FUR] e trimetoprim [TMP]) a concentrazioni corrispondenti alle rispettive più basse concentrazioni di effetto osservato (LOEC) (Tabella 66). I valori di LOEC sono stati misurati nel primo anno di attività di ricerca nell'ambito del WP3. Il protocollo seguito è riportato nel primo paragrafo.

Gli standard chimici sono stati acquistati dai laboratori di Sigma Aldrich (Milano, Italia) alla purezza >95%. Le soluzioni madre (conservate a 4 °C fino all'utilizzo) alla concentrazione selezionata di ciascuna sostanza chimica sono state preparate in acqua ricostituita e dimetil solfossido (DMSO, purezza analitica). Il DMSO è stato aggiunto per favorire la solubilizzazione chimica in acqua ad una concentrazione finale inferiore a 0,1 mg/L. Sandbacka e coautori (2000) hanno riportato che questa concentrazione di DMSO non provoca alcuna tossicità acuta e non influenza la mobilità di organismi acquatici come *Daphnia magna*. Le soluzioni dei test sono state rinnovate ogni 24 ore. Occorre sottolineare che per il CPF la concentrazione testata è vicina alle concentrazioni che sono state misurate in acque superficiali. Infatti, con particolare riferimento all'ambiente alpino, l'insetticida in oggetto è stato recentemente ritrovato nel rio Novella (Trentino Italia) a concentrazioni superiori a 500 ng/L e picchi che hanno superato il valore di 1 µg/L (concentrazione media da poche a diverse decine di ng/L) (Morselli et al., 2017). Tuttavia, nel Rio Presena, la concentrazione rinvenuta era di 6.8 ng/L (WP1). Tra gli altri p.a. selezionati, IBU, FUR e TMP sono stati ritrovati nel torrente Noce a concentrazioni di 619 ng/L, 18,7 ng/L (dati prodotti nel WP1), e 196 ng/L (Mandaric et al., 2017).

Tabella 66 - Valori di coefficienti di ripartizione (logKow) e di distribuzione (logDow) n ottanolo-acqua per i pesticidi e i farmaci selezionati.

Categoria di impiego		logKow	<i>Diamesa zernyi</i>	
			LOEC	EC50
chlorpyrifos (CPF)	insetticida	4.7a	1.1E-03c(48hrs)	5.24E-3c(48hrs)
metolachlor (MET)	erbicida	3.4a	27.4c(72hrs)	84.12c(72hrs)
boscalid (BOS)	fungicida	2.96a	5.0E-01c(96hrs)	
captan (CAP)	fungicida	2.5a	3.14c(24hrs)	
ibuprofene (IBU)	farmaco antinfiammatorio non steroideo (NSAID)	1.44 (logD7.4)*b	100c(96hrs)	

furosemide (FUR)	diuretico	-0.24 (logD7.4)*b	500c(96hrs)
thrimethoprim (TMP)	antibiotico	0.63 (logD7.4)*b	400c(96hrs)

a: PPDB: Pesticide Properties DataBase; b: Avdeef, 2003; c: primo anno progetto RACE-TN WP3 *logD7.4 per composti ionizzabili

Test comportamentali

In Figura 86 sono riportate le deviazioni osservate rispetto al controllo dopo 24, 48, 72 e 96 ore di esposizione dei tre endpoint comportamentali selezionati (Distance moved, Average Speed e BBps). Il significato statistico è indicato con gli asterischi: **** p <0,0001; *** p <0,001; ** p <0,01; e * p <0,05.

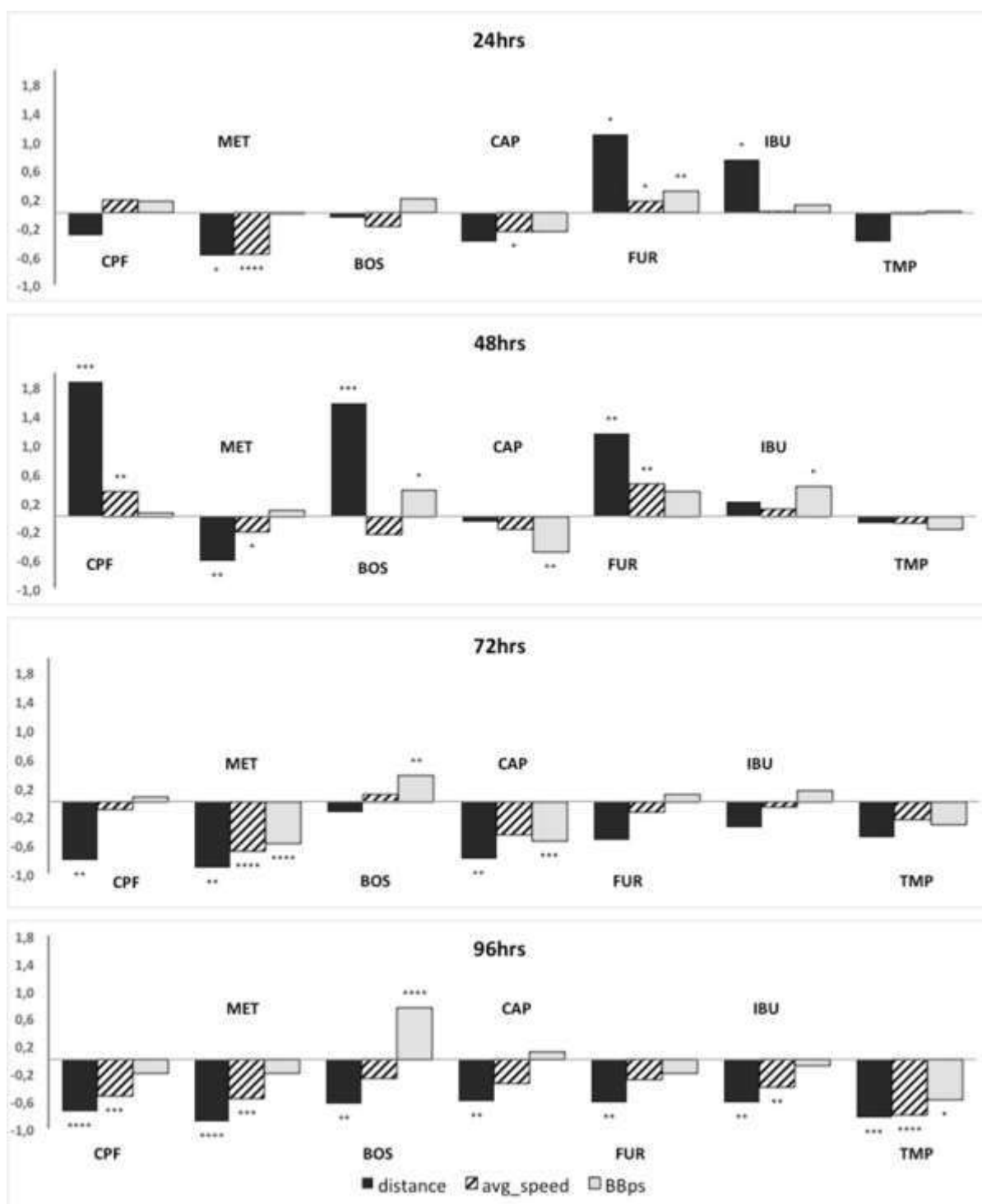


Figura 86 - Deviazione rispetto al controllo dei parametri comportamentali (Distance, AvgSpeed e BBps) indotta dalla esposizione ai 7 composti selezionati (chlorpyrifos, metholaclor, boscalid, captano, furosemide, ibuprofene, trimertoprin) per ciascuno dei quattro tempi di esposizione investigati (24, 48, 72 e 96h).

Dopo 24 ore di esposizione, il parametro comportamentale con la più alta deviazione rispetto al controllo è stata la distanza percorsa. Le variazioni osservate sono state comprese tra -58% (per il MET) e + 18% (per il FUR) per il parametro “velocità media”, e

tra -25% (MET) e + 31% (FUR) per il parametro “frequenza di curvatura corporea” (BBps).

A 48 ore, “distanza percorsa” è stato ancora l'endpoint comportamentale che ha subito la più marcata deviazione rispetto al controllo (compresa tra -62% e + 188%). In particolare, un rilevante incremento è stato indotto dalla esposizione a CPF (+ 188%), BOS (+ 158%) e FUR (+ 116%).

Dopo 48 ore di esposizione, l'erbicida MET ha indotto una riduzione della distanza percorsa del 62%.

Anche il parametro “velocità media” ha subito una riduzione statisticamente significativa rispetto al controllo (variazioni comprese tra -22% per esposizione a MET a +45% per esposizione a FUR). L'esposizione a CAP, IBU e BOS hanno, invece, indotto le maggiori variazioni nell'endpoint BBps (rispettivamente per: - 49%, + 42% e + 36%).

Dopo 72 ore di esposizione è stata osservata una riduzione di quasi tutti gli endpoint comportamentali. Questo trend è stato confermato anche dopo 96 ore di esposizione. L'unica eccezione è stata registrata per l'esposizione al BOS che ha provocato un incremento del valore di BBps all'aumentare del tempo di esposizione.

È importante evidenziare che tra 48 e 72ore, CPF, BOS e FUR hanno indotto una opposta modifica comportamentale sulla distanza percorsa dalle larve: da un iniziale marcato incremento (a 48h) ad una evidente riduzione (a 72h).

BOS e CPF hanno provocato una simile modifica nella distanza percorsa nel tempo: da un'assenza iniziale di effetti significativi a 24 ore ad un aumento sostanziale a 48 ore, con un declino che inizia a 72 ore e aumenta a 96 ore. Le altre sostanze chimiche, in modo particolare il MET, hanno dato luogo ad una generale e progressiva diminuzione dei tre endpoint misurati.

Dai risultati ottenuti risulta evidente che alla durata massima di esposizione (96h) tutti i composti testati hanno indotto alterazioni comportamentali significative (Figura 86). Dopo 96 ore la forte riduzione di tutti i parametri studiati ha dato indicazione di un generale livello di stress nelle larve testate.

I risultati ottenuti confermano la necessità di studiare, nelle specie adattate ad ambienti freddi come *Diamesa spp.*, l'effetto indotto da contaminanti per un periodo di tempo prolungato (fino a 72/96 ore) come riportato in studi precedenti (Chapman, 2016).

La riduzione generalizzata di tutti i parametri studiati dopo 48 ore e fino a 96 ore può essere spiegata dalla perdita di fitness dovuta alla perdita di energia necessaria per l'attività muscolare, per la locomozione e/o per superare l'attrito del mezzo acquatico durante il movimento. In generale, i cambiamenti nelle condizioni ambientali esterne, come la presenza di composti tossici, inducono uno stress per cui l'energia solitamente destinata alle normali funzioni vitali (quali crescita, riproduzione e locomozione) deve essere impiegata per il ripristino dello squilibrio presente (Untersteiner et al., 2003; Wolf et al., 1988). I dati ottenuti dalle analisi di danno ossidativo (Obiettivo 3.5) ci confermano che il chlorpyrifos provoca danno ossidativo a livello di lipidi e proteine solo a concentrazioni superiori o uguali alla LC50 (= 5.24 µg/L) dopo 48h di esposizione. Questa è comunque una concentrazione 767 volte più elevata di quella misurata in PR0 (WP1).

Gli organismi possono reagire attraverso meccanismi di fuga che possono dar luogo ad esempio ad un aumento della velocità di movimento, e/o attraverso meccanismi di adattamento che coinvolgono enzimi antiossidanti e disintossicanti (Binelli et al., 2011; Colwill and Creton, 2011). Entrambi i meccanismi citati richiedono energia. Nel nostro caso, si può ipotizzare che dopo 48 ore di esposizione, e indipendentemente dal

contaminante, gli organismi testati si siano trovati in una condizione di deficit energetico che ha portato ad una riduzione di tutti i parametri comportamentali.

Di più difficile spiegazione sono gli effetti comportamentali osservati dopo 24-48 ore a causa dell'elevata variabilità nei segnali di alterazione comportamentale altamente dipendenti dal tipo di composto in esame.

Tuttavia, dai risultati ottenuti, le sostanze chimiche studiate possono essere raggruppate in due grandi categorie generali a) sostanze che hanno indotto una iperstimolazione del segnale comportamentale; b) sostanze che ne hanno causato una riduzione.

I pesticidi CPF e BOS e i farmaci IBU e il FUR hanno indotto, dopo 24-48h, un aumento statisticamente significativo nella maggior parte dei parametri considerati. In particolare, IBU e FUR hanno indotto un aumento dell'attività larvale in un tempo più breve rispetto ai pesticidi. Questo può essere attribuito al più alto valore logKow (coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua) di CPF e BOS (Tabella 66) rispetto a IBU e FUR. L'elevato valore di logKow può essere stato responsabile di un ritardo nel passaggio delle molecole attraverso la membrana cellulare.

Al contrario, sostanze come MET e CAP hanno causato una riduzione delle attività delle larve. In particolare il MET ha indotto una riduzione immediata e significativa della distanza percorsa e della velocità media, mentre il CAP ha provocato una riduzione della velocità media e del BBps, rispettivamente dopo 24 e 48 ore. Le larve esposte al TMP hanno mostrato una tendenza simile. Tuttavia, fino a 72 ore di esposizione, la riduzione dell'attività rispetto al controllo non era statisticamente significativa.

Una possibile spiegazione del diverso cambiamento comportamentale indotto dai due gruppi di contaminanti è correlata al meccanismo d'azione delle sostanze chimiche indagate. Infatti, sostanze che hanno indotto una iperstimolazione dell'attività larvale presentano uno specifico modo di azione nei confronti degli invertebrati, mentre i composti che hanno indotto un decremento nelle attività comportamentali sono classificabili come composti narcotici. L'ipotesi di questa correlazione dovrebbe essere verificata da ulteriori studi.

Il CPF, avente uno specifico modo di azione nei confronti degli invertebrati, è un composto neurotossico che induce un accumulo di acetilcolina nelle sinapsi e una conseguente distruzione delle normali funzioni del sistema nervoso (Habig e Di Giulio, 1991).

Il BOS (precedentemente nicobifene o 2-cloro-N- (4'-cloro-2-bifenilil) nicotinammide) ha una struttura chimica molto simile a quella della nicotina e sebbene sia un fungicida si comporta come una neurotossina nei confronti degli invertebrati.

Al meglio delle nostre conoscenze, non sono disponibili informazioni sui potenziali effetti neurotossici di FUR sugli invertebrati. Tuttavia, questo composto ha una modalità di azione specifica sulle larve di insetti, infatti è stato riportato che agisce sulla pompa ATP-asi (Caruso-Neves et al., 2000; Maddrell e O'Donnel, 1992). Gassner e Komnick (1982) hanno dimostrato che FUR è un inibitore non competitivo dell'attività dell'ATPasi anionica nella regione rettale delle larve di libellula (*Aeshna cyanea*).

Infine, l'anti-infiammatorio IBU funziona principalmente inibendo gli enzimi cicloossigenasi (COX) utilizzati per la sintesi delle prostaglandine. Le prostaglandine sono anche ampiamente distribuite nei tessuti degli insetti, dove svolgono un ruolo importante nelle funzioni fisiologiche diverse dalla riproduzione. Dadd e Kleinjan (1979) hanno indicato il possibile ruolo delle prostaglandine nella capacità di volo delle zanzare.

Al contrario, l'inibizione degli endpoint comportamentali causata da MET, CAP e TMP potrebbe essere correlata al loro non specifico modo di azione (sostanze a comportamento narcotico verso gli invertebrati). Il comportamento di tipo narcotico è tipico delle sostanze chimiche inerti la cui tossicità può essere in gran parte attribuita alle caratteristiche idrofobiche delle molecole e non a specifiche modalità di azione (Verhaar et al., 1992). In uno dei primi studi sulle risposte comportamentali del pesce alle sostanze contaminanti, Mckim e coautori (1987) hanno notato che i composti narcotici ne inducevano una riduzione dell'attività di nuoto. Questo risultato concorda con i risultati riportati da De Lange e coautori (2006). De Lange et al. (2006), studiando le risposte comportamentali della specie *Gammarus* esposta a un tensioattivo cationico (CTAB: cetiltrimetilammonio bromuro), hanno riportato una riduzione generale dell'attività degli artropodi che è stata attribuita al non specifico modo di azione di CTAB. Barron et al. (2015), nel loro database di tossicità (MOAtox), hanno recentemente assegnato il MET alla categoria di composti narcotici non polari per quanto riguarda gli invertebrati acquatici. Analogamente, Maltby et al. (2009) hanno incluso il CAP tra i fungicidi senza una specifica modalità di azione per quanto riguarda i pesci e gli invertebrati acquatici. Questi risultati supportano l'ipotesi che la modalità d'azione possa avere un ruolo nei cambiamenti comportamentali di larve di *Diamesa zernyi*.

Nel presente studio abbiamo integrato tutte le informazioni comportamentali ottenute in un indice sintetico avente acronimo BSI (*Behavioural Score Index*) (Figura 87). L'indubbio vantaggio di questo approccio è dato dall'integrazione di tutti i cambiamenti comportamentali indotti dai contaminanti nel tempo, consentendo il loro confronto in termini di stress indotto. Solitamente negli indicatori di rischio, i punteggi assegnati vengono combinati attraverso un algoritmo per ottenere un indice numerico, utile anche a fini comparativi.

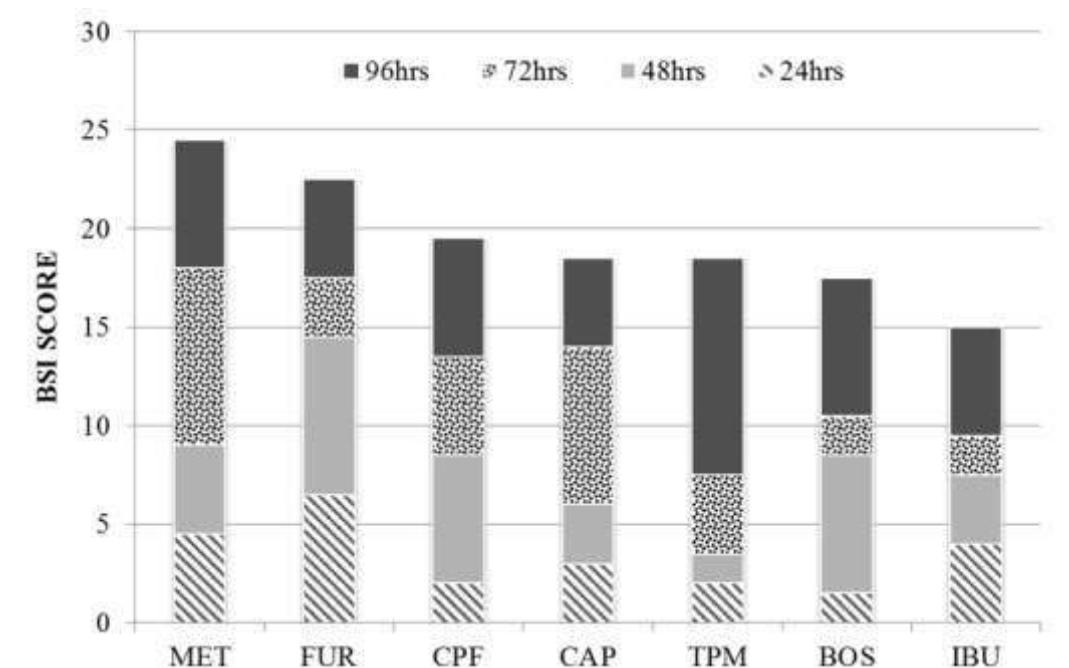


Figura 87 - Punteggi parziali (per ciascun tempo di esposizione) e finali dell'indicatore BSI ottenuti dai test comportamentali per ciascuna sostanza chimica.

Utilizzando l'indicatore BSI, le deviazioni dal controllo dei tre endpoint investigati sono state suddivise in diverse categorie di risposta comportamentale a cui sono stati assegnati punteggi diversi (Tabella 67).

Tabella 67 - Punteggi assegnati alle varie classi di deviazione numerica dai controlli per ciascun endpoint (le deviazioni sono riportate come dati normalizzati rispetto al controllo).

	Classi di deviazione numerica dal controllo					
	+(0÷0.2)	+(0.2÷0.4)	+(0.4÷0.6)	+(0.6÷0.8)	+(0.8÷1)	>+1
	-(0÷0.2)	-(0.2÷0.4)	-(0.4÷0.6)	-(0.6÷0.8)	-(0.8÷1)	<-1
Distance	0.5	1	2	3	4	5
AvgSpeed	0.5	1	2	3	4	5
BBps	0.5	1	2	3	4	5

Il valore finale del BSI è stato quindi calcolato sommando i punteggi ottenuti per i tre endpoint ai diversi tempi di esposizione (Eq 1).

$$BSI = \sum_t (\sum_i score) \text{ Eq 1}$$

Il metholaclo ha ottenuto il punteggio BSI più alto, seguito da furosemide e dal chlorpyrifos, mentre l'ibuprofene presenta il punteggio BSI più basso (Figura 87). I punteggi più alti attribuiti a MET e FUR sono principalmente dovuti alla rapidità con cui sono state indotte le risposte comportamentali da queste sostanze chimiche. Entrambi i composti hanno stimolato alterazioni significative del comportamento delle larve già nelle prime ore di esposizione (24 ore).

Osservazioni conclusive

Tutte le sostanze attive studiate (i prodotti fitosanitari: chlorpyrifos, metholaclo, boscalid e captano e i farmaci: ibuprofene, furosemide e trimetoprim) hanno provocato alterazioni comportamentali in *Diamesa zernyi* esposta a concentrazioni subletali degli stessi composti. La distanza totale percorsa dalle larve è stata la risposta comportamentale più influenzata. Tuttavia, considerando le reali concentrazioni misurate nelle acque superficiali dei principi attivi selezionati, solo l'insetticida chlorpyrifos sembra suscitare un reale pericolo per le popolazioni di *Diamesa zernyi* dal punto di vista delle alterazioni comportamentali.

I dati descritti sono pubblicazione stati pubblicati in "Comparison of the behavioural effects of pharmaceuticals and pesticides on *Diamesa zernyi* larvae (Chironomidae)" sulla rivista interanzionale *Environmental Pollution*.

Studio delle risposte comportamentali di *Diamesa cinerella* gr. esposte a concentrazioni sub-letali decrescenti dell'insetticida chlorpyrifos e dell'erbicida metholaclo.

Sulla base dei risultati ottenuti nello studio precedente (3) sono stati selezionati i due pesticidi per i quali sono stati registrati i più elevati cambiamenti comportamentali in larve di *Diamesa* (vedi Figura 87), ovvero: metholaclo (MET) e chlorpyrifos (CPF). Le

larve utilizzate per il test in oggetto sono state raccolte. La metodologia per il campionamento, la conferma della specie selezionata e la conduzione dei test tossicologici è la stessa di quella descritta nel primo paragrafo. Le larve sono state esposte per 24h, 48h e 72h a concentrazioni sub-letali decrescenti dei due pesticidi secondo la Tabella 68 riportata sotto.

Tabella 68 – Concentrazioni di CPF e MET a cui sono state esposte le larve di *Diamesa* nei test comportamentali effettuati. 1TU= LC50 (5.24 ug/L per CPF; 84.12 mg/L per il MET).

CPF		MET	
TU	ug/L	TU	mg/L
0.1	0.52	0.5	42.06
0.75	0.39	0.4	33.65
0.05	0.26	0.2	16.82
0.025	0.13	0.1	8.412
0.010	0.052	0.05	4.206
0.001	0.0052		

Per favorire la solubilizzazione delle sostanze, le soluzioni madre sono state preparate in acqua ricostituita con aggiunta di etanolo. La concentrazione finale dell'etanolo presente alla massima concentrazione testata dei due composti risulta inferiore allo 0.01% in volume (v/v). Le stesse concentrazioni di co-solvente sono state aggiunte nei beaker contenenti le larve esposte al controllo. Anche in questo test sono state misurate le deviazioni rispetto al controllo dei parametri "Distance moved" in mm; "Average speed" in mm s⁻¹; e "Body Bend per second" in n. s⁻¹. Non è stata osservata mortalità negli organismi esposti al controllo (CTRL) (Tabella 69), pertanto i test effettuati risultano validi; mentre tra le larve esposte alle più elevate concentrazioni dell'insetticida e dell'erbicida è stata osservata una significativa mortalità (

Tabella 70 e Tabella 71). In particolare, la mortalità sembra aumentare con il tempo di esposizione (48 e 72h). Questo risultato sembra confermare l'ipotesi avanzata da Chapman (2016) circa l'esistenza di un ritardo nella manifestazione della tossicità in seguito all'esposizione a contaminanti (o altri fattori di stress) in specie adattate ad ambienti freddi come *Diamesa* spp. Il ritardo nella manifestazione della tossicità in specie adattate al freddo è stato spiegato dalla ridotta velocità con cui avvengono le reazioni chimiche sia all'esterno che all'interno degli organismi e è collegato a peculiari tratti morfologici e/o fisiologici evoluti dagli stessi (es. cinetica di assorbimento più lenta) (Chapman and Riddle, 2005). I test previsti dai protocolli di tossicità adottati ufficialmente vengono generalmente condotti in laboratorio a temperature (es. 10-15 °C) superiori rispetto a quelli tipici dell'acqua di ecosistemi alpini, e per periodi di tempo predeterminati (es. 24h e 48h). I risultati ottenuti in questa fase confermano quanto visto in precedenza circa la necessità di condurre i test tossicologici sulle specie adattate al freddo per almeno 72/96h e a condizioni più vicine possibili a quelle ambientali (es. temperatura <4°C).

Tabella 69 - Dati di mortalità *Diamesa* esposta a controllo (etanolo)

24h	48h	72h
/	/	/
/	/	/
/	2	/
/	/	/

Tabella 70 - Dati di mortalità di *Diamesa* esposta a concentrazioni decrescenti di chlorpyrifos

TU	24h	48h	72h
0.1	/	3	3
0.75	/	4	1
0.05	/	1	1
0.025	/	/	/
0.01	/	/	/
0.001	/	1	/

1TU= EC50 (5.24 ug/L) CPF

Tabella 71- Dati di mortalità di *Diamesa* esposta a concentrazioni decrescenti di metholaclor

TU	24h	48h	72h
0.5	3	6	6
0.4	/	/	4
0.2	/	/	1
0.1	/	/	/
0.05	/	/	/

1TU= EC50 (84.12 mg/L) MET

Test comportamentali

Nella Figura 88 e nella Figura 89 sono riportati i risultati ottenuti per i tre parametri comportamentali scelti per le larve esposte rispettivamente al CPF e al MET. L'analisi statistica dei risultati ottenuti è ancora in fase di elaborazione. Anche in questo caso, come negli studi precedenti, sono state osservate variazioni comportamentali delle larve a tutte le diluizioni operate dei due contaminanti. In linea generale, mentre l'esposizione al CPF provoca risposte variabili in termini di incremento o riduzione del parametro osservato con specifico riferimento al tempo di esposizione e alla diluizione operata, le larve esposte al MET sperimentano, invece, una generale riduzione degli endpoint comportamentali. Questi risultati confermano quanto osservato in precedenza relativamente alla risposta di *Diamesa* a composti chimici classificati come aventi uno specifico o narcotico modo di azione verso gli invertebrati acquatici. In particolare, per il MET le alterazioni comportamentali sembrano ridursi sensibilmente al diminuire delle concentrazioni testate, con un recupero, nel tempo, alle condizioni di controllo.

Anche in questo caso, come negli studi precedenti per l'insetticida si osserva un generale opposto trend nei parametri comportamentali tra 48 e 72 ore almeno per le larve esposte alle concentrazioni più elevate del contaminante (>0.05TU). Mentre per le larve esposte alle più basse concentrazioni (CPF<0.01TU) gli effetti maggiori sono

osservati a 48h per poi subire un generale recupero alle condizioni di normalità (dopo 72 ore). Lo stress indotto dalle basse concentrazioni di CPF sembra non essere di tipo irreversibile.

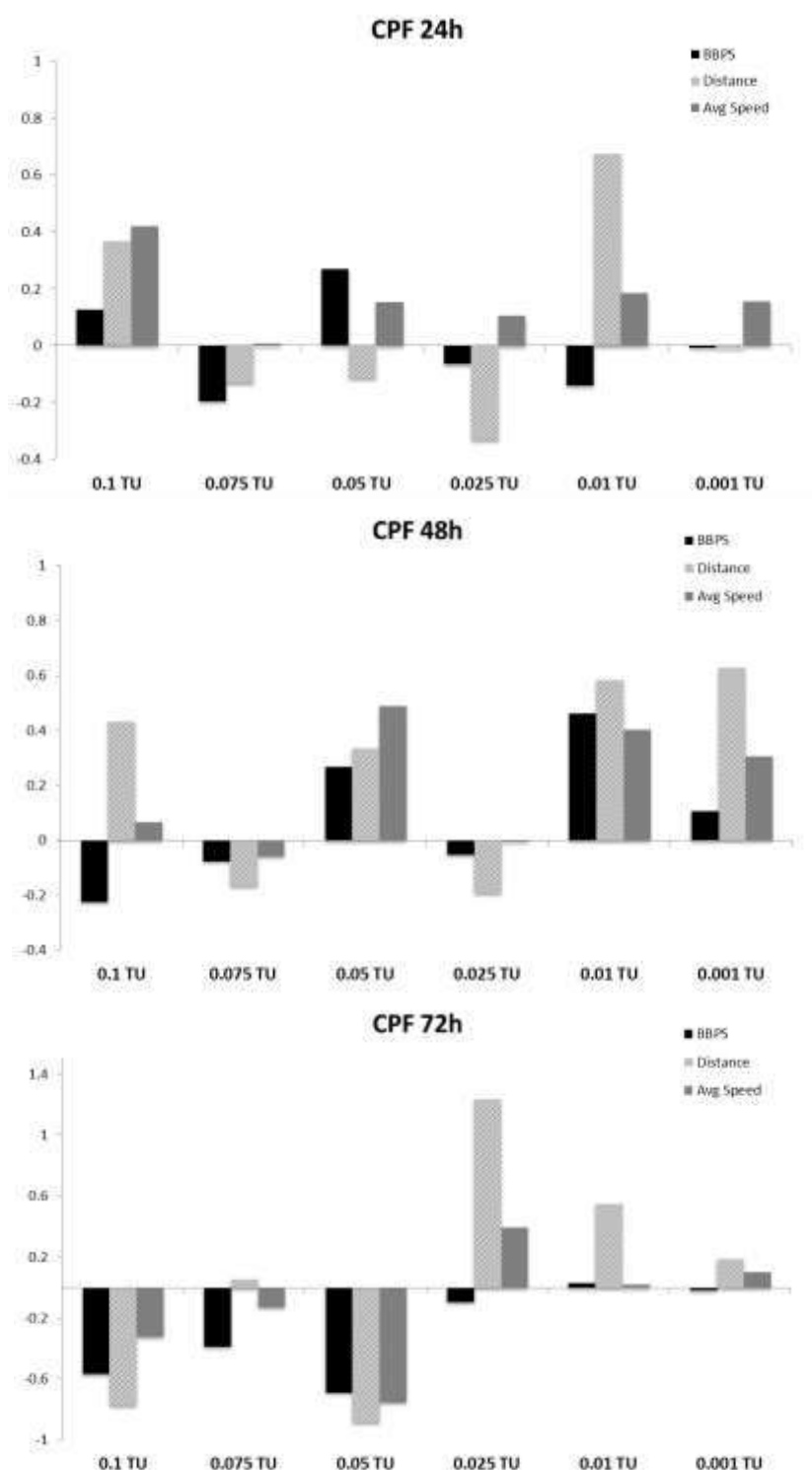


Figura 88 - Istogrammi delle variazioni comportamentali subite dalle larve di *Diamesa* esposte a concentrazioni sub-letali decrescenti di chlorpyrifos per 24h; 48h e 72h (dati normalizzati rispetto al controllo).

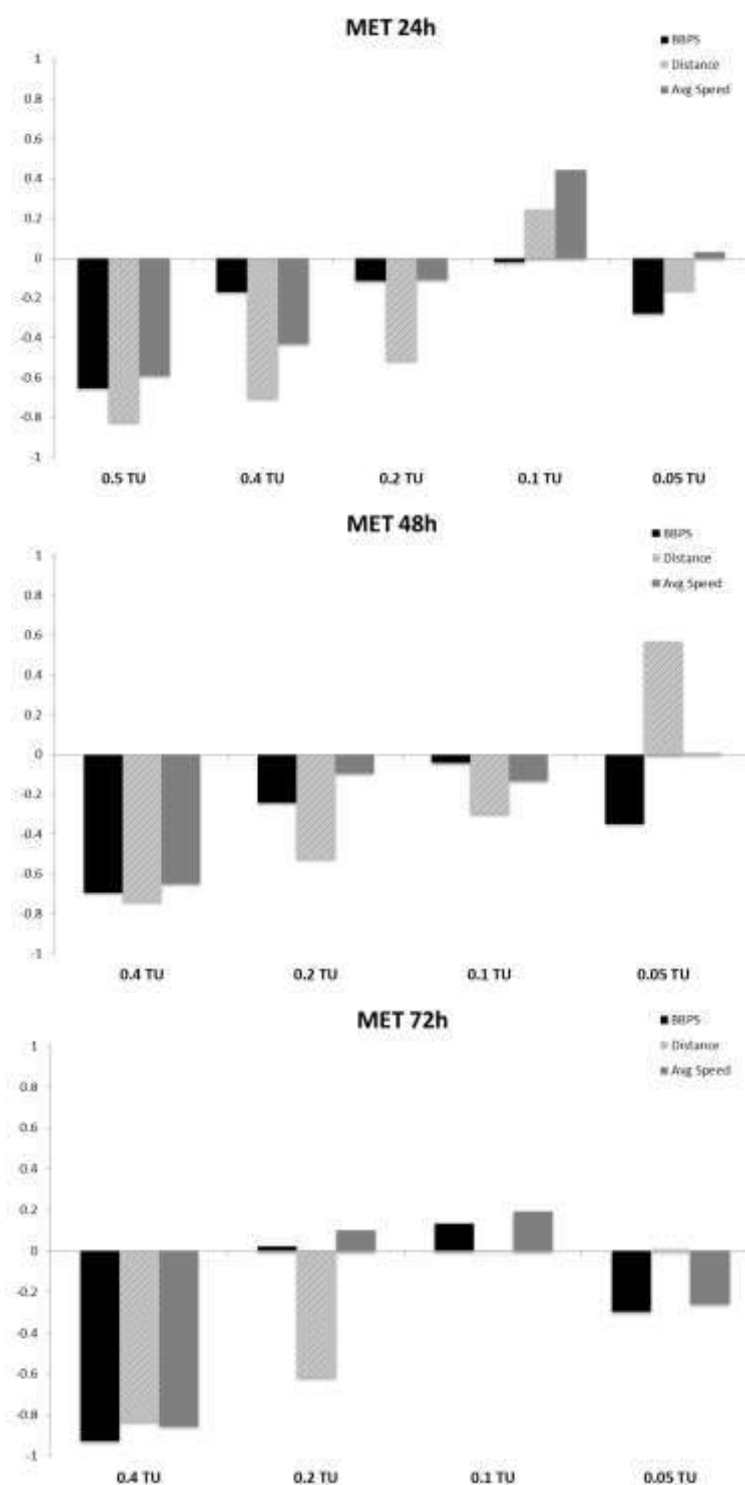


Figura 89 - Istogrammi delle variazioni comportamentali subite dalle larve di *Diamesa* esposte a concentrazioni sub-letali decrescenti di metholaclor per 24h; 48h e 72h (dati normalizzati rispetto al controllo).

A differenza dell'insetticida CPF, l'esposizione all'erbicida MET provoca una inibizione dei parametri comportamentali già dopo le prime ore di esposizione (24h) almeno per le larve esposte alle più alte concentrazioni del contaminante (>0.2TU). Mentre in linea

generale, le variazioni osservate per larve esposte a concentrazioni inferiori a 0.1TU sembrano di minore entità per avvicinarsi alle condizioni del CTRL all'aumentare del tempo di esposizione. Anche in questo caso le alterazioni indotte dalle più basse concentrazioni di contaminante sembrano essere di tipo reversibile.

I dati sopra riportati sono ancora in fase di interpretazione e validazione. Tuttavia, i risultati ottenuti sembrano essere interessanti in vista soprattutto delle concentrazioni scelte per la conduzione dei test comportamentali; concentrazioni che sono abbastanza vicine a quelle misurate in ambiente alpino. I dati sembrano essere molto interessanti e degni di essere pubblicati in rivista scientifica internazionale.

Studio delle risposte comportamentali di *Diamesa zernyi* gr. esposte a concentrazioni sub-letali decrescenti dell'insetticida chlorpyrifos a quattro differenti temperature.

Per studiare l'effetto combinato di concentrazione e temperatura crescente di tossico e temperatura dell'acqua, sono stati eseguiti test comportamentali su larve al quarto stadio di *Diamesa zernyi* gr. raccolte nel Rio Presena a settembre 2017. Tra i tossici è stato scelto il chlorpyrifos, il pesticida che sembra alterare maggiormente il movimento di questi organismi (paragrafi 4.4.6.4). Il comportamento delle larve esposte alle concentrazioni indicate in Tabella 72 è stato monitorato a differenti temperature di esposizione (2°C; 5°C; 8°C e 11°C) con l'obiettivo di studiare le variazioni comportamentali delle larve nello scenario di cambiamento climatico globale. Studi precedenti del gruppo di lavoro del MUSE hanno messo in evidenza che in questa specie non è indotta una Heat Shock Response al di sotto di 15°C dopo 1 ora di esposizione a questa temperatura (Lencioni et al., 2013). La temperatura di 11 °C rientra in questo intervallo ed è una temperatura rinvenuta in alcuni torrenti glaciali alpini in estate (Lencioni, 2018). La temperatura è stata scelta secondo una progressione aritmetica crescente a partire da 2°C, la cui ragione è 3.

La concentrazione di esposizione più elevata era pari a 1/10 della LC10 (= 1.1 µg/L) (Obiettivo 3.3). Il tempo di esposizione massimo è stato di 72h, con rinnovi delle soluzioni e registrazione dei video ogni 24h alle sole larve vive.

Tabella 72 - Concentrazioni di chlorpyrifos testate

µg/L	TU
0.11	0.1TU
0.011	0.01TU
0.0011	0.001TU

1TU=LC10 (1.1 µg/L)

Il protocollo sperimentale seguito (metodologia di campionamento, conferma della specie selezionata, conduzione dei test tossicologici e video tracking) è riportato nel primo paragrafo. La soluzione stock di CPF è stata preparata in etanolo. Alla massima concentrazione di CPF testata la concentrazione finale di co-solvente è stata sempre inferiore allo 0.01% in volume (v/v). Nel controllo sono state aggiunte le stesse concentrazioni di etanolo presenti nei gruppi trattati con CPF. I risultati ottenuti fanno riferimento alle deviazioni medie osservate per gli endpoint "Distance moved" in mm; "Average speed" in mm/s; e "Body Bend per second" in n./s.

I dati grezzi ottenuti per questo studio vengono riportati nel Materiale Supplementare. Sono in corso di elaborazione e validazione.

Materiale supplementare

Tabella S1 - Dati di mortalità per larve di *Diamesa* esposta al controllo (CTRL) con aggiunta del co-solvente utilizzato (etanolo) alle stesse concentrazioni presenti nei gruppi trattati con CPF. Gruppi di CTRL con temperatura di 2°C; 5°C; 8°C e 11°C e tempi di esposizione di 24h; 48h e 72h.

T °C	Conc.	24h	48h	72h
T2	K1	/	/	1
	K2	/	/	/
	K3	/	/	/
T °C	Conc.	24h	48h	72h
T5	K1	1	1	1
	K2	/	1	/
	K3	/	/	1
T °C	Conc.	24h	48h	72h
T8	K1	/	/	1
	K2	/	/	2
	K3	/	/	/
T °C	Conc.	24h	48h	72h
T11	K1	/	/	1
	K2	/	/	1
	K3	/	/	1

Tabella S2 - Dati di mortalità per larve di *Diamesa* esposta per 24h, 48h e 72h a concentrazioni decrescenti di chlorpyrifos e per le diverse temperature di trattamento (2°C; 5°C; 8°C e 11°C).

T °C	TU	24h	48h	72h
T2	0.1	/	/	4
	0.01	/	1	4
	0.001	/	/	/
T °C	TU	24h	48h	72h
T5	0.1	1	2	/
	0.01	1	/	2
	0.001	/	1	2
T °C	TU	24h	48h	72h
T8	0.1	/	/	/
	0.01	/	/	1
	0.001	/	/	2
T °C	TU	24h	48h	72h
T11	0.1	/	1	2
	0.01	/	2	1
	0.001	/	/	/

(1TU=EC10→CPF=1100ng/L; 0.1TU=C1→110ng/L; 0.01TU=C2→11ng/L;
0.001TU=C3→1.1ng/L)

Tabella S3 – Valori medi (e deviazione standard) per gli endpoint comportamentali “total Distance moved” (mm), “Average Speed” (mm s⁻¹) e “Body Bend per second” (in n. s⁻¹) misurati per le larve di *Diamesa* nei gruppi con CTRL (K1, K2, K3) e CPF (C1, C2, C3) a 2°C; 5°C; 8°C e 11°C dopo 24 ore di esposizione.

Trattamento			Distance mm		AvgSpeed mm/s		BBps	
Temp. °C	Tempo di esposiz. h	Conc.	media	s.d	media	s.d	media	s.d
T2	24	K1	7.182	5.264	0.698	0.244	1.028	0.397
		K2	6.377	7.345	0.762	0.670	0.967	0.706
		K3	8.078	7.581	0.860	0.486	1.143	0.493
T2	24	C1	6.131	6.789	0.533	0.336	0.880	0.536
		C2	5.433	7.078	0.544	0.403	0.976	0.617
		C3	12.732	5.519	0.839	0.147	1.120	0.299
T5	24	K1	4.676	8.331	0.449	0.458	0.640	0.454
		K2	12.659	9.852	0.967	0.409	1.034	0.253
		K3	1.936	1.349	0.542	0.371	0.540	0.428
T5	24	C1	7.541	9.317	0.451	0.447	0.369	0.453
		C2	3.810	5.634	0.432	0.344	0.505	0.489
		C3	6.196	7.994	0.585	0.408	0.774	0.508
T8	24	K1	5.584	3.220	0.970	0.204	1.107	0.357
		K2	5.565	4.590	0.886	0.397	0.772	0.278
		K3	3.213	3.033	0.597	0.380	0.896	0.431
T8	24	C1	8.266	4.272	1.088	0.287	1.033	0.370
		C2	5.749	3.995	0.821	0.217	0.896	0.248
		C3	9.745	6.408	1.718	2.064	1.282	0.749
T11	24	K1	11.739	8.481	1.112	0.499	1.256	0.436
		K2	14.105	8.013	1.124	0.293	1.298	0.432
		K3	10.013	5.240	0.867	0.150	0.964	0.381
T11	24	C1	9.529	6.703	0.841	0.299	1.381	0.695
		C2	12.680	7.491	1.114	0.371	1.180	0.311
		C3	10.840	8.202	0.695	0.362	1.000	0.543

Tabella S4 – Valori medi (e deviazione standard) per gli endpoint comportamentali “total Distance moved” (mm), “Average Speed” (mm s⁻¹) e “Body Bend per second” (in n. s⁻¹) misurati per le larve di *Diamesa* nei gruppi con CTRL (K1, K2, K3) e CPF (C1, C2, C3) a 2°C; 5°C; 8°C e 11°C dopo 48 ore di esposizione.

Trattamento			Distance mm		AvgSpeed mm/s		BBps	
Temp. °C	Tempo di esposiz. h	Conc.	media	s.d	media	s.d	media	s.d

Trattamento			Distance mm		AvgSpeed mm/s		BBps	
Temp. °C	Tempo di esposiz. h	Conc.	media	s.d	media	s.d	media	s.d
T2	48	K1	3.408	1.661	1.223	0.696	1.126	0.686
		K2	4.233	3.043	0.619	0.242	1.182	0.467
		K3	5.651	4.775	0.600	0.316	0.715	0.459
T2	48	C1	2.719	2.857	0.670	0.430	1.424	0.939
		C2	8.726	4.932	0.792	0.125	0.922	0.502
		C3	7.548	8.775	0.659	0.344	0.933	0.491
T5	48	K1	16.129	25.395	2.008	2.223	0.444	0.545
		K2	5.709	3.160	0.729	0.204	0.959	0.264
		K3	0.460	0.152	0.107	0.016	0.181	0.234
T5	48	C1	3.177	2.529	0.456	0.180	1.028	0.631
		C2	2.961	2.481	0.969	1.037	0.489	0.420
		C3	4.913	7.848	0.423	0.418	0.407	0.410
T8	48	K1	4.174	4.232	0.765	0.394	1.522	0.916
		K2	2.248	1.814	0.596	0.388	0.522	0.187
		K3	0.734	0.716	0.288	0.263	0.241	0.295
T8	48	C1	11.596	8.525	1.275	0.363	1.052	0.320
		C2	8.083	6.057	0.934	0.083	1.037	0.301
		C3	4.432	5.716	0.628	0.468	0.796	0.565
T11	48	K1	12.337	9.263	1.266	0.250	1.207	0.494
		K2	5.164	2.888	0.870	0.293	0.900	0.503
		K3	10.629	7.769	0.877	0.431	0.922	0.348
T11	48	C1	1.406	1.391	0.626	0.641	1.596	1.047
		C2	17.846	6.913	1.145	0.211	1.172	0.145
		C3	5.587	4.905	0.576	0.270	0.919	0.571

Tabella S5 – Valori medi (e deviazione standard) per gli endpoint comportamentali “total Distance moved” (mm), “Average Speed” (mm s⁻¹) e “Body Bend per second” (in n. s⁻¹) misurati per le larve di *Diamesa* nei gruppi con CTRL (K1, K2, K3) e CPF (C1, C2, C3) a 2°C; 5°C; 8°C e 11°C dopo 72 ore di esposizione.

Trattamento			Distance mm		AvgSpeed mm/s		BBps	
Temp.°C	Tempo di esposiz. h	Conc.	media	s.d	media	s.d	media	s.d
T2	72	K1	1.920	2.384	0.301	0.155	0.441	0.434
		K2	4.316	3.972	0.449	0.207	0.433	0.324
		K3	5.020	5.486	0.417	0.265	0.861	0.447

Trattamento			Distance mm		AvgSpeed mm/s		BBps	
Temp.°C	Tempo di esposiz. h	Conc.	media	s.d	media	s.d	media	s.d
T2	72	C1	0.661	0.956	0.215	0.204	0.563	0.625
		C2	5.536	5.662	0.686	0.137	1.078	0.532
		C3	4.696	3.578	0.714	0.157	1.037	0.433
T5	72	K1	3.728	3.120	0.604	0.394	0.715	0.473
		K2	3.796	1.279	0.771	0.311	0.978	0.324
		K3	1.272	1.268	0.816	0.725	0.745	0.525
T5	72	C1	1.664	1.315	0.792	0.665	0.517	0.196
		C2	2.903	3.190	0.533	0.327	0.533	0.450
		C3	6.708	7.737	0.524	0.388	0.537	0.493
T8	72	K1	7.777	7.939	0.747	0.542	0.695	0.501
		K2	6.092	8.263	0.478	0.396	0.472	0.418
		K3	1.107	1.245	0.156	0.051	0.230	0.216
T8	72	C1	5.818	7.674	0.539	0.446	0.474	0.272
		C2	7.421	6.155	0.866	0.103	0.978	0.296
		C3	5.122	5.656	1.081	0.432	0.874	0.268
T11	72	K1						
		K2						
		K3						
T11	72	C1						
		C2						
		C3						

3.15.7 Obiettivo 3.7: Analisi di bioaccumulo: Obiettivo 3.7.A: Analisi di bioaccumulo di farmaci in 10 taxa di macroinvertebrati (analisi a cura della dott.ssa Sara Castiglioni, Istituto Mario Negri di Milano); Obiettivo 3.7.B: Analisi di elementi in traccia in acqua e in *Diamesa* spp (analisi a cura del dott. Paolo Gabrielli, Ohio University, USA)

Obiettivo 3.7.A: Analisi di bioaccumulo di farmaci in 10 taxa di macroinvertebrati (analisi a cura della dott.ssa Sara Castiglioni, Istituto Mario Negri di Milano)

L'Istituto Mario Negri di Milano ha effettuato analisi di residui di farmaci in alcune specie di macroinvertebrati alpini raccolti, determinati e conservati per le analisi dai ricercatori del MUSE, con cui i dati sono stati poi discussi. Le attività svolte sono state: (i) selezione dei farmaci e delle specie da analizzare; (ii) messa a punto di un metodo analitico per l'identificazione e la quantificazione delle sostanze; (iii) validazione del metodo analitico; (iv) analisi dei macroinvertebrati alpini.

Selezione degli analiti (farmaci) e delle specie target

I composti da ricercare sono stati selezionati nella classe di contaminati emergenti dei farmaci poiché sono ubiquitari nell'ambiente e possiedono probabilità di bioaccumulo. È stata operata una selezione tra i farmaci precedentemente analizzati nelle acque del torrente Vermigliana seguendo i seguenti criteri:

- presenza nelle acque del torrente Vermigliana;
- evidenza di potenzialità di bioaccumulo.

Più in dettaglio sono state considerate le sostanze presenti in concentrazioni nell'ordine delle decine di ng/l nelle acque del torrente e per queste sostanze sono stati raccolti dei parametri in grado di indicare la potenzialità di bioaccumulo in organismi acquatici. Tali parametri sono: il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua (K_{ow}), la costante di dissociazione acida (pK_a), il coefficiente di distribuzione ottanolo/acqua (D_{ow}) (Tabella 73). Il $\log K_{ow}$ influenza il bioaccumulo di una sostanza in un organismo nel caso in cui questa sostanza sia in forma neutra, alcuni farmaci possono invece avere una carica ionica positiva o negativa che varia al variare del pH e che può alterare e/o modificare il tipo di interazione con gli organismi acquatici. E' stato pertanto necessario verificare questa possibilità. I farmaci con $\log K_{ow}$ superiori a 2,5 sono stati inizialmente selezionati poiché possiedono più alta probabilità di bioaccumulo e sono state raccolte informazioni sullo stato di carica ionica di queste sostanze a pH ambientale (pH 7.0). Dai dati raccolti (Tabella 73), i farmaci selezionati si trovano tutti in forma neutra a pH ambientale e la potenzialità di bioaccumulo dipende quindi dal valore di $\log K_{ow}$. I composti selezionati, appartenenti a varie classi terapeutiche, sono stati: carbamazepina (antiepilettico), claritromicina (antibiotico), irbesartan, losartan, valsartan (antiipertensivi), diclofenac, ibuprofene, ketoprofene e naprossene (antiinfiammatori).

Tabella 73 - Farmaci selezionati con valori di log Kow, pKa e log Dow. * valori calcolati a pH ambientale.

Farmaco	Concentrazioni Torrente Vermigliana (ng/L)	log Kow	pKa	log Dow*
Carbamazepina	5,14	2,5	13,9	2,45
Claritromicina	80,37	3,16	9,2	-
Diclofenac	41,9	4,51	4,18	0,3
Ibuprofene	619	3,8	4,3/4,5	0,2
Naprossene	91,25	3,1	4,2	-0,52
Valsartan	163,8	5,8	4,73/3,9	-
Irbesartan	11,11	6	4,7	-
Losartan	23,28	6,1	3,15	-
Ketoprofene	7,96	3	3,98	-0,11

Messa a punto di un metodo analitico basato su cromatografia liquida abbinata a spettrometria di massa (HPLC-MS/MS)

Preparazione del campione

Per la messa a punto del metodo di estrazione ed analisi per i farmaci selezionati sono stati utilizzati 6 taxa di invertebrati raccolti nel Torrente Vermigliana nell'inverno 2016. Gli animali sono stati raccolti come descritto nell'obiettivo 3.2. In laboratorio, sono stati smistati e determinanti al livello tassonomico riportato in Tabella 77 ad occhio nudo o mediante l'ausilio dello stereomicroscopio, mantenendoli vivi. Gli animali sono stati trasferiti con pinzetta su carta assorbente, pesati con bilancia analitica di 200 g di capacità e con risoluzione di 0.1 mg. I campioni di macroinvertebrati sono stati posti in falcon da 50 ml e conservati al buio a -20°C fino al momento dell'analisi. Le quantità utilizzate sono riportate in Tabella 74.

Tabella 74 -. Elenco e peso fresco dei macroinvertebrati disponibili per l'analisi.

Macroinvertebrati	Peso fresco (mg)
Trichoptera Rhyacophilidae	100
Trichoptera Phylopotamidae	130
Trichoptera Hydropsychidae	700
Ephemeroptera Heptageniidae	470
Ephemeroptera Baetidae	220

Dopo aver pesato i macroinvertebrati disponibili, sono stati sottoposti a liofilizzazione. Le aliquote ottenute sono state unite e omogenate con l'aiuto di un mortaio e di un pestello fino all'ottenimento di una polvere sottile pronta per le prove di estrazione.

Estrazione del campione

La procedura analitica è stata messa a punto adattando alcune metodiche presenti in letteratura (Castiglioni et al., 2006; Vannini et al., 2011) ed è consistita in due fasi principali:

1. Estrazione in ultrasuoni
2. Purificazione su fase solida

Per la purificazione in fase solida sono state testate due tipologie di cartucce con caratteristiche adatte alla purificazione/estrazione degli analiti selezionati da una complessa matrice biologica: HLB PRIME (Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA), e Phree Phospholipid Removal Plates (Phenomenex, California, USA).

Le prove di recupero sono state effettuate utilizzando i campioni omogenati a cui sono state aggiunte quantità note della miscela dei farmaci selezionati. Un campione è stato analizzato senza alcuna aggiunta per rilevare l'eventuale presenza di farmaci e correggere i valori di recupero ottenuti se necessario, questo campione viene chiamato in seguito "matrice". In ogni campione sono stati aggiunti degli standard di riferimento (analiti marcati con deuterio) per la successiva analisi quantitativa.

Prove di recupero su cartucce HLB.

Sono stati pesati i seguenti campioni per l'estrazione:

- Matrice HLB 30.3 mg
- Recupero HLB 1 29 mg
- Recupero HLB 2 30.5 mg
- Recupero HLB 3 30.5 mg

In ogni campione sono stati aggiunti 2 ng del mix di standard di riferimento (20 µl da una soluzione 0.1 ng/µl), mentre nei campioni per le tre prove di recupero sono stati aggiunti 2 ng (20 µl da una soluzione 0.1 ng/µl) del mix di farmaci da analizzare. I campioni sono stati agitati su vortex e lasciati asciugare per 30 minuti sotto cappa.

L'estrazione in ultrasuoni è stata effettuata aggiungendo 1 ml di metanolo, agitando su vortex per 2 minuti e ponendo i campioni in ultrasuoni per 30 minuti. I campioni sono stati successivamente centrifugati a 2400 rpm per 2 minuti ed il surnatante è stato prelevato e conservato. Il procedimento di estrazione è stato ripetuto per 3 volte.

L'estratto finale, corrispondente ad un volume di 3 ml circa, è stato portato a secco sotto flusso d'azoto. Le aliquote sono state risospese in 5 ml di acqua Milli-Q, agitate su vortex e caricate sulle cartucce HLB Prime per l'estrazione in fase solida. Le cartucce sono state eluite con 2 ml di metanolo e l'estratto è stato portato a secco sotto flusso d'azoto e risospeso in 200 µl di acqua Milli-Q. I campioni risospesi sono stati centrifugati a 2700 rpm per 5 minuti e sono stati infine trasferiti in vials per l'analisi in HPLC-MS/MS.

Prove di recupero su cartucce PHREE.

Sono stati pesati i seguenti campioni per l'estrazione:

- Matrice PHREE 28.7 mg
- Recupero PHREE 1 30.4 mg

- Recupero PHREE 2 27 mg
- Recupero PHREE 3 29.7 mg

In ogni campione sono stati aggiunti 2 ng del mix di standard di riferimento (20 µl da una soluzione 0.1 ng/µl), mentre nei campioni per le tre prove di recupero sono stati aggiunti 2 ng (20 µl da una soluzione 0.1 ng/µl) del mix di farmaci da analizzare. I campioni sono stati agitati su vortex e lasciati asciugare per 30 minuti sotto cappa.

L'estrazione in ultrasuoni è stata effettuata come descritto precedentemente, mentre la fase di passaggio sulle cartucce è avvenuta in modo differente. L'estratto ottenuto, corrispondente ad un volume di 3 ml circa, è stato fatto evaporare sotto flusso d'azoto fino ad ottenere un volume di 1 ml circa per ogni campione. Due differenti metodologie sono state testate per l'estrazione. Uno dei campioni è stato portato a secco completamente sotto flusso d'azoto, e risospeso in 200 µl di acqua Milli-Q a cui sono stati aggiunti 800 µl di metanolo acidificato con acido formico all'1% per la purificazione sulle colonnine Phree. I campioni rimanenti, incluso il bianco, sono stati evaporati fino ad un volume di 800 µl e sono stati aggiunti 8 µl di acido formico e 200 µl di acqua Milli-Q. Tutti i campioni sono stati caricati su cartucce Phree, gli eluati sono stati portati a secco e successivamente risospesi in 200 µl di acqua Milli-Q per l'analisi in HPLC-MS/MS.

Analisi del campione

È stata preparata una retta di calibrazione con le seguenti concentrazioni rispettivamente di miscela di standard di riferimento e di miscela di analiti da quantificare (farmaci): 2-0; 2-0.06; 2-0.2; 2-0.6; 2-2; 2-6. Le aliquote preparate per la retta di calibrazione sono state portate a secco e risospese come descritto precedentemente per i campioni (200 µl di acqua Milli-Q).

I campioni sono stati analizzati mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (HPLC-MS/MS), seguendo un metodo per i farmaci già validato nel nostro laboratorio (Castiglioni et al., 2005). Le analisi sono state effettuate considerando le due transizioni (ione molecolare/ione prodotto) più abbondanti per ciascun analita ed utilizzando il metodo della diluizione isotopica per la quantificazione. Le analisi sono state effettuate in modalità positiva o negativa a seconda delle caratteristiche di ionizzazione dei composti. Carbamazepina, claritromicina, irbesartan, losartan e valsartan sono stati analizzati in modalità positiva, e diclofenac, ibuprofene, ketoprofene e naprossene in modalità negativa.

Risultati di validazione del metodo

I risultati di recupero ottenuti sono riportati in Tabella 75. Per entrambe le estrazioni sono state riportate le medie percentuali, calcolate sui tre replicati, e le deviazioni standard relative in percentuale. Le due metodologie adottate per l'estrazione su cartucce Phree non hanno mostrato differenze rilevanti e sono state pertanto accorpate in un risultato unico. Nel complesso le prove di recupero hanno avuto un buon esito sia con l'utilizzo delle cartucce Phree (con qualche eccezione come irbesartan, losartan e naprossene), sia con le cartucce HLB prime. Queste ultime sono state scelte per l'estrazione dei campioni poichè hanno consentito di ottenere recuperi migliori per tutti i farmaci presi in esame.

Tabella 75 - Confronti risultati recuperi (medie e deviazioni standard relative) su cartucce HLB Prime e PHREE.

Farmaci	Cartucce PHREE	Cartucce HLB Prime
	Recuperi \pm RSD (%)	Recuperi \pm RSD (%)
Carbamazepina	84,0 \pm 0,8	77,6 \pm 7,7
Irbesartan	34,8 \pm 19,0	109,1 \pm 6,0
Losartan	33,7 \pm 17,2	121,1 \pm 5,1
Valsartan	87,5 \pm 1,8	85,0 \pm 7,9
Claritromicina	111,5 \pm 0,2	79,8 \pm 11,7
Ibuprofene	92,6 \pm 10,1	89,4 \pm 9,7
Ketoprofene	87,7 \pm 28,1	86,2 \pm 12,0
Naprossene	249,7 \pm 42,9	79,8 \pm 6,8

Le rette di calibrazione sono risultate lineari per tutti i composti presi in esame con coefficienti di correlazione uguali o superiori a 0.998. Il primo punto della retta di calibrazione in cui è presente solo la miscela di standard di riferimento è stato utilizzato come “bianco strumentale” per valutare la presenza di eventuali contaminazioni strumentali degli analiti di interesse. Tali contaminazioni sono risultate assenti. Un “bianco analitico” è stato analizzato con ciascun set di campioni per controllare la presenza di eventuali contaminazioni durante la procedura di estrazione del campione. I limiti di sensibilità del metodo sono stati calcolati come la concentrazione a cui corrisponde un valore del rapporto segnale/rumore di 3 (limite di rilevabilità – LOD) e di 10 (limite di quantificazione - LOQ). I limiti di rilevabilità e quantificazione sono riportati in Tabella 76 e generalmente sono nell’ordine di pochi ng/g peso secco.

Tabella 76 - Limiti di quantificazione (LOQ) degli analiti.

Farmaci	LOD ng/g	LOQ ng/g
Carbamazepina	0.24	0.80
Irbesartan	0.14	0.46
Losartan	0.20	0.66
Valsartan	0.99	3.33
Claritromicina	0.74	2.48
Ibuprofene	5.28	17.6
Ketoprofene	4.38	14.6
Naprossene	0.60	2.0
Diclofenac	1.38	4.6

Analisi di farmaci in macroinvertebrati alpini

Una volta messo a punto il metodo di estrazione, sono state eseguite le analisi su 10 taxa di macroinvertebrati raccolti nel Torrente Vermigliana a valle dello scarico del depuratore, tra febbraio e marzo 2016 (Tabella 77).

Tabella 77 - Elenco dei taxa utilizzati nelle analisi di bioaccumulo (tutti insetti a parte gli oligocheti). E= erbivori; D= detritivore; C= carnivore; SHR= shredders (tagliuzzatori); GRA= grazers, scrapers (raschiatori), PFIL= filtratori-raccoglitori (passivi); DET=detritivore; PRE=predatori; SWI= Swimmer (nuotatore); CRA= Crawler (camminatore); BUR= Burrower (che si infila nel limo); INT= Interstitial (interstiziale); T_ATT= Temporarily attached (che vive temporaneamente attaccato al substrato).

		Ruolo trofico	Gruppo trofico funzionale	Tipo di movimento	Peso fresco (mg)
Diptera	<i>Diamesa cinerella</i> gr.	E-D	GRA+DET	SWI	1048
Ephemeroptera	<i>Baetis alpinus</i> + <i>Baetis rhodani</i>	E-D	GRA+DET	SWI	1765
Plecoptera	Leuctridae, Nemouridae	E-D	SHR+DET+GRA	CRA	2384
Trichoptera	Limnephilidae	E-D	SHR+GRA+DET +PRE	CRA	2969
Diptera	Simuliidae	E-D	PFIL	T_ATT	1666
Diptera	<i>Pseudodiamesa branickii</i>	C	PRE	SWI	1631
Plecoptera	<i>Perlodes</i> sp.	C	PRE	CRA	972
Trichoptera	<i>Rhyachophila</i> spp.	C	PRE	CRA	410
Plecoptera	<i>Isoperla</i> sp.	C	PRE+GRA	CRA	453
Oligochaeta	Oligochaeta	D	DET	INT, BUR	862

In alcuni casi più taxa sono stati trattati raggruppati sulla base del loro ruolo trofico e gruppo trofico funzionale di appartenenza, così da raggiungere un peso fresco di almeno 0,5 g circa per ogni gruppo. Cinque taxa sono predatori-consumatori (i plecoteri *Perlodes* sp. e *Isoperla* sp.; il tricoter *Rhyachophila* spp. e il dittero chironomide *Pseudodiamesa branickii*), tutti camminatori (crawler) tranne il chironomide che è un nuotatore; 1 taxon detritivoro (oligocheti), che vive nel sedimento di cui si nutre; 1 taxon filtratore che vive temporaneamente adeso ai sassi sommersi (simulidi) e 4 gruppi con dieta “vegetariana” composta di alghe, frammenti di foglie, detrito, nuotatori (*Diamesa cinerella* gr., *Baetis alpinus*) e 3 camminatori (Leuctridae, Nemouridae e Limnephilidae).

I campioni di macroinvertebrati sono stati posti in falcon da 50 ml e conservati al buio a -20°C fino al momento dell'analisi. Sono stati prima liofilizzati, poi sminuzzati finemente con l'aiuto di mortaio e pestello e pesati per l'analisi. Ogni taxon è stato pesato al fine di ottenere un'aliquota di circa 30 mg di peso secco. Il taxon Plecoptera è stato suddiviso in due aliquote. La lista dei campioni analizzati con il rispettivo peso secco è riportato in Tabella 78.

Tabella 78 - Peso secco dei macroinvertebrati per l'estrazione.

Taxon	Peso secco (mg)
Plecoptera 1	30,25
Plecoptera 2	29,9
Limnephilidae	30,28
Simuliidae	30,19
Perlodidae <i>Perlodes</i>	29,26
<i>Pseudodiamesa branickii</i>	31,00
<i>Diamesa cinerella</i> gr.	31,57
<i>Baetis</i> spp	30,36
<i>Baetis alpinus</i>	30,32
Perlodidae <i>Isoperla</i>	30,39
Oligochaeta	30,13
<i>Rhyacophila</i> spp.	30,18

Le analisi dei campioni sono state effettuate seguendo la procedura di estrazione e purificazione messa a punto in precedenza. È stata effettuata un'estrazione in ultrasuoni ed una purificazione su cartucce HLB Prime (Waters Corp., Milford, Milford, MA, USA). I campioni sono stati analizzati in tre giorni consecutivi, per questo i macroinvertebrati sono stati divisi in tre gruppi: 1° gruppo: Plecoptera 1, Plecoptera 2, Limnephilidae e Simuliidae; 2° gruppo: Perlodidae *Perlodes*, *Pseudodiamesa*, *Diamesa*, *Baetis* spp.; 3° gruppo: *Baetis alpinus*, *Perlodidae Isoperla*, Oligochaeta, Rhyacophilidae. Ogni gruppo (batch analitico) è stato analizzato con un "bianco analitico" e un campione in cui è stata aggiunta una quantità nota di miscela di analiti (2 ng) per controllare l'efficienza di estrazione ed analisi (quality control). Entrambi sono stati sottoposti alla stessa procedura di estrazione e purificazione dei campioni. La quantificazione è stata effettuata come descritto precedentemente, ossia utilizzando una retta di calibrazione con le seguenti concentrazioni rispettivamente di miscela di standard di riferimento e di miscela di analiti da quantificare (farmaci): 2-0; 2-0.04; 2-0.08; 2-0.2; 2-0.4; 2-0.8; 2-2; 2-4.

Gli estratti dei campioni e la retta di calibrazione sono stati portati a secco e risospesi in 200 µl di acqua Milli-Q per l'analisi in HPLC-MS/MS. L'analisi in modalità positiva che include carbamazepina, claritromicina, irbesartan, losartan e valsartan è stata effettuata utilizzando una colonna Kinetex 5 µm C18 100 Å, e acido formico 0.1% in acqua Milli-Q/ acetonitrile per la separazione cromatografica. L'analisi in modalità negativa che include diclofenac, ibuprofene, ketoprofene e naprossene è stata effettuata utilizzando una colonna X-Bridge 100x2.1 mm 3.5 µm, e trietilammina 0.025% in acqua Milli-Q/acetonitrile per la separazione cromatografica. Per l'antibiotico claritromicina è stata effettuata un'estrazione in fase solida anche per la retta di calibrazione, preparata come descritto precedentemente. Ogni punto della retta dopo evaporazione è stato risospeso in 5 ml di acqua Milli-Q e caricato su cartucce HLB Prime per l'estrazione. L'eluizione è stata effettuata con 2 ml di metanolo, gli eluati sono stati portati a secco sotto flusso d'azoto, e risospesi in 200 µl di acqua Milli-Q come descritto per i campioni.

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 79. Tracce dei farmaci analizzati sono stati misurati in tutti gli organismi analizzati, come atteso avendo tutti un valore di log Kow ≥ 3 (tranne la carbamazepina = 2.4), quindi potenzialmente bioaccumulabili. I taxa in cui in media sono stati trovati più farmaci sono Limnephilidae e Oligochaeta (5 farmaci rinvenuti con concentrazione >LOQ, di cui 3 in comune: claritromicina, valsartan,

ibuprofene), quello in cui ne sono stati trovati meno è *B. alpinus* (2 farmaci: carbamazepina e valsartan). *B. alpinus* è risultata essere anche la specie più sensibile ai farmaci (ibuprofene, furosemide e trimetoprim) e al triclocarban rispetto alle altre specie testate. Per tutte le quattro molecole testate è stato infatti possibile stimare un valore di LC10 e LC50 tra 24 e 72 ore di esposizione. I farmaci sono risultati essere anche genotossici in questa specie, sia in estate che in inverno (più nella popolazione a monte dello scarico che in quella a valle).

Tabella 79 - Concentrazioni (ng/g peso secco) di farmaci nei macroinvertebrati analizzati. La media è stata calcolata inserendo il valore di LOD (=Limite di rilevabilità) nelle celle con "<LOQ". I taxa sono in ordine decrescente di concentrazione media totale di farmaci rinvenuta. * medie calcolate considerando il valore di LOD nelle celle "<LOQ". ** N= numero di farmaci rinvenuti in concentrazioni >LOQ.

	Carbamazepina	Irbesartan	Losartan	Valsartan	Claritromicina	Ketoprofene	Ibuprofene	Naproxene	Diclofenac	Media per taxon*	ds	N**
Limnephilidae	1.5	0.9	<LOQ	10.8	4.4	<LOQ	543.3	<LOQ	<LOQ	63.1	180.1	5
Oligochaeta	<LOQ	<LOQ	<LOQ	15.2	4.5	95.9	197.5	9.6	<LOQ	36.1	67.9	5
Diamesa cinerella gr.	<LOQ	1.4	0.6	3.5	<LOQ	<LOQ	69.1	<LOQ	<LOQ	9.1	22.6	4
Perlodes sp.	2.1	0.9	<LOQ	<LOQ	10.6	<LOQ	51.4	2.7	<LOQ	8.3	16.5	5
Leuctridae, Nemouridae	1.9	<LOQ	<LOQ	4.8	<LOQ	<LOQ	52.2	1.5	5.2	7.9	16.7	5
Pseudodiamesa branickii	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	36.6	<LOQ	<LOQ	5.0	11.9	1
Rhyachophile spp.	0.9	0.6	<LOQ	<LOQ	3.6	<LOQ	30.6	<LOQ	<LOQ	4.8	9.8	4
Isoperla sp.	1.2	1.1	0.7	<LOQ	2.9	<LOQ	9.4	<LOQ	<LOQ	3.0	3.5	5
Simuliidae	1.2	1.3	1.2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11.2	2.5	2.9	4
Baetis alpinus	2.3	<LOQ	<LOQ	4.6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2.2	2.0	2
Media per farmaco negli invertebrati ng/g*	1.2	0.7	0.4	4.4	3.0	13.5	100.1	1.8	2.7			
ds	0.8	0.5	0.4	4.9	3.1	28.9	165.5	2.8	3.2			

L'ibuprofene, appartenente alla classe degli anti-infiammatori, è il farmaco rilevato in concentrazioni più elevate (media 100 ± 166 ng/g peso secco; range: da <LOQ in *B. alpinus* e Simuliidae a 543 ng/g peso secco nei Limnephilidae) e quello bioaccumulato dal maggior numero di taxa (8 su 10), nonostante non sia il farmaco con il log Kow più elevato (3.8). Complessivamente solo 5 farmaci si sono accumulati in almeno il 50% dei taxa: carbamazepina, irbesartan, valsartan e claritromicina. Il ketoprofene è quello che si è accumulato in meno taxa, ovvero solo negli Oligochaeta (con valori piuttosto alti: 96 ng/g peso secco).

È interessante notare come l'ibuprofene sia anche il farmaco risultato più abbondante nelle acque del Torrente Noce in cui sono stati prelevati i macroinvertebrati analizzati (619 ng/L; Tabella 73). Anche altre sostanze presenti nelle acque del torrente in concentrazioni elevate (valsartan, claritromicina, naproxene e diclofenac) risultano presenti anche nei macroinvertebrati in concentrazioni generalmente maggiori di 5 ng/g peso secco. La relazione tra concentrazione del farmaco negli animali e la sua concentrazione in acqua è significativa ($p=0.04$) (Figura 90).

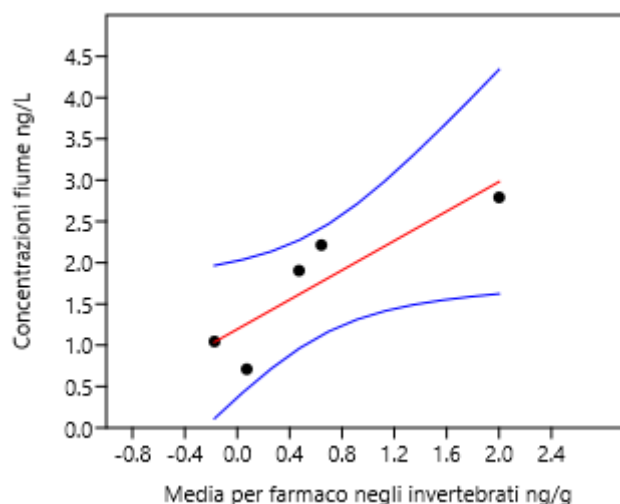


Figura 90 – Regressione Lineare tra Log Concentrazione del farmaco nel fiume e negli organismi ($R^2 = 0.79$, $p = 0.04$).

I detritivori “burrowers” sono i taxa che accumulano più farmaci (Figura 91). Questo emerge in tutti e tre i grafici (A, B, C), in quanto gli unici detritivori-interstiziali-scavatori (D, DET, INT-BUR) sono gli Oligochaeta. Essi vivono nel sedimento di cui si nutrono e in cui vivono, scavando tubuli. Ingeriscono le particelle di sedimento, che selezionano semplicemente secondo le loro dimensioni, ne assimilano la parte digeribile ed espellono i residui sotto forma di masserelle ricche di materiale mucose secreto dal tubo digerente e cariche di batteri che ne continuano la mineralizzazione.

I predatori-carnivori accumulano invece meno farmaci, come emerge dai primi due grafici (A) e (B). Tra essi vi sono taxa con Habit diverso per cui non emerge alcuna correlazione tra C-PRE e tipo di Habit. Filtratori che vivono adesi al substrato (PFIL) e detritivori-erbivori grazers (GRA-DET), che sono anche swimmers, sembra accumulino una quantità di farmaci inferiore o uguale ai predatori.

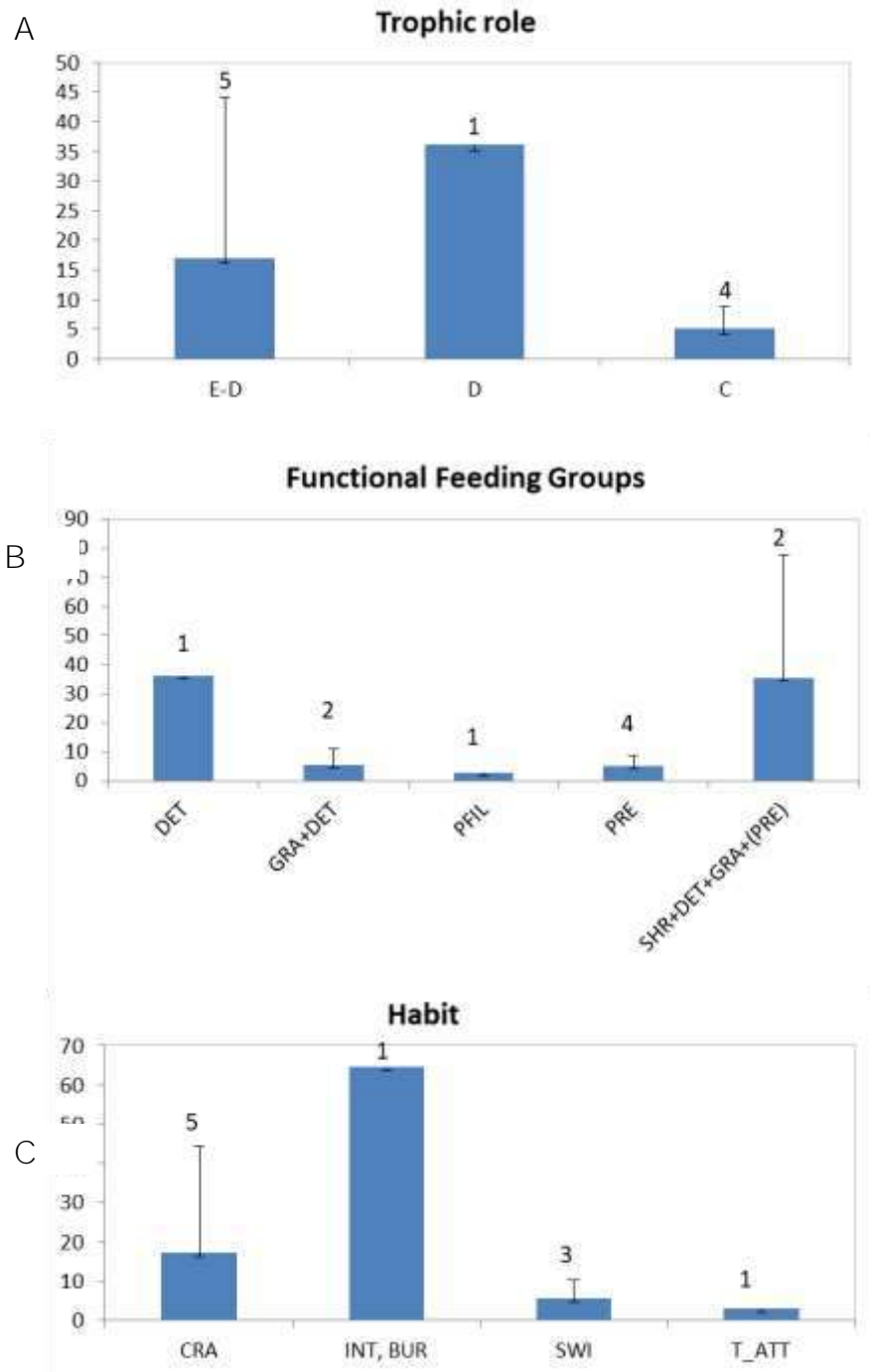


Figura 91 - Accumulo medio (\pm errore standard) nei taxa di macroinvertebrati studiati raggruppati in base al ruolo trofico (Trophic role) (A), al gruppo trofico funzionale (FFG, Functional Feeding Group) (B) e al tipo di movimento rispetto al substrato (Habit) (C) di appartenenza. E= erbivori; D= detritivore; C= carnivore; SHR= shredders (tagliuzzatori); GRA= grazers, scrapers (raschiatori); PFIL= filtratori-raccoglitori (passivi); DET=detritivore; PRE=predatori; SWI= Swimmer (nuotatore); CRA= Crawler (camminatore); BUR= Burrower (che si infila nel limo); INT= Interstitial (interstiziale); T_ATT= Temporarily attached (che vive temporaneamente attaccato al substrato).

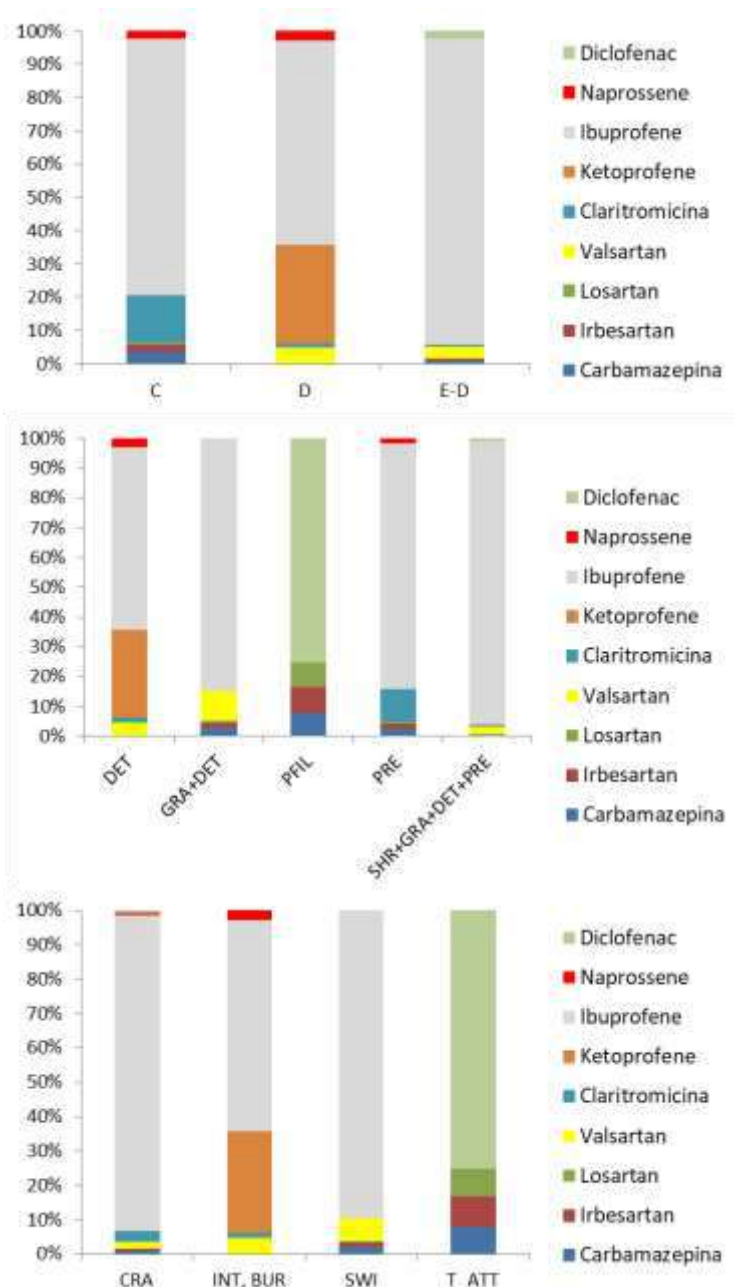


Figura 92 - Accumulo dei 10 farmaci nei taxa di macroinvertebrati studiati raggruppati in base al ruolo trofico (Trophic role) (A), al gruppo trofico funzionale (FFG, Functional Feeding Group) (B) e al tipo di movimento rispetto al substrato (Habit) (C) di appartenenza. E= erbivori; D= detritivore; C= carnivore; SHR= shredders (tagliuzzatori); GRA= grazers, scrapers (raschiatori); PFIL= filtratori-raccoglitori (passivi); DET=detritivore; PRE=predatori; SWI= Swimmer (nuotatore); CRA= Crawler (camminatore); BUR= Burrower (che si infila nel limo); INT= Interstitial (interstiziale); T_ATT= Temporarily attached (che vive temporaneamente attaccato al substrato). Grafici ottenuti considerando la somma delle concentrazioni rinvenute per farmaco considerando solo i valori >LOQ)

Alcuni farmaci sembrano essere accumulati preferenzialmente da alcuni gruppi funzionali. Per esempio il diclofenac è stato rinvenuto soprattutto nei filtratori che aderiscono al substrato (rappresentati dai Simuliidae), così come il losartan e ibesartan (anche se in quantità totali minori) (Figura 92). Il ketoprofene invece è accumulato solo

dai detritivori-burrowers (*Oligochaeta*) mentre la Claritromicina più dai carnivori-predatori.

L'ibuprofene è il farmaco più concentrato in acqua, e più bioaccumulato, ma 2 taxa non lo accumulano (*B. alpinus* e *Simuliidae*). I due taxa hanno una dieta simile (E-D), come metà dei taxa studiati, ma hanno modalità di assunzione del cibo diverse (grazer vs filtratori) e habit diverso (swimmers vs temporary attached). Il non ritrovamento di ibuprofene in questi due taxa potrebbe dipendere da questi loro traits.

Questi dati suggeriscono che l'uptake dei farmaci avvenga direttamente dall'acqua del torrente e dal sedimento. Questo è supportato sia dalla relazione trovata tra concentrazione media del farmaco negli animali e sua concentrazione nel fiume che dalla maggior concentrazione di farmaci nei detritivori.

Nei predatori invece non è stata rinvenuta una maggior concentrazione di farmaci, come era atteso per effetto della biomagnificazione se l'uptake avvenisse con la dieta (Ruhí et al., 2016). Tra le specie studiate, sono preda di *Perloides* e *Rhyachophila* gli stessi chironomidi ed efemerotteri. Non sono comunque al top della catena trofica, essendoci pesci nel torrente. Altri autori (es. Lagesson et al., 2016) hanno dimostrato che ad influenzare il bioaccumulo dei farmaci sono sia le caratteristiche intrinseche dei farmaci (es. log Kow, pKa ecc.) che traits delle diverse specie, inclusa la frazione lipidica nell'organismo, efficienza di assorbimento gastrico, ecc.; Infantino et al., 2013). Nella pozza studiata da Lagesson et al. (2016) in Svezia, le più alte concentrazioni sono state misurate negli invertebrati bentonici che vivono a contatto con il sedimento ovvero molluschi (*Planorbidae*) e crostacei asellidi (*Asellus aquaticus*), entrambi grazers-detritivores, indicando che gli organismi che si trovano alla base della catena trofica sono i primi ricettori di farmaci. La presenza di farmaci in organismi bentonici fluviali è ancora poco studiata e conosciuta così come i processi di accumulo e dispersione dei farmaci nelle catene trofiche acquatiche (Morselli et al., 2014).

Questi risultati forniscono promettenti dati preliminari che dovranno tuttavia essere approfonditi in studi successivi.

Obiettivo 3.7.B: Analisi di elementi in traccia in acqua e in *Diamesa* spp. (analisi a cura del dott. Paolo Gabrielli, Ohio University, USA)

L'obiettivo delle analisi condotte dal dott. Paolo Gabrielli presso l'Università dell'Ohio (The Ohio State University, Columbus OH, School of Earth Sciences, and Byrd Polar and Climate Research Center) era quello di determinare la concentrazione di elementi in traccia (Al, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Ge, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Nb, Ni, Pb, Rb, Sb, Sn, Sr, Ta, Ti, Tl, U, V e Zn) (Beaudon et al., 2017) in campioni d'acqua prelevati dai ricercatori del MUSE nelle stazioni PR0 (nel 2016 e 2017) e PR1 (nel 2017) ed in campioni di larve di chironomidi prelevate nelle stazioni PR0 (*Diamesa zernyi* gr.) e PR1 (*Diamesa cinerella* gr.) nel 2017. La stazione PR1 si trova a 380 m dalla fronte del Ghiacciaio Presena, a 2665 m di quota (N 46°13.716'; E 010°35.098'), a valle di un laghetto artificiale sulla cui soglia è stato installato un misuratore fisso di livello (da cui si ricava la portata) e un datalogger per la misurazione in continuo della temperatura dell'acqua. La sezione è gestita da Meteotrentino (PAT).

Metodo

La raccolta dei campioni è stata eseguita nel mese di Agosto 2017. Per i chironomidi sono state prelevate, in ciascun sito, tre repliche (min 5 chironomidi/replica; larve mature al 3°-4° stadio) prese dallo stesso microhabitat con retino immanicato. Una replica di larve è stata aggiunta (=i chironomidi rimanenti dalla stessa retinata) per la messa a punto del metodo. Tre campioni d'acqua del torrente sono stati raccolti nello stesso sito e data (1 falcon 50ml/campione) per l'analisi dei metalli pesanti. Un ulteriore campione d'acqua è stato raccolto in ciascun sito e data (1 bottiglia 1L/campione) per analisi chimiche (eseguite dall'APPA). Sono stati raccolti anche campioni di alghe (*Hydrurus foetidus* – non ancora analizzati) in PR0 per analisi supplementari (frammenti di *Hydrurus* potrebbero rimanere tra gli unghioni delle larve). L'alga non c'era in PR1 (stazione a valle del laghetto artificiale).

Raccolta dei campioni

I Chironomidi sono stati raccolti con retino immanicato, dove possibile con pinzette precedentemente sciacquate nel torrente. Dopo averli "puliti" da frammenti di alghe, sono stati trasferiti in barattoli da 100 mL di pvc precedentemente sciacquati con acqua del torrente. I campioni sono stati mantenuti a bassa temperatura in borsa termica. Le provette/contenitori per l'acqua sono state lavate con acqua del torrente e conservate nella borsa termica durante il trasporto (in frigo a 4°C in laboratorio fino all'invio per le analisi). In laboratorio, sono stati preparati campioni con 5 larve ciascuno di larve in carta stagnola seccati in stufa a 60 °C per 24 ore e conservati a secco fino alla spedizione.

Analisi di elementi in traccia

Le concentrazioni degli elementi in traccia sono state determinate mediante Inductively Coupled Plasma Sector Field Mass Spectrometry (ICP-SFMS) presso il Byrd Polar and Climate Research Center e la School of Earth Sciences dell'Ohio State University. I campioni d'acqua e quelli di larva sono stati processati in maniera diversa.

- Analisi delle acque: un'aliquota di 10 mL è stata acidificata al 2% con HNO₃ ultrapuro (Optima) e lasciata a temperatura ambiente per un mese prima di essere analizzata (Uglietti et al., 2014). Le concentrazioni sono espresse in ppt riferiti alla massa d'acqua.
- Analisi delle larve: le larve sono state essiccate a 60 °C per 24 ore e poi digerite in soluzione acida di HNO₃ e HF prima di essere analizzate (Young and Harvey, 1991). Le concentrazioni di elementi sono espresse in ppm riferiti alla massa secca delle larve.

L'interpretazione dei dati dei vari elementi in traccia (TE) è stata eseguita mediante il fattore di arricchimento crostale calcolato come $E_{Fc} = (TE/Al)_{campione} / (TE/Al)_{crostale}$ dove i rapporti (TE/Al)_{crostale} sono stati ottenuti da Wedepohl (Wedepohl, 1995). Un E_{Fc} simile ad 1 indica una provenienza crostale dell'elemento, ovvero dal background geologico (particelle di polvere minerale) mentre un E_{Fc} maggiore o uguale a 10 indica con ogni probabilità un arricchimento di questo elemento mediante un processo differente (ad esempio inquinamento delle acque oppure bioaccumulo nelle larve). In questo contesto abbiamo assunto che l'Al (elemento di riferimento crostale) fosse interamente di origine crostale sia nelle acque che nelle larve.

Risultati e Discussione

Acque superficiali

Le concentrazioni degli elementi in traccia sono molto basse e vanno da un livello del ppt per Ag e Ta al ppm per Al, Fe, Mg, Na e Mg, in linea con le normali distribuzioni di questi elementi in ambiente. Le concentrazioni di quasi tutti gli elementi sono controllate dal sedimento di origine crostale sospeso nelle acque. Sono stati osservati solo dei moderati arricchimenti per As, Cd e Mo ed uno più marcato per Sb nel campione prelevato in PR0 nel 2016. Il moderato arricchimento di U potrebbe invece essere ascrivibile alla sua solubilità in acqua (Figura 93).

Larve di chironomidi

Gli elementi in tracce nelle larve vanno da un livello di ppb per Sb e Bi fino a parti per migliaia per Al, Fe, Na e Mg. Arricchimenti marcati sono osservabili in PR0 e PR1 per Ag, Cu e Zn e per Cd e Mo solo in PR1 (Figura 94). Un arricchimento moderato è osservabile per l'As in PR0 e PR1. I livelli degli altri elementi sono in linea con una composizione crostale originata dalla presenza di particolato di origine minerale nelle larve.

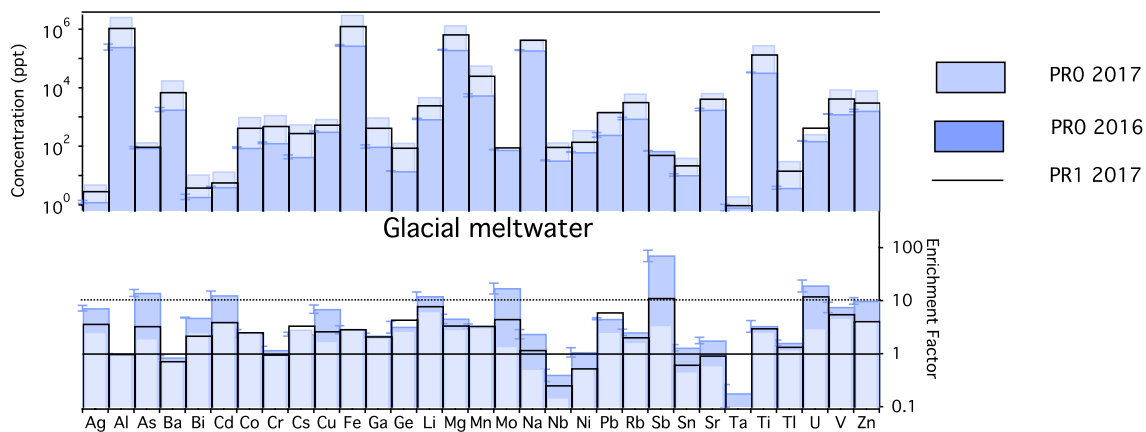


Figura 93 - Concentrazioni (in alto) e fattore di arricchimento crostale (in basso) degli elementi in tracce nelle acque campionate nelle stazioni di Presena nel 2016 e 2017. Fattori di arricchimento superiori a 10 (al di sopra della linea tratteggiata) indicano che con ogni probabilità esiste un contributo aggiuntivo di tale elemento rispetto alla concentrazione che ci si potrebbe aspettare dalla sola presenza di particolato crostale nelle acque (valori intorno ad 1, linea continua).

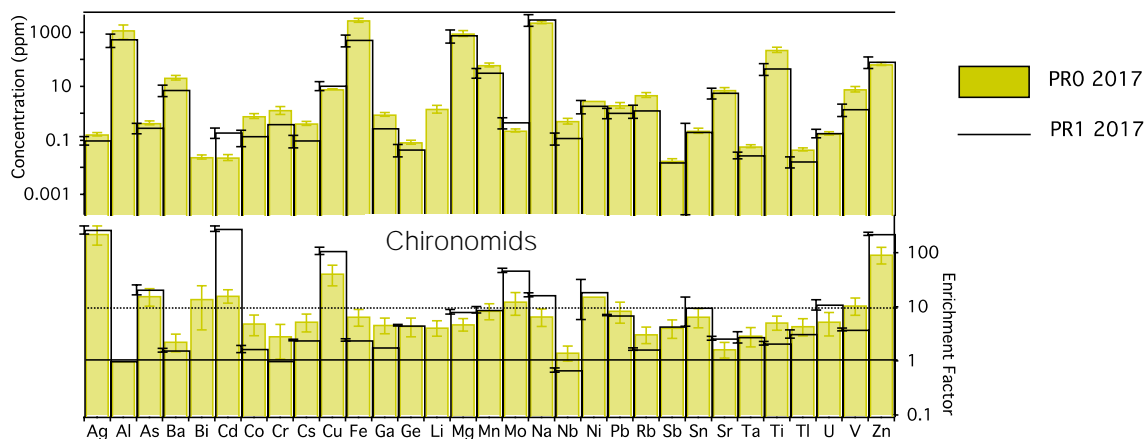


Figura 94 - Concentrazioni (in alto) e fattore di arricchimento crostale (in basso) degli elementi in tracce nelle larve di chironomidi (*Diamesa* spp.) campionati nelle stazioni di Presena nel 2017. Fattori di arricchimento superiori a 10 (al di sopra della linea tratteggiata) indicano che con ogni probabilità esiste un contributo aggiuntivo di tale elemento rispetto alla concentrazione che ci si potrebbe aspettare dalla sola presenza di particolato crostale nelle larve (valori intorno ad 1, linea continua).

Nelle acque superficiali non c'è evidenza di marcati contributi di origine antropogenica, eccetto forse per Sb in PR0 nel 2016. Sb è l'antimonio, un semimetallo che viene usato come agente antinfiamma e per produrre vernici, smalti, ceramiche e gomme, nonché un'ampia gamma di leghe metalliche. Il suo rinvenimento può essere riconducibile a rottami metallici, armi e munizioni ma non si possono identificare separatamente da altre possibili cause come ad esempio lo sversamento accidentale moderno di anche modeste quantità di combustibili nel caso di Presena.

In generale la concentrazione degli elementi in tracce nelle acque riflette quindi la composizione crostale tipica del sedimento sospeso. Nelle larve sono invece riscontrabili degli arricchimenti, forse riconducibili ad un inquinamento di natura antropica, ed in particolare per Ag (in entrambi i siti), Cd, Cu e Zn (più in PR1, a valle del laghetto artificiale). Un confronto con altre stazioni di misura più remote del gruppo dell'Adamello potrebbe dare indicazioni ulteriori sull'origine di questi elementi.

3.15.8 Obiettivo 3.8 Analisi dei dati e integrazione con i risultati degli altri WP (ottobre 2015-aprile 2018)

Il protocollo, inclusa la scelta dei CE con cui trattare gli animali, è stato definito successivamente alle analisi chimiche condotte nel WP1 e sulla base di dati messi a disposizione dall'Università di Trento. Nel corso del progetto è stato mantenuto lo scambio di informazioni con le altre realtà partner, incluso l'ente del sistema economico trentino (APSS), così come è iniziata l'attività di divulgazione e comunicazione dei risultati ottenuti (WP6). Sono state organizzate riunioni presso il MUSE con tutti o singoli partner ed effettuate numerose skype call per scambio di informazione, condivisione di nuove idee e problematiche. Gli esperimenti relativi all'Obiettivo 3.6 e 3.7 (partim) sono stati eseguiti insieme da ricercatori dei partner MUSE e UNIMIB, in collaborazione con l'Istituto Mario Negri di Milano e l'Università dell'Ohio. Il convegno organizzato alla fine del I anno di progetto (18 maggio 2017) è stato un momento informativo e formativo per il partenariato "allargato" e le pubbliche amministrazioni in cui i dati del WP3 sono stati integrati con quelli degli altri WP.

3.16 WP4 – Incidenza di chitridiomicosi in popolazioni di anfibii in prossimità di depuratori (MUSE; Michele Menegon)

Personale coinvolto: Coordinatore di WP4, dott. Michele Menegon (0,5 mese/uomo), MUSE; personale MUSE, dott.ssa Francesca Rossi (0,5 mesi/uomo); personale collaboratore MUSE, dott.ssa Ana Rodriguez (2 mesi/uomo).

Il titolo originale del WP4 era “Effetti genotossici e chitridiomicosi in popolazioni di anfibii”. Non avendo ottenuto i permessi per l’esecuzione di esperimenti su anfibii, i test di genotossicità sono stati sospesi nel corso del primo anno. Nel secondo anno di progetto il responsabile di WP, Michele Menegon, ha interrotto la sua attività lavorativa presso il MUSE, pertanto gli obiettivi si sono ridotti alla sola analisi dell’incidenza di chitridiomicosi in siti diversamente contaminati da CE, nel bacino del Noce.

3.16.1 Obiettivo 4.1 Studio delle popolazioni di anfibii nei siti di indagine (aprile-agosto 2016)

Nella fase iniziale del progetto sono state studiate la struttura e le caratteristiche funzionali delle popolazioni di anfibii in prossimità di depuratori e aree limitrofe lungo l’asta del Torrente Noce, utilizzando anche dati di letteratura su presenza/assenza e distribuzione nell’area di studio. Sulla base di queste considerazioni e dello stato di conservazione di specie e habitat, sono selezionate specie target di cui valutare l’incidenza di comparsa di patologie (chitridiomicosi) (Obiettivo 4.2).

Le ricerche si sono svolte a ridosso dei torrenti nell’ambiente acquatico e nell’ambiente terrestre adiacente. Gli ambienti acquatici indagati sono stati: il greto dei torrenti, le diramazioni e le pozze laterali formatesi durante le piene, i piccoli ruscelli affluenti, le zone di acqua lenticola, le pozze temporanee, gli stagni, le paludi, i laghetti adiacenti ai torrenti e i laghi alpini formati dai torrenti stessi. Gli ambienti terrestri indagati sono stati: la vegetazione ripariale igrofila, i boschi di latifoglie, misti o di aghifoglie, ambienti di sottobosco, superfici con megaforbie nitrofile, le torbiere, gli sfagneti, i prati naturali o da sfalcio, i pascoli, i coltivi, alcuni ambienti xerici a ridosso dei torrenti. In alcuni siti sono state osservate popolazioni consistenti di una o più specie, mentre in altri non sono stati trovati anfibii.

3.16.2 Obiettivo 4.2 Analisi dell’incidenza di chitridiomicosi (aprile-agosto 2016; aprile-ottobre 2017)

Materiali e Metodi

Prelievo di cellule epiteliali tramite swabbing

Per verificare la presenza di chitridiomicosi nelle popolazioni naturali di anfibii del Bacino idrografico del Torrente Noce, sono stati fatti un totale di 76 prelievi non invasivi di campioni di cellule epiteliali (57 prelievi tra marzo e settembre, 2016 e 19 prelievi tra luglio e agosto, 2017) (Tabella 80). I prelievi hanno riguardato esemplari adulti e subadulti, tralasciando le larve e i neometamorfosati perché sono troppo delicati. Quasi tutti gli esemplari adulti e subadulti, di tutte le specie di anfibii trovati, sono stati quindi

catturati con retini o con le mani e sottoposti al trattamento. Per catturare e maneggiare gli anfibi sono stati indossati dei guanti in nitrile privi di lattice, per evitare di entrare direttamente a contatto con la pelle degli anfibi. Il prelievo di cellule epiteliali è stato attuato tramite swab test in conformità con il protocollo già messo a punto per il gruppo di ricerca Briggs NIH sulla base di Boyle et al. (2004).

Procedura

Una volta catturato l'esemplare si passa il tampone (swab) sulla parte inferiore e il ventre 30 volte. In questo modo si raschiano piccole quantità di tessuto dalla pelle. È necessario applicare un po' di pressione, ma senza danneggiare l'animale. Le aree da tamponare sono inoltre il bacino, le cosce e il tessuto tra le dita dei piedi.

Dopo il prelievo delle cellule epiteliali si procede ad asciugare il tampone per circa 5 minuti, evitando la luce solare diretta, se possibile (se il clima è troppo umido per asciugare inserire il tampone in una soluzione al 95% di EtOH).

Infine si riposiziona il tampone nel flacone, avendo cura di non urtare contro le pareti per non perdere il materiale raccolto. Etichettatura: i tamponi devono essere etichettati con un ID numerico che identifica uno e un solo flacone. Raccogliere ulteriori informazioni, quali: nome del sito, località, osservatore, data, specie, habitat, stadio di vita (larva/girino, subadulto, adulto), sesso, condizioni dell'animale, ecc. I campioni possono essere conservati in un congelatore per molti mesi senza problemi (Chytrid Swabbing Protocol, 2009).

Analisi dei campioni

L'analisi dei campioni, al fine di documentare la possibile presenza di *Batrachochytrium dendrobatidis* nelle diverse specie si è svolta nell'autunno del 2017. Di seguito si descrive il protocollo di analisi dei campioni prelevati.

1) Estrazione del DNA fungino:

Prima dell'estrazione è stato eliminato l'etanolo nel quale i campioni erano stati preservati per evitare che questo potesse interferire nei successivi step di analisi. Per l'estrazione del DNA si è utilizzato il protocollo PrepMan®Ultra seguendo le istruzioni del produttore: 100 µL di soluzione iniziale, incubazione a 100°C per 10 minuti, raffreddamento dei campioni a temperatura ambiente per 3 minuti, centrifugazione dei campioni a 15.000 r.p.m per 3 minuti.

2) Amplificazione del DNA fungino:

La copia di primers utilizzata per l'amplificazione del DNA di *Batrachochytrium dendrobatidis* è quella descritta da Annis et al. (2004) disegnata specificamente per la individuazione di questa specie di fungo. (Bd1a: 5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3' e Bd2a: 5'-CATGGT-TCATATCTGTCCAG-3'). Il ciclo di amplificazione prevede una iniziale denaturazione a 93° C per 10 minuti, seguita da 30 cicli che prevedono 45 secondi a 93° C, 45 secondi a 60° C (temperatura di annealing per questi primers), e 1 minuto a 72° C. Il ciclo si completa con una estensione finale a 72° C per 10 minuti. Come campione positivo si è utilizzato un campione di tessuto di una rana del genere *Ptychocheilus* proveniente della Repubblica Democratica del Congo e che appartiene alla

collezione del MUSE di Trento (MTSN-9733) nel quale era già stato determinato la presenza di questo fungo.

3) Visualizzazione dei risultati:

I prodotti della PCR (polimerase chain reaction, amplificazione del DNA) sono stati visualizzati in un gel di agarosio al 1,5%. Per nessuno dei campioni oggetto di questo lavoro si è rilevato una amplificazione positiva per *Batrachochytrium dendrobatidis* seguendo il metodo previamente descritto (Tabella 80).

Risultati

I prodotti della PCR (polimerase chain reaction, amplificazione del DNA) sono stati visualizzati in un gel di agarosio al 1,5%.

Per nessuno dei campioni analizzati si è osservata un'amplificazione positiva per *B. dendrobatidis* (Tabella 80), confermando l'assenza dell'infezione nelle popolazioni di anfibi che vivono lungo l'asta del Noce, anche in siti "sensibili", dove la contaminazione da CE è stata dimostrata (WP1; Mandaric et al., 2017).

Tabella 80 - Specie e località di campionamento per la chitridiomicosi.

ID	Località	Specie	Data	<i>B. dendrobatidis</i>
M1	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	26/7/2017	-
M2	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	27/7/2017	-
M3	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	1/8/2017	-
M4	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	1/8/2017	-
M5	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	1/8/2017	-
M6	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	1/8/2017	-
M7	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	1/8/2017	-
M8	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	1/8/2017	-
M9	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	1/8/2017	-
M10	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	4/8/2017	-
M11	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	4/8/2017	-
M12	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	4/8/2017	-
M13	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	4/8/2017	-
M14	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	4/8/2017	-
M15	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	4/8/2017	-
M16	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	4/8/2017	-
M17	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	4/8/2017	-
M18	Fosina	<i>Pelophylax sp.</i>	8/8/2017	-

ID	Località	Specie	Data	<i>B. dendrobatidis</i>
M19	Fosina	<i>Pelophylax</i> sp.	8/8/2017	-
1	Rocchetta	<i>Rana temporaria</i>	12/3/2016	-
2	Rocchetta	<i>Rana temporaria</i>	12/3/2016	-
3	Rupe	<i>Rana dalmatina</i>	24/3/2016	-
4	Rupe	<i>Rana dalmatina</i>	26/3/2016	-
5	Rupe	<i>Rana dalmatina</i>	26/3/2016	-
6	Rupe	<i>Rana dalmatina</i>	26/3/2016	-
7	Rupe	<i>Rana dalmatina</i>	28/3/2016	-
8	Rupe	<i>Rana dalmatina</i>	28/3/2016	-
9	Rupe	<i>Rana dalmatina</i>	28/3/2016	-
10	Rupe	<i>Rana dalmatina</i>	28/3/2016	-
11	Rupe	<i>Rana dalmatina</i>	28/3/2016	-
12	Rupe	<i>Rana dalmatina</i>	28/3/2016	-
13	Rupe	<i>Rana dalmatina</i>	28/3/2016	-
14	Rupe	<i>Rana dalmatina</i>	28/3/2016	-
15	Rupe	<i>Rana dalmatina</i>	28/3/2016	-
16	Rupe	<i>Rana dalmatina</i>	28/3/2016	-
17	Rupe	<i>Pelophylax</i> sp.	28/3/2016	-
18	Mezzocorona	<i>Pelophylax</i> sp.	1/4/2016	-
19	Mezzocorona	<i>Pelophylax</i> sp.	1/4/2016	-
20	Mezzocorona	<i>Pelophylax</i> sp.	1/4/2016	-
21	Mezzocorona	<i>Pelophylax</i> sp.	15/4/2016	-
22	Mezzocorona	<i>Pelophylax</i> sp.	15/4/2016	-
23	Mezzocorona	<i>Pelophylax</i> sp.	15/4/2016	-
24	Mezzocorona	<i>Pelophylax</i> sp.	15/4/2016	-
25	Mezzocorona	<i>Pelophylax</i> sp.	1/5/2016	-
26	Mezzocorona	<i>Pelophylax</i> sp.	1/5/2016	-
27	Mezzocorona	<i>Pelophylax</i> sp.	1/5/2016	-
28	Mezzocorona	<i>Pelophylax</i> sp.	1/5/2016	-
29	Mezzocorona	<i>Pelophylax</i> sp.	1/5/2016	-
30	Mezzocorona	<i>Pelophylax</i> sp.	1/5/2016	-

ID	Località	Specie	Data	<i>B. dendrobatidis</i>
31	Valle dello Sporeggio	<i>Rana dalmatina</i>	19/7/2016	-
32	Valle dello Sporeggio	<i>Bufo bufo</i>	19/7/2016	-
33	Valle dello Sporeggio	<i>Bufo bufo</i>	19/7/2016	-
34	Valle dello Sporeggio	<i>Bufo bufo</i>	19/7/2016	-
35	Valle dello Sporeggio	<i>Rana dalmatina</i>	19/7/2016	-
36	Valle dello Sporeggio	<i>Bufo bufo</i>	19/7/2016	-
37	Valle dello Sporeggio	<i>Bufo bufo</i>	19/7/2016	-
38	Malè	<i>Rana temporaria</i>	22/7/2016	-
39	Passo del Tonale	<i>Rana temporaria</i>	3/8/2016	-
40	Comasine	<i>Rana temporaria</i>	9/8/2016	-
41	Comasine	<i>Rana temporaria</i>	9/8/2016	-
42	Lago di Pian Palù	<i>Rana temporaria</i>	14/8/2016	-
43	Lago di Pian Palù	<i>Rana temporaria</i>	14/8/2016	-
44	Lago di Pian Palù	<i>Rana temporaria</i>	14/8/2016	-
45	Folgarida	<i>Rana temporaria</i>	16/8/2016	-
46	Torrente Barnes	<i>Rana temporaria</i>	23/8/2016	-
47	Torrente Barnes	<i>Rana temporaria</i>	23/8/2016	-
48	Lago di Tovel	<i>Rana temporaria</i>	26/8/2016	-
49	Lago di Tovel	<i>Rana temporaria</i>	26/8/2016	-
50	Lago di Tovel	<i>Rana temporaria</i>	26/8/2016	-
51	Torrente Rabbies	<i>Rana temporaria</i>	28/8/2016	-
52	Torrente Rabbies	<i>Rana temporaria</i>	28/8/2016	-
53	Torrente Rabbies	<i>Rana temporaria</i>	28/8/2016	-
54	Torrente Rabbies	<i>Rana temporaria</i>	28/8/2016	-
55	Torrente Rabbies	<i>Rana temporaria</i>	28/8/2016	-
56	Rocchetta	<i>Pelophylax sp.</i>	7/9/2016	-
57	Torrente Noce	<i>Rana temporaria</i>	9/9/2016	-

Discussione: implicazioni per la conservazione

Da alcuni anni una delle principali minacce per anuri e urodeli è la chitridiomicosi, una patologia causata dal fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*. La prima segnalazione di chitridiomicosi per l'Italia risale al 2002, in rospi degli Appennini (Stagni et al., 2002),

successivamente la patologia è stata riscontrata in diverse specie di rane in diverse regioni italiane (Garner et al., 2004; Stagni et al., 2004; Bovero et al., 2008; Ficetola et al., 2011, Tessa et al. 2013). Il fungo decompone la cheratina della pelle e sembra essere in grado di infettare tutte le specie note di anfibii (Van Rooij et al., 2015), anche se la suscettibilità delle diverse specie risulta differente: mentre alcune muoiono rapidamente in seguito all'infezione, altre, come la rana verde maggiore (*Pelophylax ridibundus*), la rana toro (*Lithobates catesbeianus*) e lo xenopo liscio (*Xenopus laevis*), riescono a sopravvivere favorendo la diffusione della malattia attraverso la contaminazione dell'acqua.

In questo lavoro sono stati analizzati campioni biologici di quattro taxa di anfibii: *Pelophylax* sp., *Rana dalmatina*, *Rana temporaria* e *Bufo bufo*. Per nessun individuo di questi taxa è stata rilevata la presenza del fungo. I risultati ottenuti sono molto importanti in relazione alla conservazione di queste specie nel territorio Trentino. Nessuna delle specie studiate presenta uno stato di conservazione critico a livello locale (www.iucn.it) e i risultati di questo lavoro ci suggeriscono che le popolazioni trentine sono "fuori pericolo". Tuttavia, un'eventuale propagazione dell'infezione, non improbabile considerato che uno dei taxa presenti in Trentino (*Pelophylax* sp.) è classificato come portatore di questa malattia, in concomitanza con un aumento di inquinanti presenti negli habitat occupati dagli anfibii (corsi d'acqua e zone umide anche vicino a depuratori, zone agricole e centri abitati), potrebbe portare a un declino rapido e irreparabile delle diverse specie a livello locale. È stato dimostrato per diverse specie di anfibii che la presenza di inquinanti (tra cui i pesticidi) provocano immunodepressione che li rende più vulnerabili ai parassiti e patogeni (Marcogliese et al., 2009).

3.17 WP5 – Danno genotossico in linee cellulari umane provocati da contaminanti emergenti (CNR-IBF)

Personale coinvolto: Coordinatore di WP5, Dott.ssa Gabriella Viero (1 mese/uomo),
Post Doc.: Efrem Bertini (8 mesi/uomo)

L'attività svolta nell'ambito del WP5, eseguita dal 16 ottobre 2016 al 15 giugno 2017, si è articolata allo scopo di raggiungere i seguenti tre obiettivi previsti in fase di presentazione del progetto:

1. Obiettivo 5.1 High Content Screening per la determinazione della maggior tossicità di CE e/o miscele di CE in cellule umane mediante labelling metabolico e saggi genotossici
2. Obiettivo 5.2 Identificazione di alterazioni dell'espressione genica in cellule umane dopo trattamento con CE mediante Next Generation Sequencing (NGS)
3. Obiettivo 5.3 Validazione degli effetti provocati da CE in cellule umane dopo trattamento con CE

Punto fondamentale per la realizzazione di questo WP, è stata la scelta dei Contaminanti Emergenti (CE) da utilizzare per analizzare il loro possibile effetto su modelli cellulari in vitro. Tale scelta è stata guidata dai risultati ottenuti nel WP1 e nel WP3.

In Tabella 81 sono riportati i CE utilizzati nello studio intrapreso nel corso del WP3 suddivisi secondo la categoria di azione e il livello di rischio appurato nel W1. Al fine di testare i CE su linee cellulari umane si è dovuto restringere il numero di CE in modo tale da garantire la gestibilità sperimentale delle attività previste nel WP 5. Per effettuare una scelta razionale è stata considerata la classificazione sulla base del livello di rischio e scelto un rappresentante del livello alto di rischio (triclocarban) due a livello medio-medio basso (ibuprofene e tonalide) e uno di livello basso (furosemide) come da Tabella 81.

I quattro CE presi in considerazione (ibuprofene, furosemide, triclocarban e tonalide) sono stati forniti dal MUSE. Le unità di misura tipicamente utilizzate per i nostri saggi sono espressi in molarità, ma sono nello stesso range utilizzato nel WP3 per altri saggi (Tabella 82).

Tabella 81 - I CE selezionati negli esperimenti del WP3. In grassetto i CE utilizzati nel presente studio sono i seguenti: ibuprofene (IBU), furosemide (FUR), tonalide (TON) e triclocarban (TCC). * in accordo con i risultati del WP1.

Contaminante Emergente	Acronimo	Azione	Livello di rischio*
Ibuprofene	IBU	Anti-infiammatorio	Medio/basso
Furosemide	FUR	Diuretico	Basso
Trimethoprim	TRI	Antibiotico	Medio/Basso
Triclocarban	TCC	Antibatterico	Alto
Captan	CAP	Funghicida	-
Chlorpyrifos	CHL	Insetticida	-
Boscalid	BOS	Pesticida	-
Metolachlor	MET	Pesticida	-
Tonalide	TON	Fragranza	Basso
Sucralose	SUCRA	Dolcificante	Basso

Tabella 82 – Concentrazioni di CE a cui sono state esposte le linee cellulari umane.

[CE] /μM	[Ibuprofene] /μg/ml	[Furosemide] /μg/ml	[Tonalide] /μg/ml	[CE] /nM	[Triclocarban]/ ng/ml
1	0.21	0.33	0.26	1	0.32
10	2.06	3.31	2.58	10	3.16
25	5.16	8.27	6.46	25	7.90
50	10.31	16.54	12.92	50	15.79
100	20.63	33.08	25.84	100	31.58
250	51.57	82.69	64.60	250	78.95
500	103.15	165.38	129.21	500	157.89
1000	206.29	330.75	258.41	1000	315.78

Dal momento che lo scopo generale del WP5 è quello di utilizzare modelli in vitro (linee cellulari umane) per saggiare i possibili effetti negativi dei CE, ci si è serviti di linee cellulari umane immortalizzate (Hek-293) e tumorali (MCF7 e in parte HeLa). La linea cellulare Hek-293 (*Human Embryonic Kidney*) è comunemente utilizzata per saggi cellulari e biochimici data la facilità di mantenimento e di trasfezione di tale linea. Le Hek-293 hanno sostituito in alcuni esperimenti le cellule di carcinoma della cervice uterina, HeLa, che erano presentate in sede di proposta di progetto, dal momento che non sono di origine tumorale e inoltre sono ritenute essere più stabili da un punto di vista cariotipico. In aggiunta, sono state estensivamente impiegate le cellule MCF7, linea cellulare tumorale derivante da epitelio di tumore mammario. Anche in questo caso la scelta è stata dettata dal largo impiego che questa linea trova in saggi di screening e per la loro sensibilità a composti ormonali steroidei.

3.17.1 Obiettivo 5.1 High Content Screening per la determinazione della maggior tossicità di CE e/o miscele di CE in cellule umane mediante labelling metabolico e saggi genotossici

Per quanto riguarda l'Obiettivo 5.1, sono stati valutati i possibili danni esercitati dai CE sulla normale fisiologia cellulare. Sono stati presi in considerazione i possibili effetti

citotossici e le alterazioni del ciclo cellulare correlati a danni genotossici e le possibili variazioni globali nella sintesi di RNA e proteine. Le analisi, nel dettaglio, si sono articolate come segue: i) analisi globale dei livelli di vitalità cellulare e del ciclo cellulare ii) possibile presenza di marker apoptotici; iii) analisi sull'effetto a livello trascrizionale globale (labeling metabolico mediante incorporazione di BrU (Bromouridine, Akbalik et al., 2017); iv) analisi dei difetti nella sintesi globale di proteine (labeling metabolico con homoazidoalanina, Viero et al., 2015). In tre casi su quattro (punti i), iii), iv)), è stato utilizzato un approccio di acquisizione dati e analisi che si avvale di un sistema di imaging cellulare automatizzato Operetta - Perkin Elmer (Massey, 2015), disponibile presso la HTS-facility dell'Università Trento.

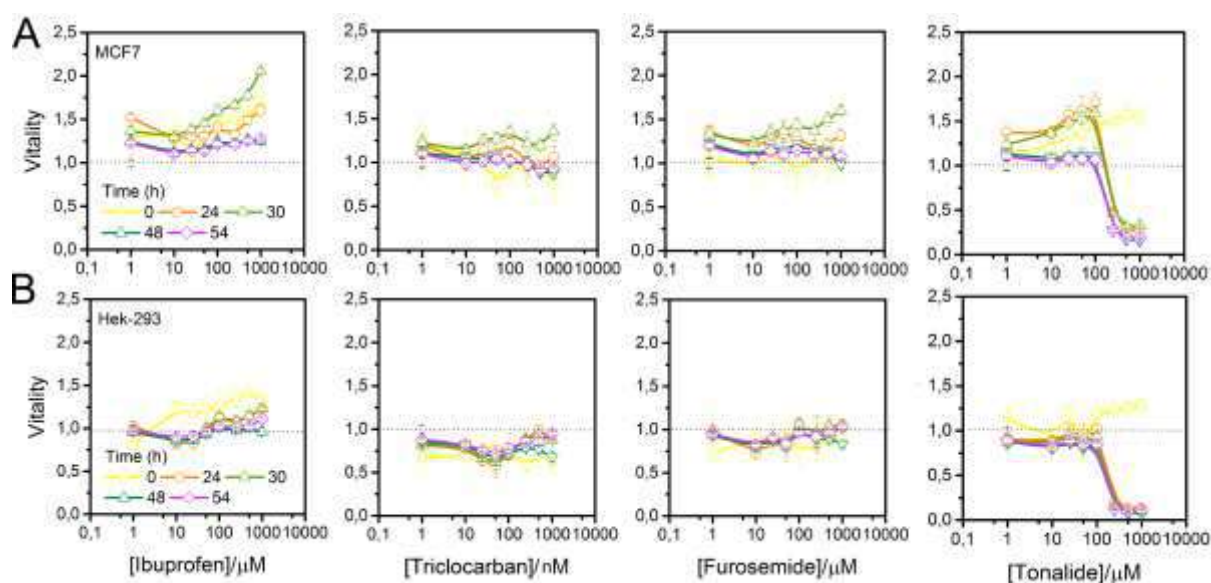


Figura 95 - Saggio di vitalità cellulare. Il potere riducente delle cellule è quantificato nel tempo e rispetto a una diluizione seriale dei CE in esame. Si può apprezzare un modesto effetto positivo di IBU a tempi brevi e dosi elevate, mentre TON ha un effetto letale a dosi maggiori di 100 μ M in tempi brevi.

Per quanto riguarda il primo punto (effetti citotossici e sul ciclo cellulare dei composti in esame) è stato utilizzato il saggio Alamar Blue e un saggio di analisi delle fasi del ciclo (vedasi paragrafo successivo). Il saggio di vitalità/citossicità Alamar Blue permette di quantificare la proliferazione cellulare monitorando il livello metabolico cellulare grazie all'incorporazione di un indicatore di ossido-riduzione (resazurin) che altera le proprie caratteristiche spettroscopiche (assorbimento e fluorescenza). Il segnale permette di monitorare il livello di potere riducente presente nel terreno di coltura, che è direttamente proporzionale al tasso di crescita cellulare. Abbiamo effettuato questo test in due linee cellulari umane (Hek-292 e MCF7) a vari tempi di esposizione ai quattro CE scelti in varie concentrazioni. In tal modo è stata definita la citotossicità dei CE in dipendenza della loro concentrazione e determinato, ove possibile, la curva dose-risposta (Figura 95). I risultati ottenuti mostrano che in entrambe le linee cellulari solo il CE tonalide causa tossicità con una C50 pari a 125 μ M (con concentrazione C50 (C50) si intende la concentrazione espressa in molarità, alla quale si osserva una diminuzione pari al 50% di un parametro biologico misurato (tossicità, tasso di sintesi di RNA o

proteine, etc...). È possibile osservare un leggero aumento di attività riducente in MCF7 per gli altri CE a dosi medio-alte ($>100\ \mu\text{M}$) e per tempi inferiori a 48 ore di esposizione. Nel caso delle Hek-293 non si riscontrano cambiamenti apprezzabili sul metabolismo cellulare nel caso di trattamenti con ibuprofene, triclocarban e furosemide.

Per analizzare possibili effetti dei CE sul ciclo cellulare sono state trattate cellule MCF7 (Figura 96) e HEK293 con dosi crescenti di CE, ed osservata la percentuale di cellule nelle fasi del ciclo cellulare. Dato il grande numero di campioni da analizzare, si è ritenuto poco proficuo utilizzare la citofluorimetria si è optato per un sistema automatizzato di microscopia a fluorescenza, commercializzato con il nome di Operetta (Perkin Elmer). Lo strumento è in grado di eseguire letture multiparametriche direttamente in piastra multi-well. Per avere una stima della percentuale di cellule in fase di sintesi, abbiamo marcato il DNA in fase S con 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU). L'incorporazione di EdU è stata in seguito sviluppata tramite apposito kit commerciale (Life Technologies) basato su chimica click-it, mentre il DNA totale presente nella cellula è stato marcato con Hoechst. Le immagini sono state acquisite dalla piattaforma high content Operetta ed analizzate mediante il software Harmony. Per ogni condizione, il contenuto di DNA e l'incorporazione di EdU sono state utilizzate per separare le cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare. In tal modo è possibile distinguere le cellule in fase G1 (basso segnale Hoechst e EdU) dalle cellule in attiva sintesi (alto EdU), e in G2/M (alto segnale Hoechst). Sulla base di questi parametri è stata calcolata la percentuale relativa presente in ognuna delle tre fasi sopra-menzionate. Come controlli abbiamo utilizzato cellule non trattate (NT); cellule trattate con Nocodazolo (NOC), che blocca il fuso mitotico e sincronizza le cellule in mitosi; cellule in condizione di affamamento (o starvation (STV)), che conduce ad un accumulo di cellule in fase G0/G1; ed infine un trattamento con timidina (THYM) che causa uno stallo dei complessi di sintesi del DNA in fase S. Abbiamo appurato che le cellule Hek-293 non sono adatte a questo tipo di esperimento in piastra per la loro scarsa aderenza al supporto e conseguente esfoliazione dello strato cellulare durante le fasi di trattamento e lavaggio previste nel protocollo Click-it. Per questo motivo abbiamo ottenuto dati analizzabili solo nel caso della linea MCF7. In Figura 96 si possono osservare gli effetti dei trattamenti sulle percentuali di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare. In particolare notiamo che ibuprofene causa un blocco delle cellule in G1 ad alte concentrazioni del farmaco, a partire da $500\ \mu\text{M}$; furosemide non provoca alterazioni nella distribuzione delle fasi ma solo un trend di accumulo in fase G1 in presenza di concentrazioni superiori a $250\ \mu\text{M}$; triclocarban causa blocco in G1, con diminuzione delle cellule in fase S e annullamento di cellule in M fin dalle concentrazioni minori (1nM); tonalide causa un leggero blocco in G1 a basse dosi, mentre a dosi maggiori della C50 ($> 125\ \mu\text{M}$) causa distacco delle cellule dal substrato e impossibilità di acquisizione dei dati.

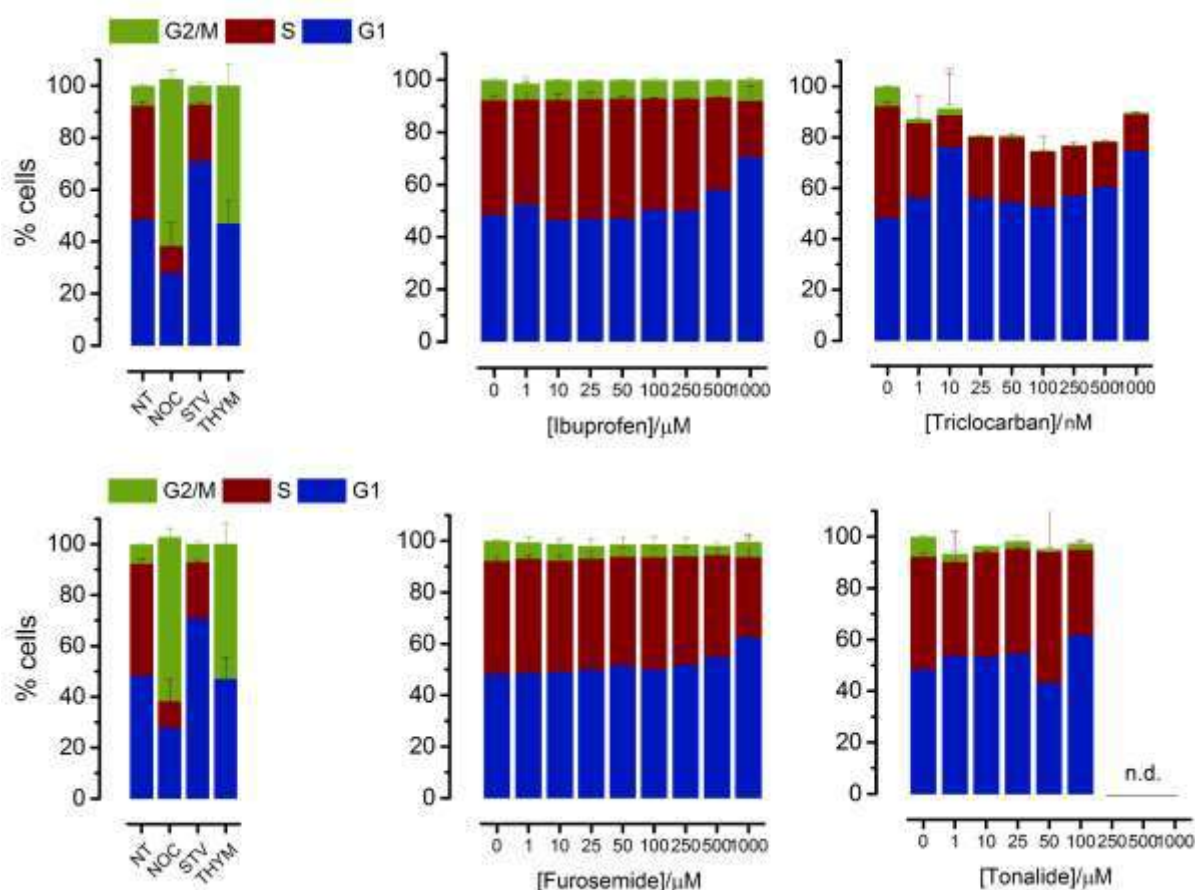


Figura 96 - Analisi del ciclo cellulare in MCF7. Il grafico mostra la distribuzione delle singole cellule sulla base della fluorescenza letta per EdU (DNA di nuova sintesi) e Hoechst (DNA totale). Sulla base del dato ottenuto per cellule non trattate di controllo, vengono disegnati dei gate per stabilire le percentuali di cellule nelle singole fasi. A destra della figura sono riportate su grafico in percentuale le diverse fasi del ciclo cellulare in seguito ai differenti trattamenti di controllo. Le percentuali di cellule nelle diverse fasi del ciclo sono mostrate in confronto con i trattamenti controllo e per ognuna delle concentrazioni di CE analizzati.

Per quanto riguarda il secondo punto (possibile presenza di marker apoptotici) e in seguito all'identificazione di un chiaro effetto citotossico della tonalide, abbiamo valutato l'effetto di questo CE su alcuni noti marcatori del pathway apoptotico. Sono stati presi in considerazione: i) P53, noto fattore di trascrizione che svolge un ruolo chiave all'interno delle cellule nella ricezione dei segnali di malessere e nell'organizzazione di una risposta efficace, sia essa intesa come riparo del danno sia come induzione di morte cellulare via apoptosi (Fridman and Lowe, 2003); ii) PARP, una proteina nucleare che viene attivata durante la risposta cellulare a danni a carico del DNA (Virág et al., 2013); PARP può direttamente indurre apoptosi mediando il rilascio di fattori pro-apoptotici da parte del mitocondrio; iii) Caspasi 9, una proteasi a valle della Caspasi 3 nel pathway di attivazione apoptotica (Li et al., 2017); iv) LC3, proteina sintetizzata come pro-LC3 viene immediatamente processata da Atg4 nella sua forma citosolica LC3-I. Durante la formazione dell'autofagosoma, LC3-I si lega covalentemente alla fosfatidiletanolamina, diventando così proteina di membrana. In questo processo LC3-I viene convertita nella sua forma attiva LC3-II.

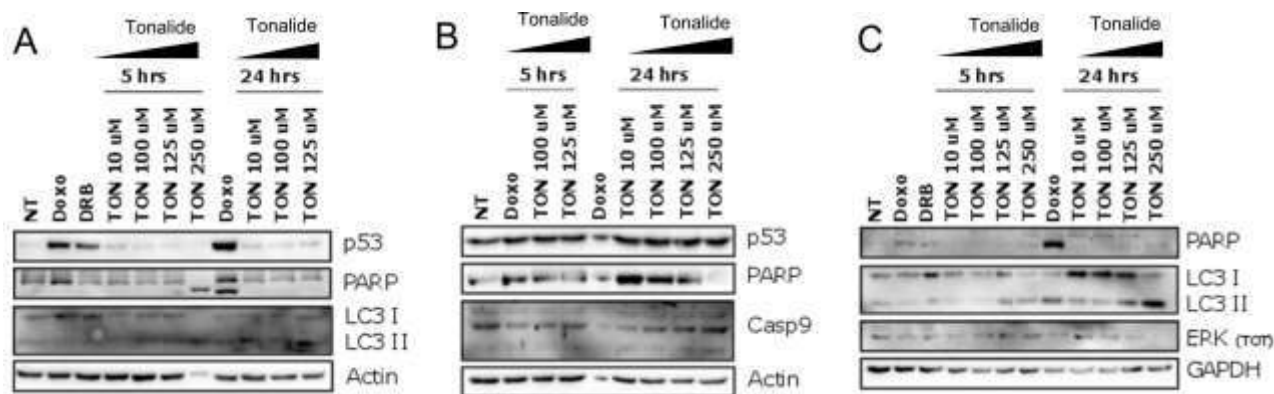


Figura 97 - Analisi marker apoptotici. Analisi dei livelli proteici di marcatori apoptotici mediante Western Blot su lisati cellulari di MCF7 (A), HEK293 (B) e HeLa (C) trattate con dosi crescenti di tonalide a 5h e 24h di esposizione. Controlli positivi: doxorubicina (20 ug/ml) a tempi medio lunghi, e DRB (50 uM) a tempi brevi. Actina e GAPDH sono stati utilizzati come controlli del caricamento in gel SDS-PAGE dei corrispondenti lisati cellulari.

Le analisi sono state effettuate a due tempi, due o quattro concentrazioni di tonalide e su tre linee cellulari (MCF7, Hek-292 e HeLa) comprendendo come controlli positivi trattamenti con composti noti per indurre apoptosi, in particolare Doxorubicina e DRB (Figura 97). In risposta al trattamento con i composti pro-apoptotici di controllo, p53 si accumula a livelli elevati in MCF7 e HeLa, mentre non si riscontrano cambiamenti dovuti al trattamento con tonalide in nessuna linea cellulare. Come atteso, PARP mostra un chiaro segnale di attivazione della cascata apoptotica a 24h di trattamento con Doxorubicina in MCF7, mentre non si osservano alterazioni dopo trattamento con tonalide.

La caspasi 9 è stata monitorata solamente in Hek-293 (Figura 97B) dove non si osservano cambiamenti significativi rispetto al controllo non trattato. Infine, si osserva un lieve aumento della forma attiva LC3-II in maniera dose e tempo-dipendente nelle linee tumorali MCF7 e HeLa. Nel complesso queste analisi non evidenziano chiari e consistenti danni genotossici e un coinvolgimento di eventi correlati ad apoptosi dipendente da autofagia da parte del CE tonalide.

Per quanto riguarda il punto iii), effetto a livello della trascrizione globale, sono stati analizzati gli effetti dei trattamenti con CE sui livelli di sintesi dell'RNA in MCF7 e HEK293 trattate con dosi crescenti di CE. Il livello di trascrizione di RNA all'interno delle cellule è stato misurato monitorando i livelli di incorporazione di 5-Ethynyl Uridine (EU). EU è un analogo dell'Uridina che viene incorporato in fase di trascrizione. Per questo motivo il saggio non distingue tra i diversi RNA trascritti (codificanti e non codificanti) dato che viene incorporato in mRNA, rRNA, tRNA e altre forme di RNA prodotte. Per discriminare la trascrizione di mRNA dal restante RNA (principalmente da rRNA, la forma più abbondante trascritta dalle cellule), abbiamo trattato i nostri campioni con DRB, un farmaco in grado di inibire specificamente la trascrizione mediata dalla RNA polimerasi II (RNAP-II), la polimerasi responsabile della sintesi dei trascritti codificanti (mRNA).

Il livello di RNA quantificato in seguito a trattamento con DRB è stato preso come riferimento della quantità di RNA prodotta da RNAP-I e RNAP-III e sottratto alle letture degli altri campioni. L'incorporazione di EU è stata rilevata sfruttando la Click-it

chemistry, che rende fluorescente il nucleotide incorporato. Le immagini sono state acquisite in high content con Operetta e analizzate con il software Harmony. In aggiunta al controllo con DRB, sono state utilizzate cellule non trattate (NT) e cellule in starvation 1% FBS (STV) (Figura 98). Anche in questo caso le Hek-293 non si sono rivelate adatte all'uso per la loro scarsa aderenza al supporto, pertanto le analisi mostrate riguardano esclusivamente la linea MCF7.

Il risultato in Figura 98 mostra l'effetto sul livello di trascrizione esercitato da ognuno dei CE in relazione al livello di cellule NT, normalizzato per il livello residuo dopo trattamento con DRB. Notiamo che a dosi elevate, tutti i CE causano una riduzione del livello di sintesi dell'RNA. L'effetto maggiore si osserva nel caso della tonalide con valori di C50 paragonabili a quelli osservati per la vitalità, con diminuzioni della sintesi di RNA per dosi superiori a 100 uM.

Infine, per quanto riguarda il quarto punto (analisi dei difetti nella sintesi globale di proteine analizzare gli effetti dei CE sulla capacità di sintesi proteica), sono state trattate le linee MCF7 e HEK293 con dosi crescenti di CE e verificato la produzione globale di proteine mediante marcatura metabolica. Tale saggio prevede la valutazione del livello di incorporazione dell'omologo dell'amino-acido metionina (Azido-homo-alanine (AHA)) in linee cellulari. L'incorporazione di AHA nella catena proteica nascente fornisce una buona approssimazione del livello globale di sintesi proteica in una determinata condizione. Come nel caso del saggio precedente, l'incorporazione di AHA è stata rilevata sfruttando la Click-it chemistry e le immagini sono state acquisite in high content con Operetta e analizzate con il software Harmony. Come controlli, oltre a cellule non trattate (NT), sono state analizzate cellule dopo 24 ore di starvation 1% FBS (STV) e cellule a cui, dopo un periodo di 24 ore di starvation è stato aggiunto un terreno con 30% FBS (3xFBS).

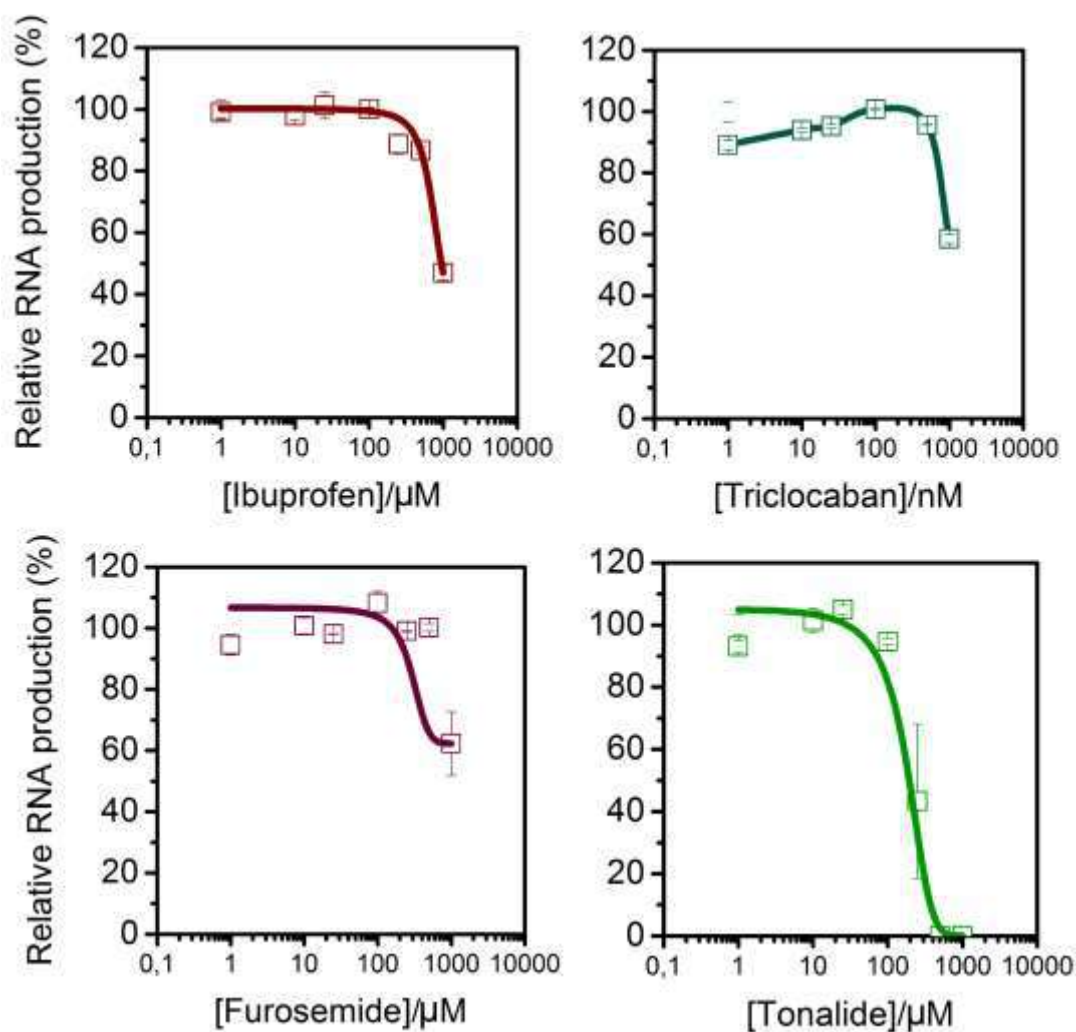


Figura 98 - Analisi della sintesi globale di RNA in MCF7. Produzione di RNA relativa ai livelli di fluorescenza relativa all'incorporazione di EU dopo trattamento con DRB dopo 24h di trattamento con i CE riportati in figura.

Come ultimo trattamento controllo le cellule sono state trattate con Puromicina (Puro), un inibitore specifico della sintesi proteica (non mostrati). Anche in questo caso le HEK293 non si sono rivelate adatte all'uso per la loro scarsa aderenza al supporto. I dati sono stati ottenuti con successo per la linea MCF7 (Figura 99). I risultati ottenuti mostrano un lieve effetto di inibizione della sintesi di proteine per ibuprofene, furosemide e triclocarban, mentre per tonalide la drastica diminuzione osservata può essere causata dal distacco delle cellule dal substrato di coltura.

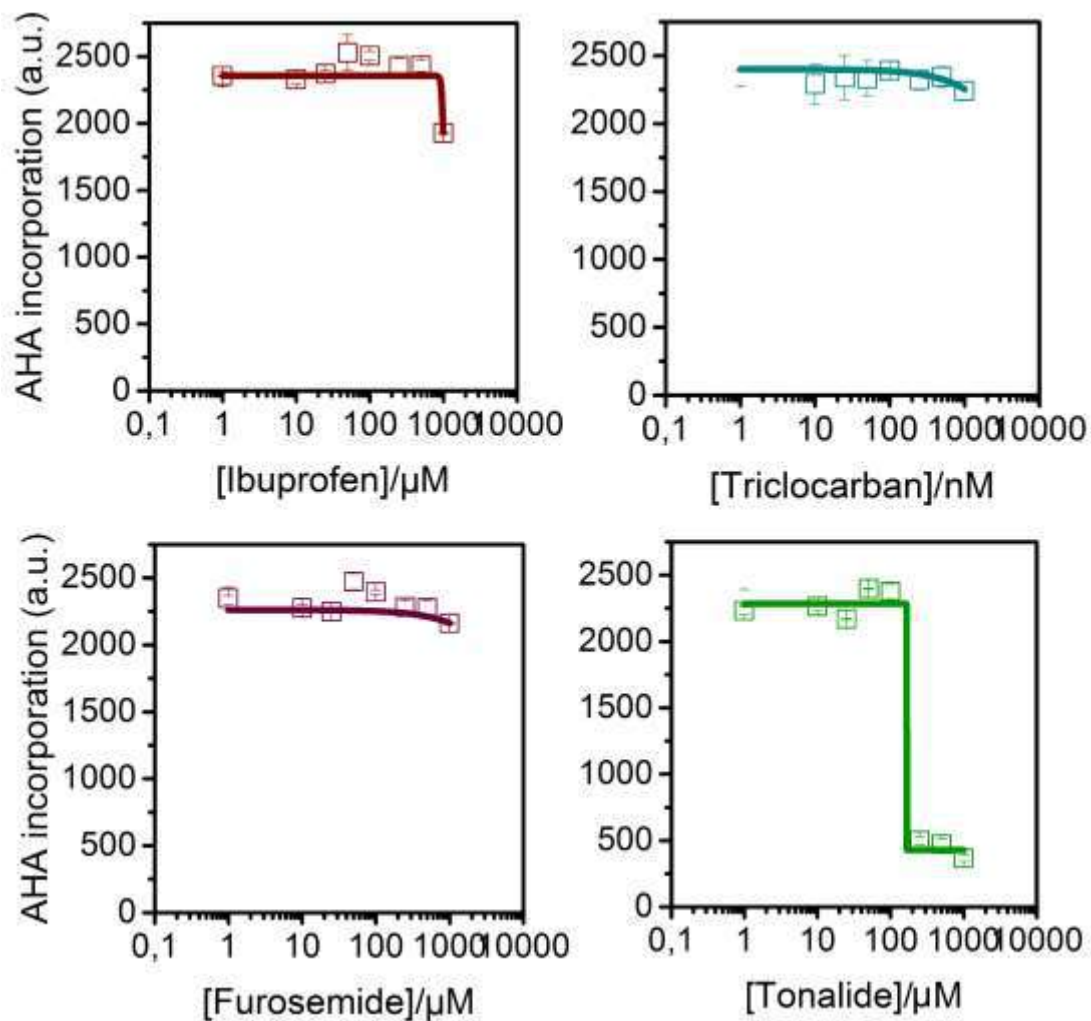


Figura 99 - Analisi della sintesi globale di proteine.

Vogliamo qui sottolineare che questi dati sono stati analizzati anche per quanto concerne i livelli proteici rilevati nei nucleoli. I nucleoli sono strutture presenti all'interno del nucleo in cui avviene l'assemblaggio dei ribosomi (ribobiogenesi). L'incorporazione di AHA rende i nucleoli particolarmente brillanti, indice della presenza di elevate quantità di proteine ribosomali sintetizzate durante il periodo di trattamento con AHA e rapidamente trasportate nel nucleolo per la ribobiogenesi. Nonostante le difficoltà tecniche che si riscontrano nel riuscire ad analizzare queste regioni subnucleari, abbiamo acquisito dati preliminari circa una possibile riduzione del segnale proteico nucleolare dopo il trattamento con tonalide (dati non mostrati). Il risultato, da valutare con maggiore attenzione, richiede studi supplementari ma suggerisce un possibile effetto della tonalide nella sintesi proteica. Non possiamo tuttavia escludere alterazioni ultrastrutturali del nucleolo in seguito a riarrangiamenti nella struttura della cromatina o nella distribuzione delle proteine nucleolari all'interno del nucleolo stesso.

3.17.2 Obiettivo 5.2 Identificazione di alterazioni dell'espressione genica in cellule umane dopo trattamento con CE mediante Next Generation Sequencing (NGS)

La analisi effettuate nel paragrafo precedente hanno posto in evidenza la tonalide come il CE con i maggiori effetti sulla fisiologia cellulare. In particolare le alterazioni a carico della sintesi dell'RNA e il possibile coinvolgimento a valle della trascrizione, quali possibili alterazioni a carico dell'apparato traduzionale ci hanno portato ad analizzare più in dettaglio i possibili profili di variazione dell'espressione genica. Per fare questo è stata utilizzata la tecnica del *polysomal profiling* che prevede la purificazione di poliribosomi e l'analisi dei profili mediante frazionamento in gradiente di saccarosio. La tecnica permette di analizzare l'associazione di mRNA con i ribosomi, di identificare possibili controlli nel reclutamento dei ribosomi nei poliribosomi per la sintesi delle proteine e di distinguere tra l'associazione dell'mRNA con l'apparato traduzionale e la produzione o trasporto degli stessi nel citoplasma (Bernabò et al., 2017). Questa tecnica è stata applicata alla linea MCF7 dopo il trattamento con quattro concentrazioni di tonalide per 24h (Figura 100A). Come si può osservare dalla figura, appare evidente l'aumento della frazione 80S a discapito della frazione polisomale dopo esposizione con dosi di tonalide superiori a 10 μ M.

L'esperimento è stato quindi ripetuto in Hek-293 ottenendo risultati analoghi (dati non mostrati). Quindi, per quantificare l'effetto osservato, è stato preso in considerazione un parametro largamente utilizzato per identificare difetti a carico dell'apparato traduzionale, ovvero la frazione di ribosomi reclutati nei polisomi. Da tale analisi risulta chiaro (Figura 101B) che la tonalide esercita un effetto di inibizione della traduzione. La stessa tipologia di esperimento è stata effettuata dopo trattamento con triclorocaban e ibuprofene, ma nessuna alterazione è stata identificata (dati non mostrati). Tonalide si conferma quindi il CE con maggiori effetti cellulari capace non solo di inibire la sintesi di RNA ma anche di alterare la sintesi proteica.

Dati questi risultati si è deciso di analizzare in maniera globale i possibili difetti nel reclutamento di specifici mRNA sui polisomi. Per fare questo è stato estratto l'RNA corrispondente all'intero gradiente (trascrittoma) e l'RNA associato alle sole frazioni polisomiali (traduttoma) in triplicato per MCF7 controllo e MCF7 trattate con 125 μ M di tonalide per 24h (Figura 100C). Confrontando trascrittoma e traduttoma dopo trattamento con tonalide per 24h, si è osservato che i cambiamenti trascrizionali appaiono coerenti con quelli traduzionali (Figura 100A).

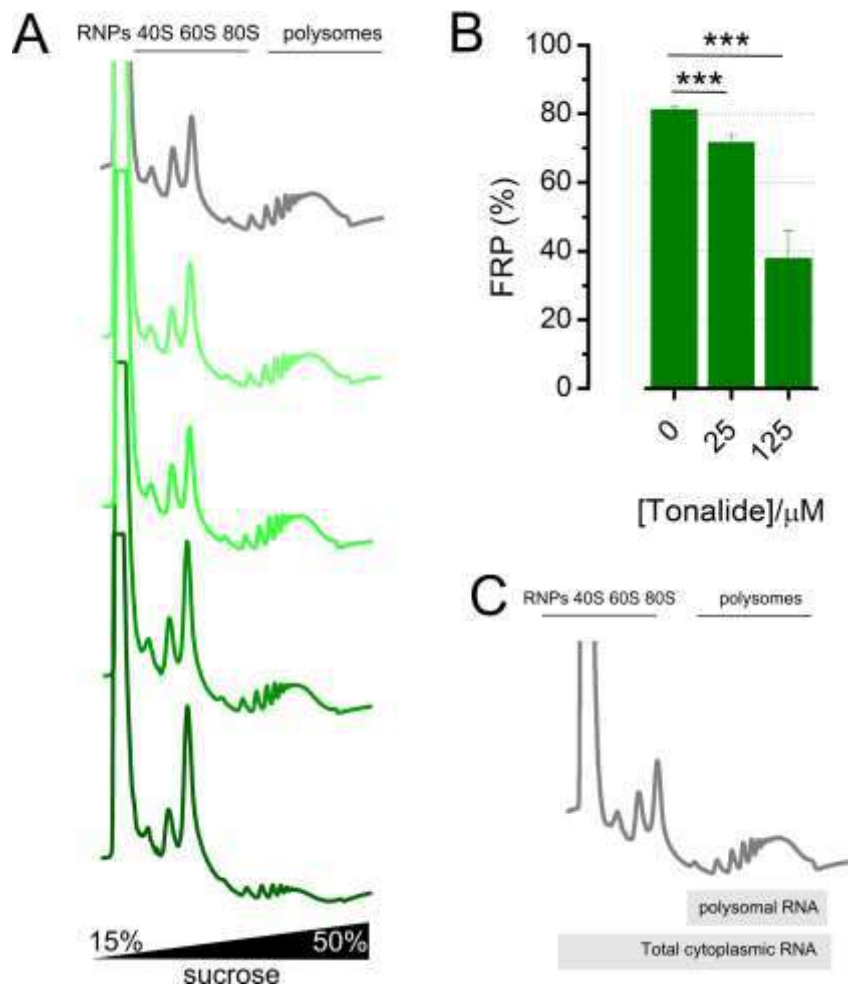


Figura 100 - Analisi dei profili polisomiali. (A) Profili di sedimentazione ottenuti in gradiente di saccarosio 15%-50% leggendo l'assorbanza a 254 nm di lisati cellulari di MCF7 non trattate (in grigio) o trattate con dosi crescenti di tonalide per 24h (10 μM, 25 μM, 50 μM, 125 μM secondo gradiente di verde dall'alto al basso). Lungo il gradiente è possibile osservare la sedimentazione di particelle ribonucleoproteiche e RNA liberi (RNP), delle subunità ribosomiali 40S e 60S, del ribosoma non traduce 80S; e delle frazioni polisomiali a coefficienti di sedimentazione maggiori. (B) Calcolo della frazione di ribosomi reclutati nei polisomi (FRP) in assenza e presenza di trattamento per 24h con tonalide alle due concentrazioni riportate. I valori riportati sono stati calcolati come il rapporto tra l'area sottesa ai polisomi e la somma dell'area sottesa ai polisomi e ai ribosomi 80S. I dati sono i valori medi \pm s.e.m. di esperimenti condotti in quadruplicato. T-test *** P-value < 0.001. (C) Schema del design sperimentale per l'estrazione di RNA totale citoplasmatico e RNA polisomale per analisi mediante sequenziamento.

Applicando opportune e stringenti soglie di significatività (P-value Benjamini Hochberg < 0.05) e di entità del cambiamento ($\log_2(\text{FC}) > 1.5$), sono stati identificati 856 geni alterati trascrizionalmente e 869 alterati traduzionalmente. Nel complesso la maggioranza dei trascritti alterati sono risultati essere codificanti per proteine (92.01%), ma una percentuale interessante (7.99%) riguarda RNA non codificanti poliadenilati (Figura 101B). Della totalità dei geni interessati a variazioni per effetto della tonalide, 475 e 499 sono risultati up-regolati a livello trascrizionale e traduzionale, rispettivamente. Un

numero leggermente inferiore è risultato essere down-regolato (371 geni a livello trascrizionale e 370 a livello traduzionale) (Figura 101C).

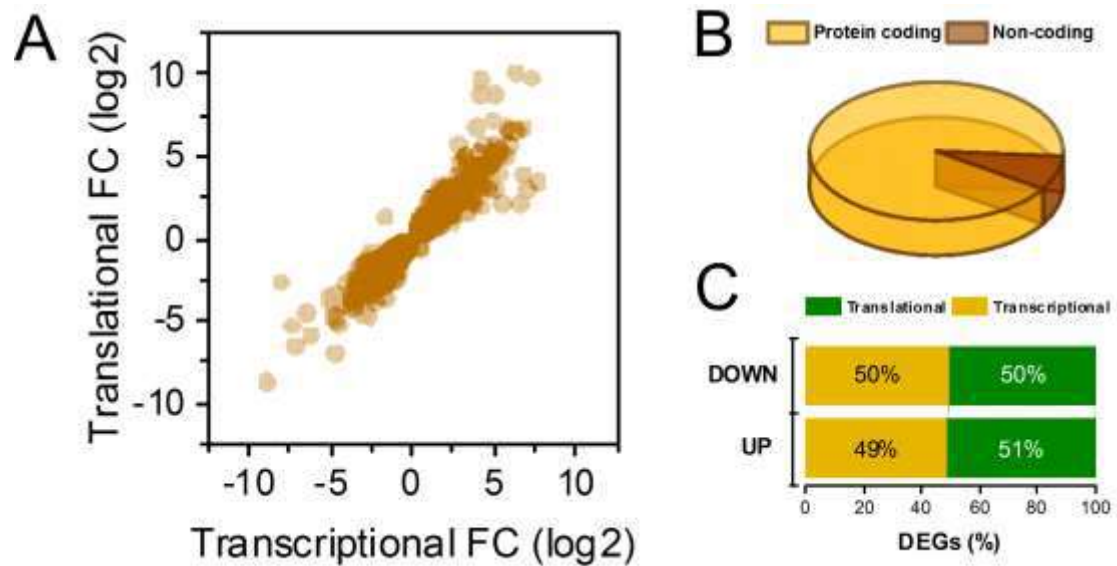


Figura 101 - Analisi trascrittomica e traduttomica delle alterazioni dell'espressione genica dopo trattamento con tonalide in MCF7. (A) Scatter plot di confronto tra i geni alterati a livello trascrizionale e traduzionale in MCF7 dopo trattamento con 125 μ M di tonalide per 24h. (B) Grafico a torta con la distribuzione percentuale dei trascritti alterati a livello trascrizionale e traduzionale. (C) Percentuale di geni differenzialmente espressi a livello trascrizionale (in giallo) e traduzionale (in verde) secondo variazioni positive (UP) o negative (DOWN) dopo il trattamento con tonalide.

Per poter rendere tali dati significativi dei cambiamenti cellulari sottostanti, è stata effettuata una analisi di arricchimento della Gene Ontology (Figura 101). Questo tipo di analisi permette di associare a ciascun gene una funzione. Mediante analisi di arricchimento è possibile stabilire la presenza di tematiche comuni a gruppi di geni differenzialmente espressi (DEGs) e identificare alterazioni in processi cellulari complessi. Da tale analisi emerge uno scenario di coerenza tra i cambiamenti osservati a livello trascrizionale e traduzionale.

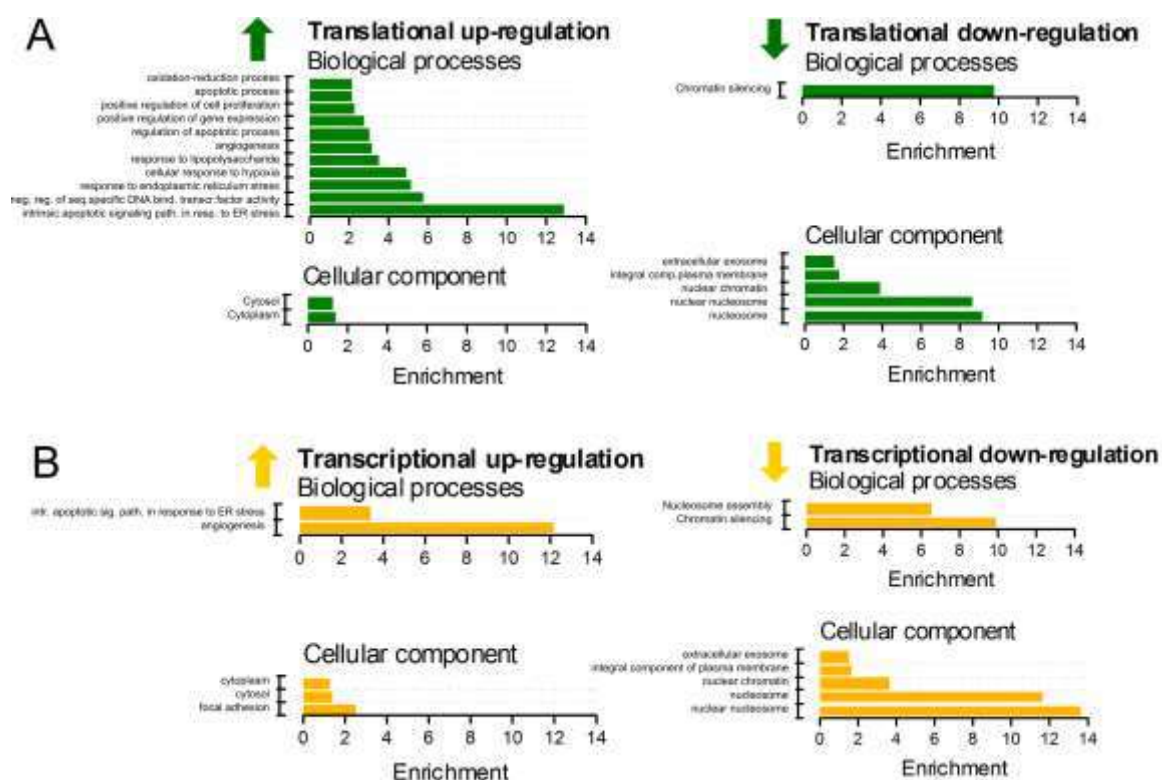


Figura 102 - Gene Ontology analysis dei geni implicati nelle alterazioni dell'espressione genica dopo trattamento con tonalide in MCF7. L'analisi è stata effettuata prendendo in considerazione i geni selezionati secondo le seguenti soglie: (P-value Benjamini Hochberg < 0.05) e di entità del cambiamento ($\log_2(FC) > 1.5$). L'analisi di arricchimento è stata realizzata valutando le tre branche della GO (Cellular component, Biological processes e Molecular function). Nel grafico sono mostrate solo le prime due dato che MF non ha dato arricchimenti significativi. In (A) sono mostrati i risultati ottenuti per DEGs traduzionali in (B) per i DEGs trascrizionali.

E' possibile notare che i geni differenzialmente down-regolati appartengono in entrambi i casi a eventi a carico dell'organizzazione della cromatina, mentre nel caso dei geni up-regolati le tematiche emergenti riguardano processi di stress e di rimodellamento del citoscheletro.

3.17.3 Obiettivo 5.3 Validazione degli effetti provocati da CE in cellule umane dopo trattamento con CE

Le alterazioni a carico della traduzione evidenziati nel paragrafo precedente portano a pensare che il pathway regolato dal complesso mTOR possa essere coinvolto nella risposta cellulare all'azione della tonalide. Il complesso mTOR funziona come sensore per nutrienti, energia e livello redox e controlla a valle la sintesi proteica attraverso catene di fosforilazione di fattori generali della traduzione o di proteine che ne controllano la disponibilità. La proteina 4E-BP1 e la proteina ribosomale RPS6 sono due dei target del pathway di mTOR (Topisirovic and Sonenberg, 2011). L'attività enzimatica di mTOR è inibita da Rapamicina (Ballou and Li., 2008), meccanismo da cui prende il nome (mammalian Target of Rapamycin). Per verificare possibili effetti provocati da concentrazioni crescenti della tonalide e degli altri CE presi in considerazione in questo WP, le linee cellulari MCF7 e HEK293 sono state trattate con dosi crescenti di CE per 24 ore, usando come controllo cellule non trattate (NT), cellule che hanno subito starvation 1% FBS (STV), starvation seguito da elevato livello di fattori di crescita (3xFBS), ed infine il trattamento con Rapamicina 100 nM per 4 ore (RAPAM). In seguito al trattamento le cellule sono state lisate e le proteine analizzate in Western Blot, utilizzando anticorpi contro i principali target indicativi di attività del pathway mTOR: Phospho-P70S6 kinase, Phospho-RPS6, eIF4E-BP1 e phospho-eIF4E-BP1.

I risultati in Figura 103 e in Figura 104 mostrano i WB ottenuti in MCF7 e HEK293 rispettivamente. Per quanto riguarda i livelli di fosforilazione in presenza dei CE in MCF7 (Figura 103), il risultato più evidente è fornito dal trattamento con tonalide, dove si osserva un aumento del livello di fosforilazione di 4E-BP in concomitanza ad un aumento della sua espressione.

Questo tipo di effetto conduce ad una minor disponibilità del fattore di inizio eIF4E e una conseguente diminuzione dei livelli di inizio della traduzione, coerentemente con quanto osservato dai profili polisomiali. Inoltre si può osservare una diminuzione dei livelli di fosforilazione di mTOR e RPS6, anch'essi possibili cause delle alterazioni a livello traduzionale. Questo risultato è stato riscontrato anche in Hek-293 (Figura 104). Unico dato di rilievo per quanto riguarda i restanti CE è l'effetto di riduzione della fosforilazione di mTOR causato da furosemide in HEK293.

In conclusione è stato osservato che tonalide è il CE che mostra i maggiori e più evidenti effetti inibitorio sul pathway mTOR.

Infine sono stati analizzati i livelli di espressione di E-Cadherin, una proteina di membrana implicata nell'adesione cellulare, tema biologico osservato essere up-regolato nei dati di trascrittomica e traduttomica. Importante nel contesto degli effetti da noi ritrovati, E-cadherin è coinvolta nella riorganizzazione del citoscheletro, nella motilità cellulare ed è positivamente regolata in condizioni di affamamento cellulare e inibizione della traduzione. In accordo con tale risultato e con i dati da noi ottenuti, il segnale di E-cadherin mostra un aumento dei livelli di E-Cadherin dopo trattamento di MCF7 con tonalide sia a 5 hrs che a 24 (Figura 105).

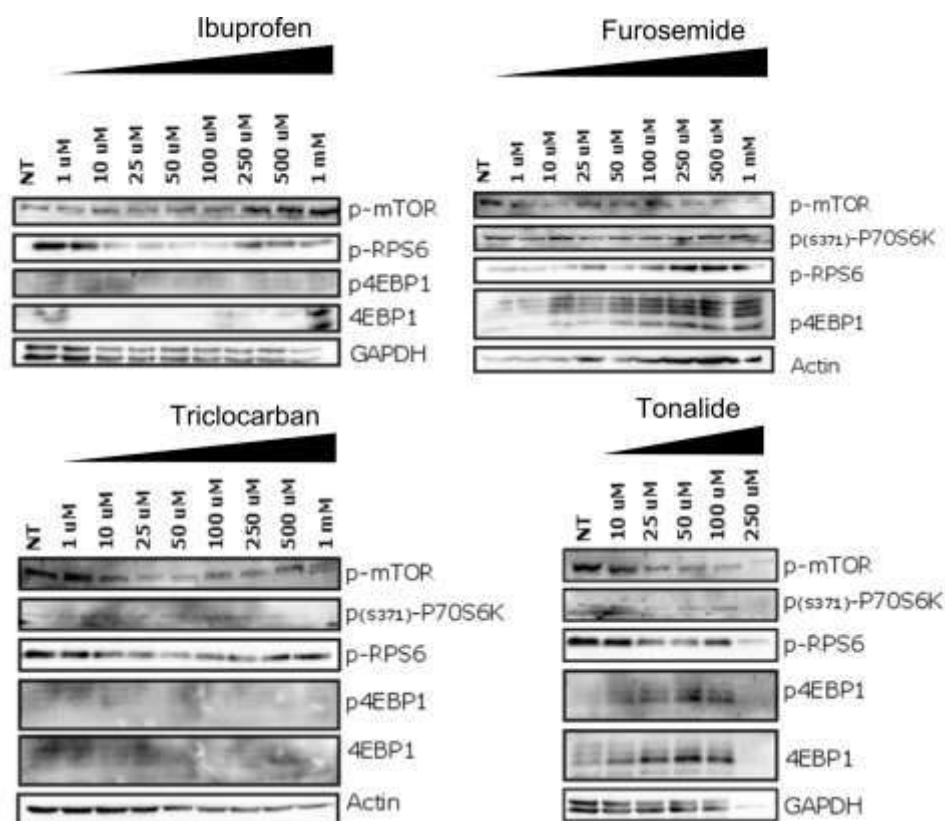


Figura 103 - Analisi attivazione/inattivazione dell'asse mTORC in MCF7. Analisi dei livelli proteici e dello stato di fosforilazione del pathway di mTOR in MCF7 mediante Western Blot su lisati cellulari. I quattro pannelli si riferiscono ai trattamenti per 24h con i CE menzionati in figura. Actina e GAPDH sono stati utilizzati come controlli del caricamento in gel SDS-PAGE dei corrispondenti lisati cellulari.

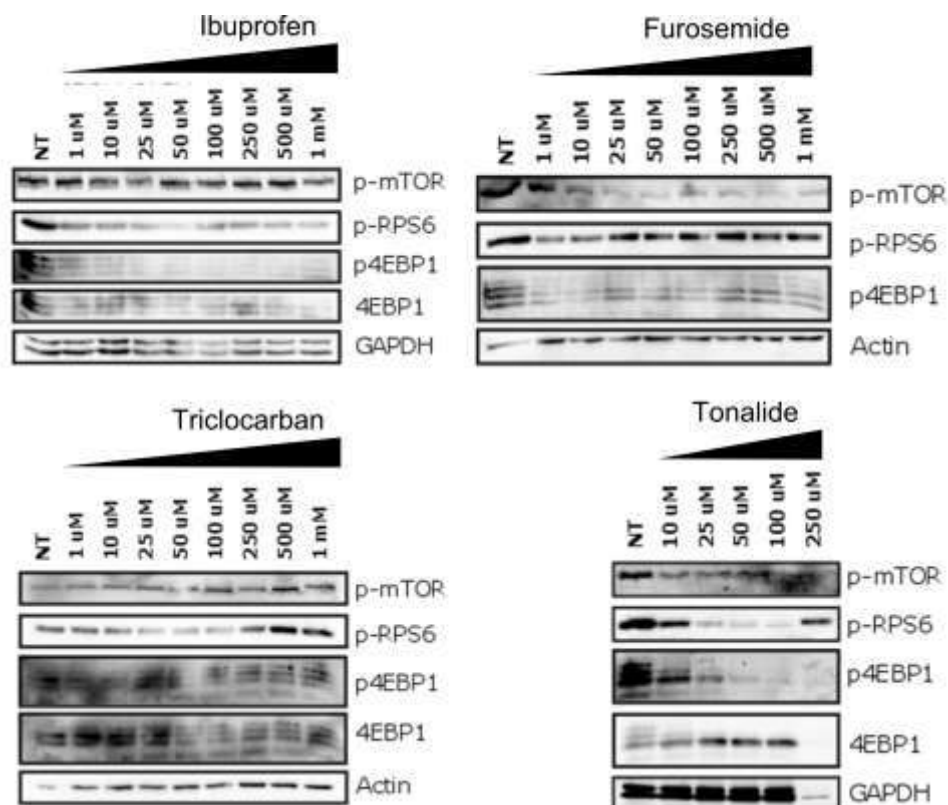


Figura 104 - Analisi attivazione/inattivazione dell'asse mTORC in Hek-293. Analisi dei livelli proteici e dello stato di fosforilazione del pathway di mTOR in Hek mediante Western Blot su lisati cellulari. I quattro pannelli si riferiscono ai trattamenti per 24h con i CE menzionati in figura. Actina e GAPDH sono stati utilizzati come controlli del caricamento in gel SDS-PAGE dei corrispondenti lisati cellulari.

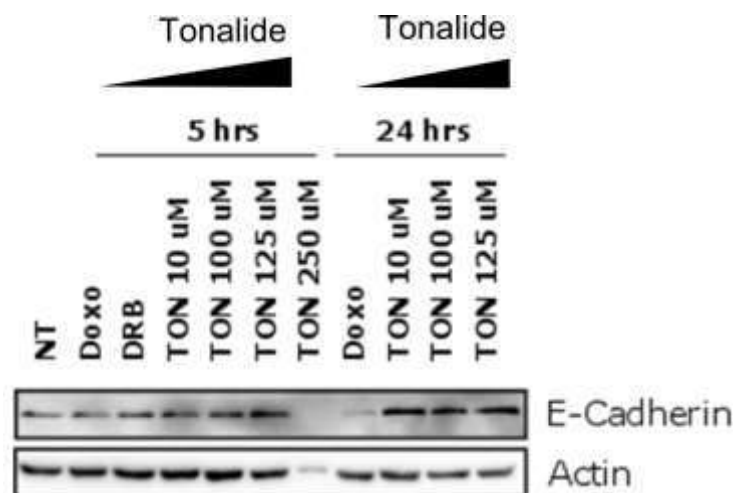


Figura 105 - Analisi dei livelli di espressione proteica di E-cadherin in MCF7. Analisi dei livelli proteici di E-cadherin in MCF7 mediante Western Blot su lisati cellulari dopo 5 e 24h di trattamento con diverse concentrazioni di tonalide. Actina è stata utilizzata come controllo del caricamento in gel SDS-PAGE dei corrispondenti lisati cellulari.

In conclusione, in seguito ai dati ottenuti negli esperimenti da noi effettuati nell'ambito del progetto appare chiaro che il CE con l'effetto più drammatico sulle linee cellulari risulta essere la tonalide. Questa molecola a concentrazioni superiori a 100 uM provoca danni trascrizionali e traduzionali con leggera alterazione del ciclo cellulare, inibizione del pathway metabolico mTOR ed infine del reclutamento dei ribosomi nei poliribosomi. Va considerato che 100 uM corrispondono a 25.84 mg/L, una concentrazione 120 mila volte superiore alla Predicted Environmental Concentration (PEC= 209.3 ng/L) e ¼ della LOEC valutata per *D. zernyi* (LC7 96h= 100 mg/L).

3.18 WP6 - Divulgazione e sensibilizzazione (resp. MUSE e APSS)

Il WP6 è dedicato alle attività di divulgazione dei risultati del progetto alla comunità scientifica (Obiettivo 6.1), ai portatori di interesse (stakeholders) e alla cittadinanza (Obiettivo 6.2), sensibilizzando l'opinione pubblica sulla tematica dei contaminanti emergenti (Obiettivo 6.3), di grande attualità. A partire dal mese di novembre 2015, come previsto, è stato attivato un programma di comunicazione volto a promuovere e valorizzare il progetto, anche al fine di comprovare visibilità del sostegno offerto dalla Fondazione. Lo stesso durerà fine a fine progetto (aprile 2018, data di scadenza, con proroga concessa, per la consegna del report finale).

Personale coinvolto: Coordinatore di WP6, dott.ssa Valeria Lencioni (2 mesi/uomo); dott. Loris Berardi (0,5 mesi/uomo); tutti il partenariato.

Le azioni di promozione e comunicazione del progetto, a partire da ottobre 2015, hanno previsto diverse azioni che hanno dato visibilità alla Fondazione e alla partnership, che proseguiranno per tutto il 2018. La prima di queste è stata la creazione del **logo** (in doppia lingua) del progetto (© Matteo Lencioni info@matteolencioni.com). La seconda azione è rappresentata dalla creazione di una **pagina web dedicata al progetto nel sito del MUSE**, a Novembre 2015 con successivi aggiornamenti (in corso fino alla conclusione del progetto), in doppia lingua, italiano e inglese, in cui è stato presentato l'obiettivo generale, il partenariato, il personale coinvolto, le collaborazioni (aggiornate in itinere), gli obiettivi specifici dei 6 work package e le ricadute sul contesto socio-economico locale.

- Link nel sito del MUSE al sito del progetto (in italiano)

<http://www.muse.it/it/Esplora/Progetti-Speciali/Pagine/RACE-TN/RACE-TN.aspx>

- Link nel sito del MUSE al sito del progetto (in inglese)

<http://www.muse.it/en/Esplora/Progetti-Speciali/Pages/RACE-TN/RACE-TN.aspx>

Una sezione è dedicata alle attività di promozione e divulgazione dei risultati con descrizione delle singole azioni intraprese suddivise in:

- Comunicati stampa, articoli/citazioni su quotidiani, riviste e media
- Convegni, workshop, eventi
- Tesi di laurea svolte nell'ambito del progetto

fornendo per ciascuna o un documento pdf scaricabile di approfondimento o il link all'iniziativa in cui l'azione è stata inserita e promossa (es. Tè degli insegnanti al MUSE).

La pubblicazione di informazioni sul progetto è avvenuta anche nel sito delle realtà partner, con **link al sito** della Fondazione e/o del MUSE:

- Libera Università di Bolzano (nel partenariato da ottobre 2015 a settembre 2016):

<http://www.unibz.it/en/sciencetechnology/research/Pages/ManagementandTechnologiesforMountainEnvironment.aspx>

- Università di Milano-Bicocca: Facebook dell'Università di Milano-Bicocca
- CNR-Istituto di Biofisica di Povo: <http://www.ibf.cnr.it/node/380>

3.18.1 Obiettivo 6.1: divulgazione dei risultati del progetto alla comunità scientifica

Partecipazione a Convegni e Workshop

- 24 novembre 2016: Workshop su “Effetti dei contaminanti emergenti sul comportamento animale”, Università di Milano Bicocca, Milano.
- 7-11 maggio 2017: SETAC Europe 27th Annual Meeting “Environmental quality through transdisciplinary collaboration”, Brussels
- 18 maggio 2017: Convegno: “Contaminanti emergenti nei fiumi trentini” Fondazione Cassa di Risparmio di Trento e Rovereto, Trento. Giornata studio con restituzione alla pubblica amministrazione e ai cittadini dei risultati del primo anno di progetto RACE-TN e relazioni su invito per i rappresentanti di APSS, ADEP, APPA e UNITN
- 2-8 luglio 2017: 20 International Symposium on Diptera Chironomidae, Trento, (http://www.muse.it/it/partecipa/Congressi-e-Convegni/archivio/20th_International_Symposium_on_Chironomidae/Pagine/home.aspx)
- 12-15 settembre 2017: Congresso della Società italiana di Ecologia, Napoli;
- 23 aprile 2018: Convegno: “Inquinamento “emergente” nei fiumi trentini”, Convegno, Trento, [Organizzato presso il MUSE]
- 13-17 Maggio 2018: SETAC Europe 28th Annual Meeting “Responsible and Innovative Research for Environmental Quality”, Roma;
- 12-14 Settembre 2018: Congresso della Società italiana di Ecologia, Cagliari.

Comunicazioni e poster a convegni

- 7-11 maggio 2017 - **Poster** al SETAC Europe 27th Annual Meeting: Pescatore T., F. Bellamoli, V. Di Nica, F. Miari, S. Villa and V. Lencioni, 2017 - Behavioural effects of pesticides and pharmaceuticals on chironomid larvae (*Diamesa zernyi*) from a glacier-fed stream. 7-11 maggio 2017: SETAC Europe 27th Annual Meeting “Environmental quality through transdisciplinary collaboration”, Brussels. Abstract book: 239.
- 2-4 luglio 2017 – **Comunicazione orale** al 20th International Symposium on Chironomidae, 2-8 July, 2017, MUSE - Museo delle Scienze, Trento, Italy: Lencioni V., F. Bellamoli, P. Bernabò, F. Miari, A. Scotti, 2017 - Response of *Diamesa* spp. from glacier-fed streams to temperature variations, emerging contaminants and pesticides. In: Lencioni V. (ed.), 2017, 20th International Symposium on Chironomidae. Abstract Book of the 20th International Symposium on Chironomidae, 2-8 July, 2017, MUSE - Museo delle Scienze, Trento, Italy. 110 pp; p. 46.
- 2-4 luglio 2017 – **Poster** al 20th International Symposium on Chironomidae, 2-8 July, 2017: Villa S., T. Pescatore, F. Bellamoli, V. Di Nica, V. Lencioni, 2017 - Behavioural effects of emerging contaminants and pesticides on *Diamesa zernyi* from a glacier-fed stream. In: Lencioni V. (ed.), 2017, 20th International Symposium on Chironomidae. Abstract Book of the 20th International Symposium on Chironomidae, 2-8 July, 2017, MUSE - Museo delle Scienze, Trento, Italy. 110 pp; p. 99.

- 12-15 Settembre 2017 - **Comunicazione orale** al Convegno della Società Italiana di Ecologia, Napoli, 12-15 settembre 2017: Villa S., Di Nica V., Pescatore T., Bellamoli F., Finizio A., Lencioni V., 2017 - Comparison of the behavioural effects of pharmaceuticals and pesticides on *Diamesa zernyi* larvae (chironomid). S.It.E., Convegno della Società Italiana di Ecologia, Napoli, 12-15 settembre 2017. Abstract book: 84.
- 13-18 maggio 2018 – **Poster** al SETAC Europe 28th Annual Meeting: Di Nica V., Lencioni V., Bellamoli F., Pescatore T., Ferrario C., Villa S., 2018 - Urban sewage effluents into an alpine stream: are information on behavioural effects on *Daphnia magna* suitable to protect alpine cold adapted species? SETAC Europe 28th Annual Meeting “Responsible and Innovative Research for Environmental Quality”, 13-17 May 2018 Rome. CONTROL ID: 44048.
- 12-14 settembre 2018: Proposta di **Sessione speciale al Congresso SITE 2018** coordinata da Sara Villa e Valeria Lencioni (in coll. Con Antonio Finizio Andrea Binelli): Ecotossicologia e stress ecology nella valutazione del rischio ambientale [verranno dedicati più lavori ai risultati del Progetto RACE-TN], Cagliari

Pubblicazioni

Pubblicate

- Villa S., Di Nica V., Pescatore T., Bellamoli F., Miari F., Finizio A., Lencioni V., 2018. Comparison of the behavioural effects of pharmaceuticals and pesticides on *Diamesa zernyi* larvae (Chironomidae). *Environmental Pollution*, 238: 130-139.
Abstract: Several studies have indicated the presence of contaminants in Alpine aquatic ecosystems. Even if measured concentrations are far below those that cause acute effects, continuous exposure to sub-lethal concentrations may have detrimental effects on the aquatic species present in these remote environments. This may lead to a cascade of indirect effects at higher levels of the ecological hierarchy (i.e., the community). To improve the determination of ecologically relevant risk endpoints, behavioural alterations in organisms due to pollutants are increasingly studied in ecotoxicology. In fact, behaviour links physiological function with ecological processes, and can be very sensitive to environmental stimuli and chemical exposure. This is the first study on behavioural alteration in a wild population of an Alpine species. In the present study, a video tracking system was standardized and subsequently used to identify contaminant-induced behavioural alterations in *Diamesa zernyi* larvae (Diptera, Chironomidae). *Diamesa zernyi* larvae, collected in an Italian Alpine stream (Rio Presena, Trentino Region), were acclimated for 24 h and successively exposed to several aquatic contaminants (pesticides: chlorpyrifos, metolachlor, boscalid, captan; pharmaceuticals: ibuprofen, furosemide, trimethoprim) at concentrations corresponding to their Lowest Observed Effect Concentration (LOEC). After 24, 48, 72, and 96 h of exposure, changes in the distance moved, the average speed, and the frequency of body bends were taken to reflect contaminant- and time-dependent effects on larval behaviour. In general, metolachlor, captan, and trimethoprim tended to reduce all the endpoints under consideration, whereas chlorpyrifos, boscalid, ibuprofen, and furosemide seemed to increase the distances moved by the larvae. This could be related to the different

mechanisms of action of the investigated chemicals. Independently of the contaminant, after 72 h a general slowing down of all the behavioural activities occurred. Finally, we propose a behavioural stress indicator to compare the overall behavioural effects induced by the various contaminants.

Accettate con revisioni

- Lencioni V., F. Bellamoli, P. Bernabò, F. Miari, A. Scotti (2018) Response of *Diamesa* spp. (Diptera: Chironomidae) from Alpine streams to emerging contaminants and pesticides. Special issue 20th International Symposium on Chironomidae, 2-8 July, 2017, MUSE - Museo delle Scienze, Trento, Italy
Journal of Limnology

Abstract:

Acute toxicity and genotoxic activity of 11 pollutants were investigated in wild populations of *Diamesa cinerella* and *Diamesa zernyi* (Diptera Chironomidae) from two alpine streams (Italian Alps). *D. cinerella* was collected in two sites on the non-glacial Vermigliana stream, 50 m-upstream and 5-m downstream of the Wastewater Treatment Plant (WTP) at the Tonal Pass (1799 m a.s.l.). *D. zernyi* was collected in the Presena glacial stream, close to the glacier snout (2685 m a.s.l.). IV-instar larvae were exposed for 24-96 h to increasing concentrations of three drugs (ibuprofen-IBU, furosemide-FUR, trimethoprim-TMP), three personal care products (triclocarban-TCC, tonalid-TON, sucralose-SUCR), and five pesticides (boscalid-BOS, captan-CAP, chlorpyrifos-CPS, metolachlor-MET, terbutilazina-TER). The experimental concentrations were from one to several millions times higher than the highest environmental concentration (EC) measured in the study sites. Two mixtures of pesticides were also prepared: MIX 1K=103 x EC of CPS, MET and TER, and MIX 10K= 104 x EC of CPS, MET and TER. Species- and site-specific responses were observed for both tests. On the basis of survival data, both species resulted very resistant to pharmaceuticals (mainly to FUR for which no effects on survival and movement or pupation were observed), and more sensitive to pesticides (mainly to CPS, MET and CAP). Genotoxicity tests (Comet assay) highlighted a WPT effect under natural conditions and a genotoxic effect for 9 of the 11 tested compounds. Overall, a clear gradient of increasing resistance in larvae from the least (PR0) to the most polluted (TP_dw) site was highlighted by both tests, ecotoxicological and of genotoxicity, as expected also according to species autecology (*D. zernyi* is restricted to very cold and pristine habitats). *D. cinerella* living downstream of the effluent accumulates a significantly higher DNA damage than the other populations, highlighting a basal physiological stress condition in nature. It is plausible that these larvae developed chemical resistance strategies to survive already under natural conditions. *Diamesa* spp. exhibited a higher toxic resistance than any other model species tested up to date under the same pollutants, probably associable to its strong cold resistance. The results emphasised that the measured concentrations of Contaminants of Emerging Concern (CECs) and pesticides seem to be far below those required to cause acute effects. However, the effects on freshwater communities of prolonged exposure to mixture of trace CECs and pesticides are still unknown.

- Villa S., V. Di Nica, F. Bellamoli, T. Pescatore, C. Ferrario, A. Finizio, V. Lencioni (2018) Effects on behaviour traits of a treated sewage effluent in *Diamesa cinerella* and *Daphnia magna*. Special issue 20th International Symposium on Chironomidae, 2-8 July, MUSE - Museo delle Scienze, Trento, Italy Journal of Limnology

Abstract:

Recently, the use of *Daphnia magna* has been proposed in on-line and real-time biomonitoring programmes as an early warning system for evaluating the effluent quality of sewage treatment plants (STPs). These systems are based on recording behavioural changes in the test organism resulting from the stress caused by the effluents. Indeed, altered behavioural signals could be induced at sublethal concentrations that are significantly lower than the corresponding EC50. However, at present, it is unknown whether the sensitivity of *D. magna* can be representative of that of other aquatic organisms, particularly benthic macroinvertebrates. An experiment was designed to verify whether *D. magna* can be employed in biomonitoring programmes for STPs located in alpine areas as a surrogate for cold freshwater best-adapted species. The responses of survival and behaviour alteration to exposure to the effluent of the Tonale Pass plant (Trentino, Italian Alps, 46°N, 10°E; 1799 m a.s.l.) were compared in a laboratory population of *D. magna* and a wild population of the chironomid *Diamesa cinerella*. These larvae were collected from the Vermigliana stream 50 metres upstream of the effluent input. Both organisms were exposed for 24 and 48 hrs to the effluent as it is and to three dilutions (/10, /100, /1000). The mortality rate and behavioural responses (using video tracking systems) were recorded. No significant mortality or change in behaviour was observed in the two species when exposed to the undiluted effluent. Exposure to serial dilutions of the treated effluent did not affect the survival of either species but notably altered their behaviour at both exposure times (e.g., the time spent in activity in *D. magna* and the average speed of movement and the cumulative distance travelled in both), especially when exposed to the ten-times-diluted effluent. Overall, the findings of this study emphasize that even though *D. magna* and *D. cinerella* use different behavioural strategies to cope with adverse environmental conditions, their overall sensitivity to treated effluents is similar. Accordingly, the use of *D. magna* in biological early warning systems protocols seems to also be sufficiently protective for local, cold-adapted species of alpine freshwater ecosystems.

Inviata a rivista

- Di Nica Valeria & Sara Villa. Hazard prioritization of PPCPs released by sewage treatment plant into an high altitude stream in the southern Alps. Environmental Science: Processes & Impacts

Abstract:

In this study, a list of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) was ranked in terms of the potential ecological risk posed for an Alpine surface water body, located in Val di Sole area, which receives treated effluents from the Passo del Tonale Sewage Treatment Plant (PT-STP). The followed methodology was based on the calculation of Risk Quotient (RQ) as described by the current EU guidelines on the Environmental Risk Assessment (ERA) for human pharmaceuticals and new, priority existing and biocidal active chemical substances (EMA, 2006; EC, 2003). To do this, local consumptions of human

pharmaceuticals and PCPs were combined with data on human excretion and STP removal to obtain the Predicted Environmental Concentration for surface water (PEC_{sw}) according the mentioned EU guidelines. The potential effects towards non-target organisms representative of the aquatic compartment (Algae, Daphnia, fish) were taken into account through the characterization of the Predicted No Effect Concentration (PNEC) for surface water. The outcome of the prioritization exercise showed that the most concern substances were antibiotics, antibacterial, surfactants, and non-steroidal anti-inflammatory drugs. Particularly, the high pharmaceutical occurrence was associated to the strong touristic pressure during the holiday times. Many of the top ranked substances may pose a serious threat to the environment and human health for the development of antimicrobial resistance. The comparison of the obtained pharmaceutical risk ranking based on environmental predicted and measured concentrations gave similar outcomes for both winter and summer seasons. Even if with some exceptions due to unavoidable and intrinsic factors of variability, both approaches identified the same PhACs as posing the highest and the lowest ecological risk for the site of study. Findings of this study support the importance of the availability of local data on pharmaceutical consumption including those referred to over the counter drugs. This availability is often a big limitation for a correct prediction of the environmental aquatic load of pharmaceuticals.

Diverse pubblicazioni sono in preparazione:

- Bertini E., Lencioni V., Viero G. Effects on gene expression in human cell lines of four emergent contaminants. *On ISI Journal*
- Finizio A., Ferrario C., Rizzi C., Villa S. Are currently used pesticides posing a threat to the Alp glacialised ecosystems? *On ISI journal*.
- Lencioni V., Bellamoli F., Scotti A., Miari F. Acute toxicity of emerging contaminants on alpine macroinvertebrate communities. *On ISI Journal*
- Lencioni V., Bellamoli F., Bernabò P., Scotti A., Miari F. Are alpine invertebrates stressed by emerging contaminants? *On ISI Journal*
- Lencioni V., Villa S. How to measure the physiological stress by CE in aquatic invertebrates: comparison between different ecotoxicological approaches. *On ISI Journal*
- Lencioni V., Di Nica V., Viero G., Villa S. Environmental Risk assessment of emerging contaminants in Trentino rivers: effects on wildlife and human health. *On ISI Journal*
- Lencioni V., Di Nica V., Viero G., Rodriguez A., Guizzardi F., Villa S. Inquinamento da contaminanti emergenti nei fiumi trentini. *Pubblicazione divulgativa*

Tesi di laurea svolte nell'ambito del progetto (**Attività di alta formazione**). Sono state eseguite 8 tesi di laurea:

1. Alberto Scotti, 2015/2016. Eco-genotoxic effects of emerging contaminants to invertebrate community in a mountain stream. Laurea magistrale in Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e le Risorse, Università degli Studi di Parma. Relatore: Giampaolo Rossetti; Correlatore: Valeria Lencioni (MUSE)
2. Francesco Miari, 2016/2017. Tossicità di farmaci, prodotti per la cura personale e pesticidi per insetti alpini. Laurea magistrale in Monitoraggio Biologico, Università degli Studi di Genova. Relatore: Alberta Mandich; Correlatore: Valeria Lencioni (MUSE)

3. Federica Bressan, 2016/2017. Studio della comunità dei macroinvertebrati del torrente glaciale Rio Presena (Trentino). Laurea triennale in Scienze Naturali, Università degli Studi di Padova. Relatore: Lorenzo Zane; Correlatore: Valeria Lencioni (MUSE)
4. Giuseppe Melchiori, 2015/2016. Gli anfibi nel bacino idrografico del Torrente Noce (Trentino): vecchie e nuove minacce e possibilità di gestione. Laurea triennale in Tecnologie Forestali e Ambientali, Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Territorio e Sistemi Agro Forestali. Università degli Studi di Padova. Relatore: Andrea Battisti; Correlatore: Michele Menegon (MUSE)
5. Silvia Infante, 2016/2017. Ricostruzione storica dell'accumulo di contaminanti emergenti nei ghiacciai. Laurea magistrale in Scienze e tecnologie per l'ambiente ed il territorio, Università degli Studi di Milano Bicocca (Italy). Relatore: Antonio Finizio; Correlatore: Sara Villa (UNIMI-Bicocca)
6. Giovanna Marino, 2016/2017. Valutazione del rischio ambientale dei contaminati emergenti in torrenti alpini. Laurea magistrale in Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e il Territorio, Università degli Studi di Milano Bicocca, Milano. Relatore: Antonio Finizio; Correlatore: Sara Villa, Valeria Di Nica (UNIMI-Bicocca)
7. Sonia Carminati, 2016/2017. Identificazione e quantificazione di farmaci e droghe d'abuso in acque reflue urbane. Laurea triennale in Scienze e Sicurezza Chimico-Tossicologiche dell'Ambiente, Università Statale degli Studi di Milano. Relatore: Giangiacomo Beretta; Correlatore: Sara Castiglioni (Istituto Mario Negri, Milano)
8. Elena Palmieri, 2017/2018. I Ditteri Chironomidi del Torrente Noce. Laurea triennale in Scienze Naturali, Università di Modena e Reggio Emilia. Relatore Ivano Ansaloni; Correlatore: Valeria Lencioni (MUSE).

3.18.2 Obiettivi 6.2-6.3: Dialogo con i portatori di interesse (stakeholders) e la cittadinanza (Obiettivo 6.2), Sensibilizzazione dell'opinione pubblica sulla tematica dei contaminanti emergenti (Obiettivo 6.3)

Comunicati stampa e rilascio di interviste ai media

- comunicato stampa in data 1 dicembre 2015: http://www.muse.it/it/Esplora/Progetti-Speciali/Documents/RACE-TN/CS_Articoli-giornale/CS_MUSE_1-12-2015_Pr-RACE-TN.pdf.
- Articolo sul giornale l'Adige in data 12 dicembre 2015; http://www.muse.it/it/Esplora/Progetti-Speciali/Documents/RACE-TN/CS_Articoli-giornale/RACE-TN_LAdige_12-XII-2015.pdf.
- 1 febbraio 2017: intervista televisiva TG Trentino Alto-Adige edizione delle 19.30; <http://www.rainews.it/dl/rainews/TGR/multimedia/ContentItem-c76827ec-ccab-44ca-8e91-09d2b2a42586.html>
- 15 febbraio 2017: articolo sul giornale on line Oggiscienza; <https://oggiscienza.it/2017/02/15/racetrn-inquinamento-contaminanti-emergenti/>
- 24 marzo 2017: articolo su Ansa.it; http://www.ansa.it/trentino/notizie/2017/03/24/tracce-di-inquinanti-sul-ghiacciaio-presena_514550cc-9715-48e5-9cfb-a0b96f947ee0.html
- 20 marzo 2018: Intervista radiofonica: RAI 1 Regione, in "La vita è meravigliosa"

- Comunicato stampa “Inquinamento emergente nei fiumi trentini” e interviste RAI (ad oggi da concordare), aprile 2018

Eventi

- 27 febbraio 2016, 18 giugno 2016, 10 dicembre 2017 (14.00-18.00), “Ask the scientists” nel Laboratorio a vista (Openlab) di idrobiologia del MUSE, evento di divulgazione scientifica dedicato al pubblico del Museo nei weekend
- 13 aprile 2016: **Il Tè degli Insegnanti**: “Microorganismi e qualità ambientale”. Relatrice: Sonia Ciccazzo, ricercatrice Sezione Zoologia degli invertebrati e Idrobiologia MUSE.
- 7- 8 aprile 2016: Field trip for master's degree students within the project: “A glance at research”. Due **giornate di alta formazione** per studenti dell'Università di Ingegneria di Monaco di Baviera dedicate ad obiettivi e metodi del progetto RACE-TN, sia sul campo che in laboratorio [in lingua originale - The project, promoted by the Technische Universität München (TUM) educational fund, aims at providing master's degree students of the TUM Department of Civil, Geo and Environmental Engineering an opportunity to understand and experience what it means to work in an international scientific research project, by planning and performing scientifically relevant field-scale hydrological experiments. The attending students will take part in a five-day field trip to the Adige catchment (Northern Italy) (April, 2016), involving MUSE, University of Trento, Museum of Rovereto and Meteotrentino. Two days (7th-8th April, 2016) will be devoted to hydrobiological investigations and laboratory activities within RACE-TN project coordinated by the Invertebrate Zoology and Hydrobiology Department of the MUSE.]
- 22 maggio 2016: Festival della Biodiversità. Evento organizzato in occasione della Giornata internazionale della Biodiversità: “Biodiversità del mondo invisibile in alta montagna”.
- 10 maggio 2017 **Il Tè degli Insegnanti**: “Farmaci, saponi e profumi: i nuovi inquinanti dell'ambiente”. Relatore Efrem Bertini, ricercatore, collaboratore del MUSE e del CNR-IBF.
- 29 settembre 2017: “**La Notte dei Ricercatori**” MUSE- Museo delle Scienze “video tracking di larve esposte ad agenti inquinanti - come farmaci e pesticidi influenzano il nuoto degli insetti acquatici”
- 29 gennaio 2018, V. Lencioni: Presentazione di alcuni risultati del Progetto RACE-TN all'evento **N-ICE-CELLO: “Clima che cambia e crisi dell'acqua”**. MUSE - Museo delle Scienze, Trento, 29 gennaio 2018.
- 6 giugno 2018, V. Lencioni: Presentazione di risultati del Progetto RACE-TN nell'evento: Caffè scientifico “Hai sentito anche tu? Accorgersi del clima che cambia: i segnali in Trentino”, presso il MUSE

Relazione con stakeholders, amministrazioni pubbliche e cittadini

Sin dalla fase iniziale del progetto il MUSE ha interagito in modo costruttivo con i principali stakeholders locali che sul territorio si occupano di depurazione delle acque (l'Agenzia per la Depurazione, ADEP; 22/01/2015, 19/02/2015, 03/05/2017, 18/05/2017, 23/04/2018), del monitoraggio della qualità delle acque superficiali

(Agenzia Provinciale per la protezione dell'ambiente della Provincia Autonoma di Trento, APPA; 16/6/2016, 01/2015, 19/02/2015, 03/05/2017, 18/05/2017, 20/02/2018, 23/04/2018). Gli incontri hanno consentito la programmazione di prelievi stagionali di acque in entrata e uscita dai due depuratori di Tonale e Campodenno (con ADEP) e di aprire un dialogo sul tema dei CE con l'APPA con cui ci sarà condivisione dei dati.

Nel 2018 è stato elaborato il **Questionario “Come gli abitanti della Val di Sole percepiscono la qualità del Torrente Noce?”** in collaborazione con la Rete delle Riserve Alto Noce e la Comunità della Valle di Sole per valutare lo stato delle conoscenze sul tema del Progetto RACE-TN tra i residenti e turisti della Valle di Sole. I risultati verranno presentati nel corso del convegno del 23 maggio 2018, seguiranno serate informative nel corso della primavera-estate 2018 ai partecipanti. Link al Questionario: <https://goo.gl/forms/EPILjsiFOkiWH2ml2>.

Di seguito viene riportato il testo del questionario on-line.

Come gli abitanti della Val di Sole percepiscono la qualità del Torrente Noce?

Questa indagine è promossa dalla Comunità della Valle di Sole, dalla Rete di Riserve Alto Noce e dal MUSE-Museo delle Scienze di Trento nell'ambito del Progetto RACE-TN (2015-2018) co-finanziato dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Trento e Rovereto. Il progetto ha come obiettivo generale la valutazione del rischio ambientale da “contaminanti emergenti” nei fiumi trentini.

***Campo obbligatorio**

1. Sesso

Contrassegna solo un ovale.

- ☐ Donna
☐ Uomo

2. Età

Contrassegna solo un ovale.

- ☐ meno di 30 anni
☐ tra i 30 e i 60 anni
☐ più di 60 anni

3. Titolo di studio

Contrassegna solo un ovale.

- ☐ Scuola elementare
☐ Scuole medie
☐ Diploma
☐ Laurea

4. Occupazione

Contrassegna solo un ovale.

- ☐ Agricoltore/agricoltrice
- ☐ Dirigente o funzionario/a nella pubblica amministrazione
- ☐ Insegnante
- ☐ Impiegato/a
- ☐ Addetto/a nel settore turistico o culturale
- ☐ Architetto/ingegnere/geometra
- ☐ Studente
- ☐ Operaio/a
- ☐ Altro: _____

5. Sei residente in Val di Sole?

Contrassegna solo un ovale.

- ☐ Sì
- ☐ No, sono un turista occasionale
- ☐ No, sono un turista che torna in Val di Sole una o più volte all'anno

6. Dove risiedi in Val di Sole?

Contrassegna solo un ovale.

- ☐ Alta Val di Sole (Comuni di Peio, Vermiglio, Ossana e Pellizzano)
- ☐ Media Val di Sole (Comuni di Commezzadura, Mezzana e Dimaro-Folgarida)
- ☐ Bassa Val di Sole (Comuni di Croviana, Malé, Rabbi, Caldes e Cavizzana)
- ☐ Altro: _____

7. Sei socio/a di qualche associazione ambientalista?

Contrassegna solo un ovale.

- ☐ No
- ☐ WWF
- ☐ Legambiente
- ☐ Greenpeace
- ☐ Lipu
- ☐ FAI
- ☐ Altro: _____

8. Quanto è importante per te tutelare l'ambiente? *

Contrassegna solo un ovale.

- ☐ Per niente importante
- ☐ Poco importante
- ☐ Abbastanza importante
- ☐ Molto importante

9. Quali sono i fattori che alterano maggiormente la qualità dell'acqua dei fiumi? *

Scegli al massimo 2 opzioni

Seleziona tutte le voci applicabili.

- ☐ Cambiamenti climatici e ritiro dei ghiacciai
- ☐ Utilizzo di fitofarmaci e fertilizzanti in agricoltura
- ☐ Piscicoltura (allevamenti intensivi di pesci)
- ☐ Utilizzo di farmaci, saponi, profumi per l'igiene personale e della casa
- ☐ attività ricreative (es. rafting, pesca, sci)
- ☐ Regimazione e cementificazione delle sponde e del letto del fiume
- ☐ Produzione di energia idroelettrica
- ☐ Altro: _____

10. Rispetto all'inquinamento dei fiumi da farmaci e pesticidi, ritieni di essere? *

Contrassegna solo un ovale.

- ☐ Per nulla informato/a
- ☐ Poco informato/a
- ☐ Abbastanza informato/a
- ☐ Molto informato/a

11. Secondo te, farmaci, coloranti alimentari, saponi, detersivi e profumi possono essere rinvenuti nei fiumi anche in presenza di depuratori? *

Contrassegna solo un ovale.

- ☐ Sì
- ☐ No

12. Nel complesso come giudichi la qualità dell'acqua del Torrente Noce nella valle in cui vivi? *

Contrassegna solo un ovale.

- ☐ Pessima
- ☐ Discreta
- ☐ Buona
- ☐ Ottima

13. Se credi non sia ottima, quali sostanze secondo te ne contaminano l'acqua? *

Scegli al massimo 2 opzioni

Seleziona tutte le voci applicabili.

- ☐ Farmaci, profumi e saponi usati per l'igiene personale
- ☐ Fitofarmaci utilizzati in agricoltura
- ☐ Rifiuti solidi (spazzatura)
- ☐ Gas di scarico delle automobili
- ☐ Reflui umani e dell'allevamento
- ☐ Altro: _____

14. Secondo te, quando l'acqua di un fiume è di buona qualità? *

Contrassegna solo un ovale.

- ☐ Quando ha un buon sapore ed è inodore
- ☐ Quando è limpida
- ☐ Quando contiene farmaci in basse concentrazioni
- ☐ Quando ospita molte specie di alghe, insetti e pesci
- ☐ Quando le sponde e il letto non sono modificate dall'uomo e la vegetazione delle rive è florida

15. Grazie per il tuo contributo! Vuoi rimanere aggiornato/a sui risultati dell'indagine e sull'inquinamento dei nostri fiumi?

Lascia il tuo indirizzo e-mail:

Il torrente Noce



4 Bibliografia

- AG, Australian Government, 2014. Prescribing medicines in pregnancy database.
- AIFA, 2015. Osservatorio Nazionale sull'impiego dei Medicinali. L'uso dei farmaci in Italia. Rapporto Nazionale 2014. Roma: Agenzia Italiana del Farmaco, 2015. Il rapporto è disponibile consultando il sito web www.agenziafarmaco.gov.it
- Akbalik G., Langebeck-Jensen K., Tushev G., Sambandan S., Rinne J., Epstein I., Cajigas I., Vlatkovic I., Schuman EM., 2017. Visualization of newly synthesized neuronal RNA in vitro and in vivo using click-chemistry. *RNA Biol.* 2017 Jan 2;14(1):20-28.
- Allan IJ., Vrana B., Greenwood R., Mills GA., Roig B., Gonzalez C., 2006. A "toolbox" for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta* 2006;69:302–322.
- Alpine Convention, 2009. Permanent Secretariat of the Alpine Convention Water and water management issue. ISBN 978-8-89-043483-9.
- Amiard-Triquet C., 2009. Behavioral disturbances: the missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects bases on aquatic research *Human and Ecological Risk Assessment* 15, 87–110.
- Ankley GT., Call DJ., Cox JS., Kahl MD., Hoke RA., Kosian PA., 1994. Organic carbon partitioning as a basis for predicting the toxicity of chlorpyrifos in sediments. *Environ Toxicol Chem*;13(4):621–6.
- Annis, S. L., Dastoor, F. P., Ziel, H., Daszak, P., & Longcore, J. E. ,2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(3), 420–8. <http://doi.org/10.7589/0090-3558-40.3.420>.
- APAT, 2002 Guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati. Utilizzo di indicatori ecotossicologici e biologici. Roma: Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i Servizi tecnici. (RTI CTN_SSC 2/2002).
- APPA, 2012. Provincia Autonoma di Trento - Agenzia provinciale per la protezione dell'ambiente - Pubblicazioni - Acqua. Retrieved from <http://www.appa.provincia.tn.it/appa/pubblicazioni/-Acqua/pagina104.html>
- Arroit M., Aristi I., Flores L., Larrañaga A., Díez J., Mora J., Romaní A.M., Elosegí A., 2012. The use of wooden sticks to assess stream ecosystem functioning: Comparison with leaf breakdown rates. *Science of the total environment*, 440: 115-122.
- ASHP - American Society of health-System Pharmacists, 2015. AHFS DI Essentials, Selected Revisions February 11, 2015., Bethesda, Maryland 20814.
- ASHP - American Society of health-System Pharmacists, 2016. Brufen (Ibuprofen) 400mg tablet; 100mg/5mL Syrup.
- Avdeef, A., 2003. Absorption and drug development: Solubility, permeability, and charged state. Wiley, Hoboken, NJ, USA.
- Azevedo-Pereira, H.M.V.S., Lemos, M.F.L., Soares, A.M.V.M., 2011. Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: linking acetylcholinesterase activity to behaviour. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1210–1215.
- Azur Environmental. 1998. Microtox System Operating manual. Carlsbad, CA, USA.
- Backhaus T., 2014. Medicines, shaken and stirred: a critical review on the ecotoxicology of pharmaceutical mixtures. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.* 369, 20130585.

- Backhaus T., Karlsson M. 2014. Screening level mixture risk assessment of pharmaceuticals in STP effluents. *Water Res.* 49, 157–165.
- Balk, F., & Ford, R. A. (1999). Environmental risk assessment for the polycyclic musks , AHTN and HHCB II . Effect assessment and risk characterisation, 111, 81–94.
- Ballou Lisa M. and Richard Z., 2008 Lin Rapamycin and mTOR kinase inhibitors *J Chem Biol.* Nov; 1(1-4): 27–36.
- Banáth, J.P., et al., 2001. Overnight lysis improves the efficiency of detection of DNA damage in the alkaline Comet assay. *Radiation research*, 155(4), pp.564–71.
- Barron, M.G., Lilavois, C.R., Martin, T.M., 2015. MOAtox: A comprehensive mode of action and acute aquatic toxicity database for predictive model development. *Aquatic Toxicology* 161, 102-7.
- Beaudon, E., Gabrielli, P., Sierra Hernandez, R.M., Wegner, A., Thompson, L.G., 2017. Central Tibetan Plateau atmospheric trace metals contamination: a 500-year record from the Puruogangri ice core. Submitted to *Sci. Total Environ.*
- Berenbaum M.C., 1985. The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J. Theor. Biol.* 114, 413–431.
- Bernabò P., Tebaldi T., Groen E.J.N., Lane F.M., Perenthaler E., Mattedi F., Newbery H.J., Zhou H., Zuccotti P., Potrich V., Shorrock H.K., Muntoni F., Quattrone A., Gillingwater T.H., Viero G., 2017. In Vivo Translatome Profiling in Spinal Muscular Atrophy Reveals a Role for SMN Protein in Ribosome Biology. *Cell Rep.* Oct 24;21(4):953-965.
- Betteridge DJ., 2000 . What is oxidative stress? *Metabolism.* 49:3-8.
- Biestinger K.E., 2016. Natl Water Qual Lab, Interim Rep No ROAP 16AAK, Task 06: 5 (1973) as cited in the ECOTOX database. Available from, as of June 16, 2016: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>
- Binelli A., Parolini M., Pedriali A., Provini A., 2011. Antioxidant activity in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in response to triclosan exposure. *Water Air Soil Poll.* 217: 421-430.
- Bliss C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26, 585-615.
- Boehncke, A. et al., 2003. Concise International Chemical Assessment Document 48: 4-Chloroaniline. World Health Organization, pp.1–68.
- Bolong, N. et al., 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 238(1–3), pp.229–246. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>.
- Borruso L., Harms K., Johnsen P.J., Nielsen K.M., Brusetti L., 2016. Distribution of class 1 integrons in a highly impacted catchment. *Sci Total Environ.* 2016 Oct 1;566-567:1588-1594.
- Bovero, S., Sotgiu, G., Angelini, C., Doglio, S., Gazzaniga, E., Cunningham, A.A., Garner, T.W.J., 2008. Detection of chytridiomycosis caused by *Batrachochytrium dendrobatidis* in the endangered sardinian newt (*Euproctus platycephalus*) in Southern Sardinia, Italy. *J. Wildlife Dis.* 44: 712-715.
- Boyle, D. G., Boyle, D. B., Olsen, V., Morgan, J. a T., & Hyatt, a D., 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60(2), 141-148. <http://doi.org/10.3354/dao060141>.
- Bradford MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.

- Brooks, D.S., Vishal, K., Kawakami, J., Bouyain, S., Geisbrecht, E. R., 2016. Optimization of wrMTrck to monitor *Drosophila* larval locomotor activity. *Journal of Insect Physiology* 93, 11-17.
- Brun, G.L. et al., 2006. Pharmaceutically active compounds in Atlantic Canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25(8), pp.2163–2176. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1897/05-426R.1> [Accessed April 12, 2016].
- Buffagni A., Erba S., 2007. Intercalibrazione e classificazione di qualità ecologica dei fiumi per la 2000/60/ec (wfd): l'Indice Star_icmi CNR-IRSA, Brughiero (MI).
- Bundschuh Mirco, et al., 2016. Mitigation of fungicide pollution in detention ponds and vegetated ditches within a vine-growing area in Germany. *Ecological Engineering* 89: 121-130.
- Burns E.E., Thomas-Oates J., Kolpin D.W., Furlong E.T., Boxall A.B.A., 2017. Are Exposure Predictions, Used For The Prioritization Of Pharmaceuticals In The Environment, Fit For Purpose? *Environmental Toxicology and Chemistry*. 36: 2823–2832.
- Campaioli, S. et al., 1994. Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane Volume I., Provincia Autonoma di Trento.
- Campaioli, S. et al., 1999. Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane Volume II. P. A. di Trento.
- Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life – Chlopyrifos. 2008
- Caruso-Neves, C., Lopes, A.G., 2000. Sodium pumps in the malpighian tubule of *Rhodnius* sp. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 72, 407-412.
- Castiglioni S., Bagnati R., Calamari D., Fanelli R., Zuccato E., 2005. A multi residue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewater. *Journal of Chromatography A* 1092, 206-215.
- Castiglioni S., Zuccato E., Crisci E., Chiabrando C., Fanelli R., Bagnati R., 2006. Identification and measurement of illicit drugs and their metabolites in urban wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 78, 8421-8429.
- Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Calamari, D.; Fanelli, R.; Zuccato, E., 2005. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and HPLC-MS-MS to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban waste waters. *Journal of Chromatography A* 1092, 206-215.
- Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Fanelli, R.; Pomati, F., Calamari, D.; Zuccato, E., 2006. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environ. Sci. Technol.* 40, 357-363.
- Chapman, P.M., 2016. Toxicity delayed in cold freshwaters? *Journal of Great Lakes Research* 42, 286-289.
- Chapman, P.M., Riddle, M.J., 2005. Toxic effects of contaminants in polar marine environments. *Environ. Sci. Technol.* 39, 200A–206A.
- Chen, J., Ki, C. A., Gee, N. A., Ahmed, M. I., Duleba, A. J., Zhao, L., Lasley, B. L., 2008a. Triclocarban enhances testosterone action: A new type of endocrine disruptor? *Endocrinology*, 149(3), 1173–1179. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1057>

- Chen, J., Ki, C. A., Gee, N. A., Ahmed, M. I., Duleba, A. J., Zhao, L., ... Lasley, B. L., 2008b. Triclocarban enhances testosterone action: A new type of endocrine disruptor? *Endocrinology*, 149(3), 1173–1179. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1057>
- Chen, L.L., Fu, X., Zhang, G., Zeng, Y., Ren, Z., 2013. Influences of temperature, pH and turbidity on the behavioural responses of *Daphnia magna* and Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) in the biomonitor. *Procedia Environ. Sci.* 13: 80-86.
- Chiogna, G., Santoni, E., Camin, F., Tonon, A., Majone, B., Trenti, A., & Bellin, A., 2014. Stable isotope characterization of the Vermigliana catchment. *Journal of Hydrology*, 509, 295–305. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2013.11.052>
- Chou T.C. and Martin N., 2005. CompuSyn for drug combinations: PC software and user's guide: A computer program for quantification of synergism and antagonism in drug combinations and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values, ComboSyn Inc., Paramus, NJ.
- Chou T.C. and Talalay P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 27-55.
- Chou T.C., 1976. Derivation and properties of Michaelis-Menten type and Hill type equations for reference ligands, *Journal of Theoretical Biology*, 59, 253-254.
- Chou T.C., 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies, *Pharmacological Review*, 58, 621-681.
- Cleuvers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 142(3), pp.185–194.
- Clotfelter, E.D., Bell, A.M., Levering, K.R., 2004. The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. *Animal Behaviour* 68, 665-676.
- Colwill, R.M., Creton R., 2011. Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae. *Reviews in the Neurosciences* 22, 63–73.
- D. Lgs. 3 aprile 2006, n.152, Norme in materia ambientale. Suppl. ord. n. 96 alla G. U. n. 96 del 14/04/2006.
- Dadd, R.H., Kleinjan, J.E., 1979. Essential fatty acid for the mosquito *Culex pipiens*: arachidonic acid. *Journal of Insect Physiology* 25, 495-502.
- Dalle-Donne I., Aldini G., Carini M., Colombo R., Rossi R., Milzani A., 2006. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 10:389-406.
- Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329: 23-38.
- De Lange H.J., Noordoven W., Murkc A.J., Lurling M., Peeters E.T.H.M., 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 78: 209–216.
- De Liguoro, M. et al., 2009. The toxicity of sulfamethazine to *Daphnia magna* and its additivity to other veterinary sulfonamides and Trimethoprim. *Chemosphere*, 75(11), pp.1519–1524. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.002>.
- Di Nica V., Villa S., Finizio A., 2017. Toxicity of individual pharmaceuticals and their mixtures to *Aliivibrio fischeri*: experimental results for single compounds and considerations of their mechanisms of action and potential acute effects on aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 36: 807–814.

- Dimitrov, S.D. et al., 2003. Bioconcentration potential predictions based on molecular attributes - an early warning approach for chemicals found in humans, birds, fish and wildlife. *QSAR & Combinatorial Science*, 22(1), pp.58–68. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/qsar.200390005> [Accessed April 24, 2016].
- DIN EN ISO 11348-3, 2007. Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) Method using liquid-dried bacteria.
- Diolaiuti, G., Senese, A., Mosconi, B., D'Agata, C., Mihalcea, C., & Smiraglia, C., 2010. Protezione glaciale, 54–63. Retrieved from http://www.meteotrentino.it/neve-ghiacci/ghiacciai/presena_neveval.pdf?id=224
- Dong Y., Wang J., Ding L., Liu Y., 2013. Influence of cosolvents on low water-solubility chemicals to *Photobacterium phosphoreum* in acute toxicity test. *Procedia EnvironSci* 18:143–148. DOI:10.1016/j.proenv.2013.04.019 37.
- EC, European Commission, 2000. Establishing a framework for community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities*, L327, pp. 1-71.
- EC, European Commission, 2002. Guidance document on aquatic ecotoxicology in the context of the directive 91/414/EEC, Rep. No. Sanco/3268/2001 rev.4 (final). Brussels, Belgium.
- EC, European Commission, 2003. Technical Guidance Document (TGD) on Risk Assessment of Chemical Substances, second ed. European Chemical Bureau, Joint Research Centre, EUR20418EN/2.
- EC, European Commission, 2006. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC and 2000/21/EC. OJ L396/1, 30 December 2006.
- EMA, 2006. European Medicine Agency, CHMP Committee for Medicinal Products For Human Use. Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00 corr 1, June, European Medicine Agency, EMA, London, UK.
- Enoch S.J., Hewitt M., Cronin M.T.D., Azam S., Madden J.C., 2008. Classification of chemicals according to mechanism of aquatic toxicity: An evaluation of the implementation of the Verhaar scheme in Toxtree. *Chemosphere* 73, 243–248.
- EPA, U. S. E. P. A. (2013). National rivers and streams assessment 2008-2009: a collaborative survey. EPA/841/D-13/001.
- EPA, U.S. Environmental Protection Agency, 2002. TCC Consortium.
- European Commission, E.: Decision 2002/657/EC, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002.
- Farré, M.L.; García, M.J., Tirapu, L., Ginebreda, A., Barceló, D., 2001. Wastewater toxicity screening of non-ionic surfactants by Toxalert® and Microtox® bioluminescence inhibition assays. *Anal. Chim. Acta*. 427: 181–189.
- Ferrario C. Finizio A., Villa S., 2017. Legacy and emerging contaminants in meltwater of three Alpine glaciers *Science of the Total Environment* 574: 350–357

- Ficetola, G. F., Valentini, A., Miaud, C., Noferini, A., Mazzotti, S., & Dejean, T., 2011. *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians from the Po River Delta, Northern Italy. *Acta Herpetologica*, 6(2), 297–302.
- Finizio, A., Calliera, M., Vighi, M., 2001. Rating systems for pesticide risk classification on different ecosystem. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49, 262–274.
- FORum for the Co-ordination of pesticide fate models and their Use. <http://esdac.jrc.ec.europa.eu/projects/focus-dg-sante>.
- Fridman J and Lowe, 1997. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003 22, 9030–9040.
- Garner, T.W.J., Pearman, P.B., Cunningham, A.A. Fisher, M.C., 2004. Population genetics and disease threats across the entire range of *Rana latastei*. In: V° congresso Nazionale della Societas Herpetologica Italica, 29 settembre-3 ottobre 2004. Abstract book, p. 62. Zuffi, M.A.L., Ed, Calci (Pisa).
- Gassner, D., Komnick, H., 1982. The loop diuretic furosemide as a non-competitive inhibitor of Cl-/HCO₃-ATPases of vertebrate kidneys and insect rectum. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative* 71, 43-48.
- Gerhardt A, 1995. Monitoring behavioral responses to and effects of metals in *Gammarus pulex* (Crustacea) with impedance conversion. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2: 15-23.
- Gerhardt, A., 2007. Aquatic Behavioral Ecotoxicology—Prospects and Limitations, *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 13, 481-491.
- Gledhill W.E., 1975. Biodegradation of 3,4,4-trichlorocarbanilide, TCC, in sewage and activated sludge. *Water Research*, 9(7), pp.649–654. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0043135475901712> [Accessed April 24, 2016].
- Gordon, E. B., Captan and Folpet; *Handbook of Pesticide Toxicology: Volume 2, Agents*, Kreiger, R., Ed.; 2nd ed. Academic Press, Inc.: San Diego, California, 2001; pp. 1711-1742
- Grossi G., Caronna P. and Ranzi R., 2013. "Hydrologic vulnerability to climate change of the Mandrone glacier (Adamello-Presanella group, Italian Alps)." *Advances in Water Resources* 55: 190-203.
- Grützner, I., 1995. Influence of Musk Ketone on the Reproduction of *Daphnia magna* (Report to RIFM. RCC).
- Guillén D., Ginebreda A., Farré M., Darbra R.M., Petrovic M., Gros M., Barceló D. 2012. Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on risk assessment: Analytical, modeling and regulatory perspective. *Sci Total Environ.* 440: 236–252.
- Habig C. and Di Giulio, R.T., 1991. Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. In: P. Mineau (Editor). *Cholinesterase-inhibiting Insecticides*. Elsevier, Amsterdam, pp. 19-33.
- Häde D.P., Erzinger, G.S., 2017b. Arsenic Pollution Measured with an online Monitoring System using *Daphnia*. *Open J. Environ. Biol.* 1: 027-034.
- Häder D.P., Erzinger, G.S., 2017a. Daphniatox – Online monitoring of aquatic pollution and toxic substances. *Chemosphere.* 167: 228-235.
- Hammer Ø, Harper D.A.T., Ryan P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 9 pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

- Hellou, J., 2011. Behavioural ecotoxicology, an "early warning" signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research* 18, 1–11.
- Hernando M.D., Mezcuca M., Fernandez-Alba A.R., Barcelo D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69, 334–342.
- Hinchcliff, K.W. et al., 2015. Exercise Induced Pulmonary Hemorrhage in Horses: American College of Veterinary Internal Medicine Consensus Statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(3), pp.743–758. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/jvim.12593> [Accessed April 23, 2016].
- Holdway, D.A., 2005. *Hydra* population reproduction toxicity test method. *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations: Volume 1 - Toxicity Test Methods*, 1, pp.395–411.
- Hongve, Dag. "A revised procedure for discharge measurement by means of the salt dilution method." *Hydrological Processes* 1.3 (1987): 267-270.
- Huggett, D. B., and K. I. Stoddard., 2011. "Effects of the artificial sweetener sucralose on *Daphnia magna* and *Americamysis bahia* survival, growth and reproduction." *Food and chemical toxicology* 49.10: 2575-2579.
- Huovinen, P., 2001. Resistance to Trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases*, 32(11), pp.1608–1614.
- Ilg C. & Castella E., 2006. Patterns of macroinvertebrate traits along three glacial stream continuums. *Freshwater Biology*, 51, 840–853.
- Infantino A., Morselli M., Di Guardo A., 2013. Integration of a dynamic organism model into the DynA Model: development and application to the case of DDT in Lake Maggiore, Italy. *Science of The Total Environment*, 454–455: 358–65.
- IRSA-CNR, A. P. A. T. "Metodi analitici per le acque. Manuali e Linee guida. 29/2003." (2003).
- ISPAT. Istituto di statistica della Provincia di Trento. http://antepime.provincia.tn.it/pat_statistica_new/dati_online/.
- ISPRA, 2013. Metodi biologici per le acque superficiali interne. Manuali e linee guida 111/2014.
- ISTISAN 16/3, 2016. Selezione di indicatori nella valutazione della salute degli ecosistemi acquatici. Roma: Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN 16/3).
- Jeong, J.H., Kim, J.H., Lee, B.C., Kim, S.D., 2008. Development of a new biomonitoring method to detect the abnormal activity of *Daphnia magna* using automated grid counter device. *Sci. Total Environ.* 389: 545-556.
- Jeong, T.Y., Jeon, J., Kim, S.D., 2014. Development and evaluation of new behavioral indexes for a biological early warning system using *Daphnia magna*. *Drink. Water Eng. Sci.* 7: 1-9.
- Jesus T., 2008. Ecological, anatomical and physiological traits of benthic macroinvertebrates: Their use on the health characterization of freshwater ecosystems *Limnetica* 27, 79-92.
- Kamrin Michael A., 1997 *Pesticide profiles: toxicity, environmental impact, and fate.* CRC press.
- Kaul S, 1993. The importance of biotope mapping for nature conservation in India. In (Tripathi A.K., Srivastava AK., Pandey S.N. eds) *Advances in Environmental sciences.* Ashish Publishing House, New Delhi.

- Kersting K, van Wijngaarden R (1992) Effects of chlorpyrifos on a microecosystem. *Environ Toxicol Chem* 11:365–372.
- Kim Y., Choi K., Jung J., Park S., Kim P-G., Park J., 2007. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International* 33: 370–375.
- Kim, C.K., Kwak, I.S., Cha, E.Y., Chon, T.S., 2006. Implementation of wavelets and artificial neural networks to detection of toxic response behaviour of chironomids (Chironomidae: Diptera) for water quality monitoring. *Ecological Modelling* 195, 61- 71.
- Kim, J.W. et al., 2009. Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *The Journal of toxicological sciences*, 34(2), pp.227–232. Available at: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jts/34.227?from=CrossRef> [Accessed April 12, 2016].
- Knoll/BASF, 1995. Pharmaceutical safety data sheet Ibuprofen (Issue/Revision 06/04/94).
- Koçbaşı F., Oral R., 2015. *Daphnia magna* as a test species for toxicity evaluation of municipal wastewater treatment plant effluents on freshwater cladoceran in Turkey. *Turk. J. Fish Aquat. Sci.* 15: 619-624.
- Kortenkamp, A., Backhaus, T., Faust, M., 2009. State of the art report on mixture toxicity. Final report to the European Commission. Contract no. 070307/2007/485103/ETU/D.1.
- Lagesson A., J. Fahlman, T. Brodin, J. Fick, M. Jonsson, P. Byström, J. Klaminder, 2016. Bioaccumulation of five pharmaceuticals at multiple trophic levels in an aquatic food web - Insights from a field experiment. *Science of The Total Environment*, 568: 208-215.
- Lee, S.E. et al., 2006. Proteomic evaluation of cadmium toxicity on the midge *Chironomus riparius* Meigen larvae. *Proteomics*, 6(3), pp.945–957. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200401349> [Accessed May 19, 2016].
- Lencioni V., 2018. Glacial influence and macroinvertebrate biodiversity under climate change: lesson from the Southern Alps. *Sci. Total Environ.* 622-623: 563-575.
- Lencioni V., 2018. Glacial influence and macroinvertebrate biodiversity under climate change: lessons from the Southern Alps. *Sci. Total Environ.* 622e623, 563-575.
- Lencioni V., Bernabò P., Cesari M. & Rebecchi L., 2013. Thermal stress induces HSP70 proteins synthesis in larvae of the cold stream non-biting midge *Diamesa cinerella* Meigen. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 83(1): 1-14.
- Lencioni V., Bernabò P., Jousson O. & Guella G., 2015. Cold adaptive potential of chironomids overwintering in a glacial stream. *Physiological Entomology* 40; 43–53.
- Lencioni V., Grazioli, V., Rossaro, B., Bernabò, P., 2016. Gene expression profiling of responses induced by pesticides employed in organic agriculture in a wild population of the midge *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment* 557–558, 183–191.
- Lencioni V., Maiolini B. & Margoni S., 2002 -Il limite altitudinale di applicazione degli Indici I.B.E. (Indice Biotico Esteso) e I.F.F. (Indice di Funzionalità Fluviale) in due sistemi fluviali Alpini (Amola e Cornisello, Trentino). *Studi Trentini Scienze Naturali, Acta Biologica*, 78 (1): 81-90

- Lencioni V., Marziali L., Rossaro B., 2007. I ditteri Chironomidi: morfologia, tassonomia, ecologia, fisiologia e zoogeografia. Quaderni del Museo Tridentino di Scienze Naturali, 1: 1-172.
- Lencioni V., Marziali L., Rossaro B., 2012. Chironomids as bioindicators of environmental quality in mountain springs. *Freshw. Sci.* 31, 525-541.
- Lencioni V., Marziali L., Rossaro B., 2012. Chironomids as bioindicators of environmental quality in mountain springs. *Freshwater Science*, 31, 525-541.
- Lencioni Valeria, and Bruno Rossaro., 2005 Microdistribution of chironomids (Diptera: Chironomidae) in Alpine streams: an autoecological perspective. *Hydrobiologia* 533.1-3: 61-76.
- Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186: 464-78.
- Li P., Zhou L., Zhao T., Liu X., Zhang P., Liu Y., Zheng X., Li Q., 2017. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*. Apr 4;8(14):23996-24008.
- Little E.E., Brewer S.K., 2001. Neurobehavioral toxicity in fish. Reference to a chapter in an edited book: Schlenk, D., Benson, W.H., 2001. Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts New Perspectives. In: Taylor and Francis, (Eds.), Toxicity and the Environment, vol. 2, London and New York, pp. 139–174.
- Loewe S., Muischne K.H., 1926. Effect of combinations: Mathematical basis of problem. *N-S Arch Exp Pathol Physiol* 114:313–326.
- Loos R., Gawlik B.M., Boettcher K., Locoro G., Contini G., Bidoglio G., 2009. Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry method. *Journal of Chromatography A* Volume 1216, Issue 7: 1126–1131
- Lucentini L., Rebora M., Puletti M. E., Gigliarelli L., Fontaneto D., Gaino E., & Panara F., 2011. Geographical and seasonal evidence of cryptic diversity in the *Baetis rhodani* complex (Ephemeroptera, Baetidae) revealed by means of DNA taxonomy. *Hydrobiologia*, 673(1), 215–228. <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0778-1>.
- MacDonald D.D., Ingersoll C.G. & Berger T.A., 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 39: 20–31
- Maddrell, S.H.P., O'Donnell, M.J., 1992. Insect Malpighian tubule: V-ATPase action in ion and fluid transport. *Journal of Experimental Biology* 172, 417-429.
- Maiolini B., Lencioni V., 2001. Longitudinal distribution of macroinvertebrate assemblages in a glacially influenced stream system in the Italian Alps. *Fresh. Biol.*, 46: 1625-1641.
- Maiolini B., & Lencioni V., 2002. Torrenti montani - La fauna ad invertebrati. In Quaderni Habitat (pp. 57–79). Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio Museo Friulano di Storia Naturale - Comune di Udine.
- Majone Bruno, et al., 2016. Impact of climate change and water use policies on hydropower potential in the south-eastern Alpine region. *Science of the Total Environment* 543 (2016): 965-980.
- Maltby L., Blake N., Brock T.C.M., Van Den Brink P.J., 2005. Insecticide species sensitivity distributions: Importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 379–388.

- Mandaric L., Diamantini E., Stella, E., Cano-Paoli K., Valle-Sistac J, Molins-Delgado D., Bellin A., Chiogna G., Majone B., Diaz-Cruz M.S., Sabater S., Barcelo D., Petrovic M., 2017. Contamination sources and distribution patterns of pharmaceuticals and personal care products in Alpine rivers strongly affected by tourism. *Science of the Total Environment* 590–591, 484–494.
- Marchini S., Passerini L., Cesareo D., Tosato M.M., 1988. Herbicidal triazines: acute toxicity on *Daphnia*, fish, and plants and analysis of its relationships with structural factors. *Ecotox. Environ. Safe.* 16, 148–157.
- Marcogliese D. J., King K. C., Salo H. M., Fournier M., Brousseau P., Spear P., Champoux L., McLaughlin J. D. and Boily M., 2009. Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Aquat. Toxicol. (Amsterdam)* 91, 126–134
- Marnett L. J., 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 424, 83–95.
- Massey AJ., 2015. Multiparametric Cell Cycle Analysis Using the Operetta High-Content Imager and Harmony Software with PhenoLOGIC. *PLoS One.* Jul 28;10(7).
- Masur H. et al., 2014. Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents: Updated Guidelines From the Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health, and HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Soc. *Clinical Infectious Diseases*, 58(9), pp.1308–1311.
- Mayer F.L.L., Eilersieck M.R.M.R., 1986. Resource Publication Fish and Wildlife Service US Department of Interior Washington DC.
- McKim J.M., Bradbury S.P., Niemi G.J., 1987. Fish acute toxicity syndromes and their use in the QSAR approach to hazard assessment. *Environ Health Perspect.* Apr;71:171-86. Review. PubMed PMID: 3297660; PubMed Central PMCID: PMC1474360.
- McKim J.M., Bradbury S.P., Nieme G.J., 1987. Fish acute toxicity syndromes and their use in the QSAR approach to hazard assessment. *Environmental Health Perspectives* 71, 171–186.
- Metcalf and Eddy, 2003. *Wastewater Engineering, Treatment and Reuse*, 4th edition, McGraw-Hill, New York.
- Moog O., 2002: *Fauna Aquatica Austriaca*. Edition 2002. Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium f. Land- u. Forstwirtschaft, Wien.
- Morselli M., Semplice M., Villa S., Di Guardo A., 2014. Evaluating the temporal variability of concentrations of POPs in a glacier-fed stream food chain using a combined modeling approach. *Science of the Total Environment*, 493: 571–579.
- Morselli M., Vitale, C.M., Ippolito A., Villa S., Giacchini R., Vighi M., Di Guardo A., 2017. Predicting pesticide fate in small cultivated mountain watersheds using the integrated DynAPlus model: towards improved assessment of peak exposure. *Science of The Total Environment* 615, 307–318.
- Movahedian H., Bina B. & Asghari G.H., 2005. Toxicity Evaluation of Wastewater Treatment Plant Effluents Using *Daphnia magna*. *Iranian Journal of Environmental Health, Science and Engineering* 2, pp. 1-4.
- Mylonas C & Kouretas D., 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo.* 13: 295–309.

- Nath B.B. and Gharpure D.C., 2015. A novel computational approach of image analysis to quantify behavioural response to heat shock in *Chironomus ramosus* larvae (Diptera: Chironomidae). *European Journal of Environmental Sciences* 5, 57-61.
- Niedrist G.H., Füreder L., 2016. Towards a definition of environmental niches in alpine streams by employing chironomid species preferences. *Hydrobiologia*. 781: 143–160.
- Nolen G.A. & Dierckman T.A., 1979. Reproduction and teratogenic studies of a 2:1 mixture of 3,4,4'-trichlorocarbanilide and 3-trifluoromethyl-4,4'-dichlorocarbanilide in rats and rabbits. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 51(3), pp.417–425.
- OECD, 2000. Series on Testing and Assessment No. 23. Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environment Directorate, Organisation For Economic Co-Operation And Development, Paris. ENV/JM/MONO(2000)6.
- Olive P.L. & Banath, J.P., 2006. The Comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protocols*, 1(1), pp.23–29.
- Orsi M., et al., 2011. Dual-resolution molecular dynamics simulation of antimicrobials in biomembranes. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 8(59), pp.826–841.
- Ort C., Lawrence M.G., Rieckermann J., Joss A., 2010. Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems: Are your conclusions valid? A critical review. *Environ Sci Technol*. 44: 6024–6035.
- Ortiz de Garcia, S.A., Pinto Pinto, G., Garcia-Encina, P.A., Irusta-Mata, R., 2014. Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants. *Ecotoxicology*. 23, 1517-1533.
- Park S. & Choi, K., 2008. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*, 17(6), pp.526–538.
- Pascoe D., et al., 2003. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*, 51(6), pp.521–528.
- Perin G., 2004. Ecotossicologia - CAP.IX - ED.27/03/2004 - Previsione Degli Effetti.
- Petersen R. C. and Cummins K. W., 1974. Leaf processing in a woodland stream. *Fresh- water Biol*. 4, 343-368.
- Pfankuch D. J., 1975. Stream reach inventory and channel stability evaluation. United States Department of Agriculture Forest Service, Region 1, Missoula, Montana, USA.
- Pounds N. et al., 2008. Acute and chronic effects of Ibuprofen in the mollusc *Planorbis carinatus* (Gastropoda: Planorbidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(1), pp.47–52.
- Price P., Han X., Junghans M., Kunz P., Watts C., Leverett D., 2012. An application of a decision tree for assessing effects from exposures to multiple substances to the assessment of human and ecological effects from combined exposures to chemicals observed in surface waters and waste water effluents. *Environ. Sci. Eur*. 24, 1–13.
- Puzyn, T. et al., 2008. How do the partitioning properties of polyhalogenated POPs change when chlorine is replaced with bromine? *Environmental Science and Technology*, 42(14), pp.5189–5195.

- Quinn B. et al., 2008. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of the Total Environment*, 389(2–3), pp.306–314.
- R Core Team., 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <http://www.R-project.org/>.
- Reid G., McG Mac Beath, T., Contreras C.K., 2013. Global challenges in freshwater-fish conservation related to public aquariums and the aquarium industry. *Int. Zoo Yb.* 47: 6-45.
- Rico A., Van Den Brink P.J., 2015. Evaluating aquatic invertebrate vulnerability to insecticides based on intrinsic sensitivity, biological traits, and toxic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 34: 1907-1917.
- Riva F., Zuccato E., Castiglioni S., 2015. Prioritization and analysis of pharmaceuticals for human use contaminating the aquatic ecosystem in Italy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 106, 71-78.
- Rodea-Palomares I., Petre A.L., Boltes K., Leganés F., Perdígón-Melón J.A., Rosal R., Fernández-Piñas F., 2010. Application of the combination index (CI)-isobologram equation to study the toxicological interactions of lipid regulators in two aquatic bioluminescent organisms, *Water Research*, 44, 427-438.
- Rodríguez-Álvarez T., Racamonde I., González-Mariño I., Borsotti A., Rodil R., Rodríguez I., Zuccato E., Quintana JB., Castiglioni S., 2015. Alcohol and cocaine co-consumption in two European cities assessed by wastewater analysis. *Sci Total Environ.* 536, 91-98.
- Rossaro B., Lencioni V., 2015. A key to larvae of species belonging to the genus *Diamesa* from Alps and Apennines (Italy). *Eur. J. Environ. Sci.* 5:62–79.
- Ruhí V., Acuña D., Barceló B., Huerta J.-R., Mor S., Rodríguez-Mozaz S., Sabater, 2016. Bioaccumulation and trophic magnification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in a Mediterranean river food web. *Science of the Total Environment*, 540: 250-259.
- Sandbacka M., Christianson I., Isomaa B., 2000. The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish-a comparative study. *Toxicol. in Vitro* 14, 61–68.
- Sansoni G., 1988. Atlante per il riconoscimento dei macroinvertebrati bentonici dei corsi d'acqua italiani. Provincia Autonoma di Trento, 191 pp.
- Santa-Gonzalez G.A., Gomez-Molina A., Arcos-Burgos M., Meyer J.N., Camargo M., 2016. Distinctive adaptive response to repeated exposure to hydrogen peroxide associated with upregulation of DNA repair genes and cell cycle arrest. *Redox Biol.* 9:124–133.
- Schimmel S.C., Garnas R.L., Patrick J.M., Moore J.C., 1983. Acute toxicity, bioconcentration, and persistence of AC 222,705, benthocarb, chlorpyrifos, fenvalerate, methyl parathion, and permethrin in the estuarine environment. *J Agric Food Chem* 31:104–113.
- Schindelin J. et al., 2015. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development*, 82(7–8), pp.518–529. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/mrd.22489> [Accessed April 10, 2016].

- Shannon C. E. and W. Weaver, 1949. The Mathematical Theory of Information (University of Illinois Press, Urbana, IL).
- Sies H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 30: 31S-38S.
- Simpson, E.H., 1949. Measurement of Diversity. *Nature* 163: 688, 1949.
- Sloman, K.A., McNeil P.L., 2012. Using physiology and behaviour to understand the responses of fish early life stages to toxicants. *Journal of Fish Biology* 81, 2175–2198.
- Smiraglia C., and Diolaiuti G., 2015) Il Nuovo Catasto dei Ghiacciai Italiani.
- Spiteller G., 2006. Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic Biol Med.* 41:362-87.
- Sprague J.B., 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Res* 4, 3–32. 48, 171–179.
- Stagni G., Dall'Olio R., Fusini U., Mazzotti S., Scozzianti C., & Serra A., 2004. Declining populations of apennine yellow-bellied toad *Bombina pachypus* in the northern apennines (Italy): Is *Batrachochytrium dendrobatidis* the main cause? *Italian Journal of Zoology*, 71(SUPPL.2), 151–154. <http://doi.org/10.1080/11250000409356625>.
- Stagni G., Scozzianti C., & Fusini R., 2002. Segnalazione di chytridiomicosi in popolazioni di *Bombina pachypus* (Anura, Bombinatoridae) dell'Appennino toscoemiliano. Abstracts IV.
- Stolte S., Steudte S., Helge N., Willenberg I., & Stepnowski P., 2013. Ecotoxicity of artificial sweeteners and stevioside, 60, 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.08.010>
- Sui Q., Huang J., Deng S., Chen W., Yu G., 2011. Seasonal variation in the occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products in different biological wastewater treatment processes. *Environ. Sci. Technol.* 45:3341–3348.
- Sullivan S. & Hinchcliff K., 2015. Update on Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 31(1), pp.187–198.
- Tachet H., Richoux P., Bournard M., and Usseglio-Polatera P., 2010. Invertébrés D'eau Douce: Systématique, Biologie, Écologie. CNRS Éditions, Paris.
- Tamura I. et al., 2013. Ecotoxicity and screening level ecotoxicological risk assessment of five antimicrobial agents: Triclosan, Triclocarban, resorcinol, phenoxyethanol and p-thymol. *Journal of Applied Toxicology*, 33(11), pp.1222–1229.
- Teodorović I., Bečelić M., Planojević I., Ivančev-Tumbas I. & Dalmacija B., 2009. The relationship between whole effluent toxicity (WET) and chemical-based effluent quality assessment in Vojvodina (Serbia), *Environmental Monitoring and Assessment* 158, pp. 381-392.
- Tessa G., Angelini C., Bielby J., Bovero S., Giacoma C., Sotgiu G., & Garner T. W. J., 2013. The pandemic pathogen of amphibians, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Phylum Chytridiomycota), in Italy. *Italian Journal of Zoology*, 80(1), 1–11. <http://doi.org/10.1080/11250003.2012.753473>
- Tia S. et al., 1996. Developmental changes of inhibitory synaptic currents in cerebellar granule neurons: role of GABA(A) receptor alpha 6 subunit. *The Journal of*

- neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 16(11), pp.3630–3640.
- Tomlin C. D. S., 2000. The Pesticide Manual: A World Compendium, 12th ed.; Ed.; British Crop Protection Council: Farnham, UK, pp 132-133.
- Topisirovic I., Sonenberg N., 2011. mRNA translation and energy metabolism in cancer: the role of the MAPK and mTORC1 pathways. Cold Spring Harb Symp Quant Biol;76:355-67.
- Tremolada P., Finizio A., Villa S., Gaggi C., Vighi M., 2004. Quantitative inter-specific chemical activity relationships of pesticides in the aquatic environment. Aquat. Toxicol. 67, 87-103.
- Trenti, A., 2011. Ghiacciaio Presena Occidentale programma Sperimentale Sintesi attività e risultati, (settembre). Retrieved from http://www.meteotrentino.it/neve-ghiacci/ghiacciai/presena_sintesi_attività_risultati.pdf?id=221
- Uchida K., 2000. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. Free Radic Biol Med 28, 1685-96.
- Uglietti C., Gabrielli P., Olesik J.W., Lutton A., Thompson L.G., 2014. Large variability of trace element mass fractions determined by ICP-SFMS in ice core samples from worldwide high altitude glaciers. Appl. Geochem. 47, 109-121.
- Untersteiner H., Kahapka J., Kaiser H., 2003. Behavioural response of the cladoceran *Daphnia magna* STRAUS to sublethal copper stress - validation by image analysis. Aquat. Toxicol. 65: 435-442.
- US-EPA, 1998. Method 7473 (SW-846). Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrophotometry. Revision 0. US Environmental Protection Agency
- US-EPA, 2014. Sediment sampling. p. 23
- USEPA/Office of Pesticide Programs; Risks of Metolachlor Use to Federally Threatened California Red-legged Frog (*Rana aurora draytonii*). p.55 Identification Number: EPA-HQ-OPP-2009-0081-0068 (July 2007). Available from, as of March 26, 2012: <http://www.regulations.gov/#!home>
- USEPA/OPP, EFED; Pesticide Ecotoxicity Database (2000) as cited in the ECOTOX database. Available from, as of February 9, 2012: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/> (Ward 1994)
- Van Gestel Cornelis A.M, Jonker Martijs J., Kammenga Jan E., Laskowski Ryszard, Svendsen Claus., 2011. Mixture toxicity : linking approaches from ecological and human toxicology. CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742.
- Van Rooij P., Martel A., Haesebrouck F., & Pasmans F., 2015. Amphibian chytridiomycosis: A review with focus on fungus-host interactions. Veterinary Research, 46(1), 1–22. <http://doi.org/10.1186/s13567-015-0266-0>.
- Vannini C.; Domingo G.; Marsoni M.; De Mattia F.; Labra M.; Castiglioni S.; Bracale M., 2011. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. Aquatic Toxicology. 10, 459-465.
- Verhaar H.J.M., Van Leeuwen C.J., Hermens J.L.M. 1992. Classifying environmental pollutants. 1: Structure-activity relationships for prediction of aquatic toxicity. Chemosphere. 25, 471-491.
- Verhaar H.J.M., Van Leeuwen C.J., Hermens J.L.M., 1992. Classifying environmental pollutants. Structure-activity relationships for prediction of aquatic toxicity. Chemosphere 25, 471–491.

- Viero G., Lunelli L., Passerini A., Bianchini P., Gilbert R.J., Bernabò P., Tebaldi T., Diaspro A., Pederzoli C., Quattrone A., 2015. Three distinct ribosome assemblies modulated by translation are the building blocks of polysomes. *J Cell Biol.* Mar 2;208(5):581-96.
- Vighi M., Migliorati S., Monti G.S., 2009. Toxicity on the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* (Beijerinck). I: QSAR equation for narcotics and polar narcotics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 154-161.
- Villa S., Assi L., Ippolito A., Bonfanti P., Finizio A., 2012. First evidences of the occurrence of polycyclic synthetic musk fragrances in surface water systems in Italy: Spatial and temporal trends in the Molgora River (Lombardia Region, Northern Italy). *Science of the Total Environment* 416: 137–141.
- Villa, S., Vighi, M., & Finizio, A., 2014. Theoretical and experimental evidences of medium range atmospheric transport processes of polycyclic musk fragrances. *Science of the Total Environment*, 481(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.017>
- Virág L., Robaszekiewicz A., Rodriguez-Vargas J.M., Oliver F.J., 2013. Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. *Mol Aspects Med.* Dec;34(6):1153-67.
- Ward J. V., 1994. Ecology of alpine streams. *Freshwater biology* 32.2: 277-294.
- Waringer J., Graf W., 2011. Atlas der mitteleuropäischen Kocherfliegenlarven – Atlas of Central European Trichoptera Larvae. Erik Mauch Verlag, 2011. ISBN 978-3-00-032177-1
- Warne M.St.J, Hawker D.W., 1995. The number of components in a mixture determines whether synergistic and antagonistic or additive toxicity predominate: The funnel hypothesis. *Ecotoxicol Environ Saf* 31:23–28.
- Wedepohl K.H., 1995. The composition of the continental crust. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 1217-1232.
- Wegmann F., Cavin L., MacLeod M., Scheringer M., Hungerbühler K., 2009. The OECD software tool for screening chemicals for persistence and long-range transport potential, *Environmental Modelling & Software*, 24(2): 228–237.
- Wiberg-Larsen, P., Graeber, D., Kristensen, E.A., Baattrup-Pedersen, A., Friberg, N., Rasmussen, J.J., 2016. Trait characteristics determine pyrethroid sensitivity in nonstandard test species of freshwater macroinvertebrates: a reality check. *Environ. Sci. Technol.* 50: 4971–4978.
- Wiklund, Ann-Kristin Eriksson, et al., 2012 Sucralose—An ecotoxicological challenger?. *Chemosphere* 86.: 50-55.
- Wogram, J., Liess, M., 2001. Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67: 360-367.
- Wolf, N.G., Swift, P.R., Carey, F.G., 1988. Swimming muscle helps warm the brain of lamnid sharks. *Journal of Comparative Physiology B* 157, 709–715.
- Wüthrich V., 1996. Influence of HHCB on the reproduction of *Daphnia magna*. Report to RIFM, RCC Umweltchemie AG Project 380687.
- Young L.B., Harvey H.H., 1991. Metal Concentrations in Chironomids in Relation to the Geochemical Characteristics of Surficial Sediments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 202-211.
- Yueh M.F. et al., 2012. Triclocarban mediates induction of xenobiotic metabolism through activation of the constitutive androstane receptor and the estrogen

receptor alpha V. D. Appanna, ed. PLoS ONE, 7(6), p.e37705. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0037705> [Accessed April 24, 2016].
Zuccato E., Chiabrando C., Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R., 2008. Estimating community drug abuse by wastewater analysis. *Environmental Health Perspectives* 116, 1027-1032.

Siti web:

<https://adep.provincia.tn.it/Impianti-di-depurazione-biologica>
<http://www.alpiorientali.it/>
<https://www.ladige.it/territori/non-sole/2016/04/11/cabinovia-presena-turismo-rispettoso>
<http://www.life-inhabit.it/cnr-irsa-activities/it/download/software/macropericmsoft/macropericm-software-download>
http://amphibiaweb.org/chytrid/swab_protocol.html
http://www.iucn.it/pdf/Comitato_IUCN_Lista_Rossa_dei_vertebrati_italiani.pdf

5 Riflessioni conclusive

Applicando gli indici di qualità previsti dalla normativa italiana relativa al monitoraggio delle acque correnti (IBE e STAR-ICMi), il Torrente Noce e i suoi tributari in alta quota sono classificabili “in stato ecologico buono-elevato”. Tuttavia le sue acque non sono pure, ma contaminate da farmaci, additivi alimentari, profumi, e molti altri principi attivi utilizzati per la cura della persona e l’igiene della casa (PPCPs) che la normativa non richiede di monitorare e di cui, di conseguenza, non sono state definite le concentrazioni limite. Si accumulano nelle acque reflue dei depuratori che non sono adeguati per il loro abbattimento, e il loro effetto, sia come singole molecole che in miscela, non è ancora noto a livello di ecosistema né se ne conosce l’effetto sull’uomo, ultimo bersaglio di inquinanti della cui presenza nell’ambiente, direttamente o indirettamente, lui stesso è responsabile. Lo dimostra l’origine di queste molecole, la cui presenza e concentrazione nei torrenti è strettamente correlata con il numero di abitanti residenti e turisti (per farmaci, droghe, e prodotti per la cura della persona) e al tipo di attività produttive (es. agricoltura per i fitofarmaci). La contaminazione da CE ha quindi una stagionalità molto chiara nelle valli alpine come l’Alta Val di Sole, con picchi in inverno tra Capodanno e Carnevale. Le concentrazioni massime misurate sono dell’ordine di ng/L, e, nei siti studiati, sono considerabili protettive per la comunità microbica e la fauna invertebrata. Lo sono perché non c’è un impatto cronico ma acuto, e le comunità riescono a recuperare nei periodi in cui la contaminazione è minima o assente. Per esempio a valle del depuratore del Tonale in inverno c’è una ricchezza di taxa inferiore rispetto a quella a monte, cosa che non si osserva in estate quando il tratto che riceve l’effluente del depuratore è meno contaminato.

Il progetto mette in evidenza anche una contaminazione da pesticidi (contaminanti di “vecchia generazione” come il chlorpyrifos nelle acque di fusione glaciale, veicolate dalle correnti atmosferiche ai ghiacciai, a media-lunga distanza fonti di emissione (dalle valli limitrofe coltivate alla Pianura Padana) e da metalli pesanti, di cui alcuni di origine antropica (es. l’antimonio, un semimetallo che viene usato come agente antifiama e per produrre vernici, smalti, ceramiche e gomme, nonché un’ampia gamma di leghe metalliche. Il suo rinvenimento può essere riconducibile a rottami metallici, armi e munizioni ma non si possono identificare separatamente da altre possibili cause come ad esempio lo sversamento accidentale moderno anche di modeste quantità di combustibili nel caso del sito Presena).

Nei vari tratti del torrente Noce sono presenti, nonostante i CE rinvenuti, le comunità di macroinvertebrati attese, tuttavia a valle dello scarico la ricchezza di specie si riduce in inverno quando il carico di nutrienti e CE è massimo (pur rimanendo, i singoli CE, presenti in tracce). I test di tossicità acuta, genotossicità, stress ossidativo e stress comportamentale hanno messo in evidenza che queste molecole, nelle concentrazioni in cui sono presenti in natura, non sono letali (altrimenti i torrenti sarebbero azoici) ma causano stress alle popolazioni più esposte, nei siti (es. a valle del depuratore) e nei periodi (in inverno) in cui la contaminazione dell’acqua è maggiore. In particolare i test di genotossicità hanno messo in evidenza segnali di stress fisiologico nelle popolazioni animali a valle dello scarico, specialmente in inverno. È stato dimostrato che concentrazioni giudicate di “salvaguardia” secondo l’ecotossicologia classica sono state in grado di indurre significative alterazioni comportamentali (es. inibizione della mobilità) negli insetti acquatici utilizzati come modello nei vari test. Le popolazioni a valle del depuratore accumulano più danni al DNA di quelle a monte in natura, e allo stesso

tempo sono più resistenti alla maggior parte dei tossici a cui sono state esposte in laboratorio, essendo già esposte a miscele di tossici in natura (e quindi avendo probabilmente già attivato meccanismi di difesa). Questo è particolarmente evidente in inverno, mentre in estate si trovano larve di una generazione successiva che compie il ciclo vitale in acque più pulite e che accumulano un “livello basale di danno” inferiore (questo vale per le specie presenti tutto l’anno e polivoltine).

I dati relativi alle analisi degli effetti comportamentali, seppur a concentrazioni sub-letali, hanno evidenziato che i cambiamenti indotti potrebbero avere delle conseguenze dirette sulla fitness delle popolazioni che popolano le aree direttamente impattate dagli effluenti dei depuratori, con effetti ancora non noti sulla catena trofica fluviale. La risposta all’esposizione ai diversi CE, in concentrazioni fino a milioni di volte rispetto a quella ambientale, è risultata essere: a) specie-specifica (più che dipendente dal ruolo trofico), con *Baetis alpinus* risultata la specie più sensibile, con più basso danno basale, che bioaccumula meno farmaci, e *D. cinerella* come specie con il più alto danno basale e più resistente a concentrazioni milioni di volte superiori a quelle ambientali; b) sito-specifica (popolazioni della specie hanno una diversa sensibilità a concentrazioni CE) e c) stagione-specifica (almeno in alta montagna dove l’impatto principale il turismo, ha una forte stagionalità). Proprio per l’elevata stagionalità della contaminazione da CE, a valle del depuratore di Passo Tonale possiamo parlare di una contaminazione acuta, non cronica, considerato che in estate molti dei farmaci presenti in inverno non sono stati trovati, per cui le comunità batteriche e animali hanno il tempo di recupero nell’arco dell’anno, possibile anche grazie alla breve durata del loro ciclo vitale rispetto a quella di un vertebrato (pesce) che per anni rimane esposto a miscele di CE che possono bioaccumulare. Inoltre, i test utilizzati non danno sempre risultati concordanti, avendo essi stessi una sensibilità diversa ma soprattutto a causa del meccanismo d’azione del tossico.

Tra i risultati applicativi la messa a disposizione di dati sulla pericolosità per la fauna invertebrata acquatica di CE per i quali non esistono limiti di legge e che ad oggi non sono monitorati né abbattuti negli impianti di depurazione. L’indice di rischio ecologico utilizzato ha permesso l’individuazione di un rischio per 59 CE, elevato per 13 (tra cui il triclocarban) e medio per 6 principi attivi (tra cui l’ibuprofene e il trimethoprim). In particolare, la creazione dell’indice di rischio parametrizzato per la realtà trentina, ha permesso di individuare quali composti determinano una maggiore pressione sul bacino del Noce. In generale è stata rispettata la classe di rischio ecologico attribuita sulla base delle concentrazioni previste per la quasi totalità delle sostanze. La validazione dell’indice di rischio ha confermato la bontà delle previsioni, con le sole eccezioni dei farmaci da banco ibuprofene e diclofenac e dell’antibiotico sulfamethoxazole. Per il primo antiinfiammatorio le previsioni hanno sottostimato il reale rischio, mentre un opposto risultato è stato predetto per il secondo. Sulla base del rischio calcolato a partire dalle concentrazioni misurate, si può concludere che la presenza di antibiotici (tra cui la amoxicillina) e antiinfiammatori (tra cui l’ibuprofene) rappresenta un rischio reale per la vita acquatica nel medio e lungo periodo nell’area di studio. In particolare, la presenza di antibiotici in ambiente acquatico di alta montagna rappresenta un problema da non sottovalutare in quanto potrebbero indurre nelle popolazioni dei microrganismi meccanismi di difesa, noti come fenomeni di resistenza agli antibiotici nelle comunità autoctone.

L’indice di rischio ecologico, parametrizzato per la realtà dei corsi d’acqua della Val di Sole, è uno strumento semplice che potrà essere impiegato anche per la gestione del

rischio nei prossimi anni in tutte le acque correnti del Trentino, non solo nel Bacino del Noce. La possibilità di predire il rischio associato ad un determinato farmaco in base alle sue vendite determina il suo facile ed immediato utilizzo. La sua applicazione permetterebbe per esempio di effettuare anche valutazioni comparative tra farmaci con la stessa indicazione terapeutica sulla base del livello di rischio ambientale associato al loro utilizzo. Tali informazioni opportunamente condivise con i diversi portatori di interesse (in particolare farmacisti e medici) potrebbero essere prese in considerazione al momento della scelta del medicinale (si veda ad esempio il diverso livello di rischio associato ai differenti prodotti).

Lo studio ha selezionato alcune molecole come più dannose per la fauna acquatica, classificate ad alto-medio rischio per l'ecosistema acquatico dall'indice di rischio. Sono il chlorpyrifos, l'ibuprofene e il triclocarban, tre molecole impiegate dall'uomo in agricoltura (il chlorpyrifos) e per la propria salute e igiene (l'ibuprofene è un antiinfiammatorio mentre il triclocarban è un antibatterico utilizzato in creme antisudore, colluttori, dentifrici ecc.) Tra le molecole insospettite, il sucralosio (uno zucchero artificiale presente in molti prodotti alimentari energizzanti molto utilizzati dagli sportivi) e la tonalide (profumo presente in molti saponi, detergenti per la casa e profumi per la cura della persona) non sono risultate innocue come atteso. In particolare la tonalide è il CE più interessante per gli effetti provocati a livello di citossicità, e alterazione della sintesi di RNA e proteine in cellule umane, in vitro. È vero che il modello in vitro è molto distante da quello in vivo, e che la tonalide è utilizzata nei prodotti per la cura ed igiene personale come profumo, per cui l'esposizione nell'uomo potrebbe avvenire solo per via transdermica o per inalazione. La presenza nelle acque potrebbe però portare ad assunzioni diverse e pertanto ulteriori studi sarebbero auspicabili per chiarirne gli effetti in vivo. Sono necessari ulteriori approfondimenti per capire a quale rischio l'uomo e la fauna selvatica sono realmente esposti. Tuttavia, le linee guida per la gestione dell'ambiente dovranno tenere conto in futuro di questi risultati, che avranno un impatto anche sul mondo produttivo e potranno influenzare le abitudini dei cittadini.

Nel complesso sono dati parziali ma già utili per la valutazione di concentrazioni limite dei CE studiati, che siano protettive per l'ecosistema fluviale, e per la valutazione dell'efficienza degli impianti di depurazione provinciali.

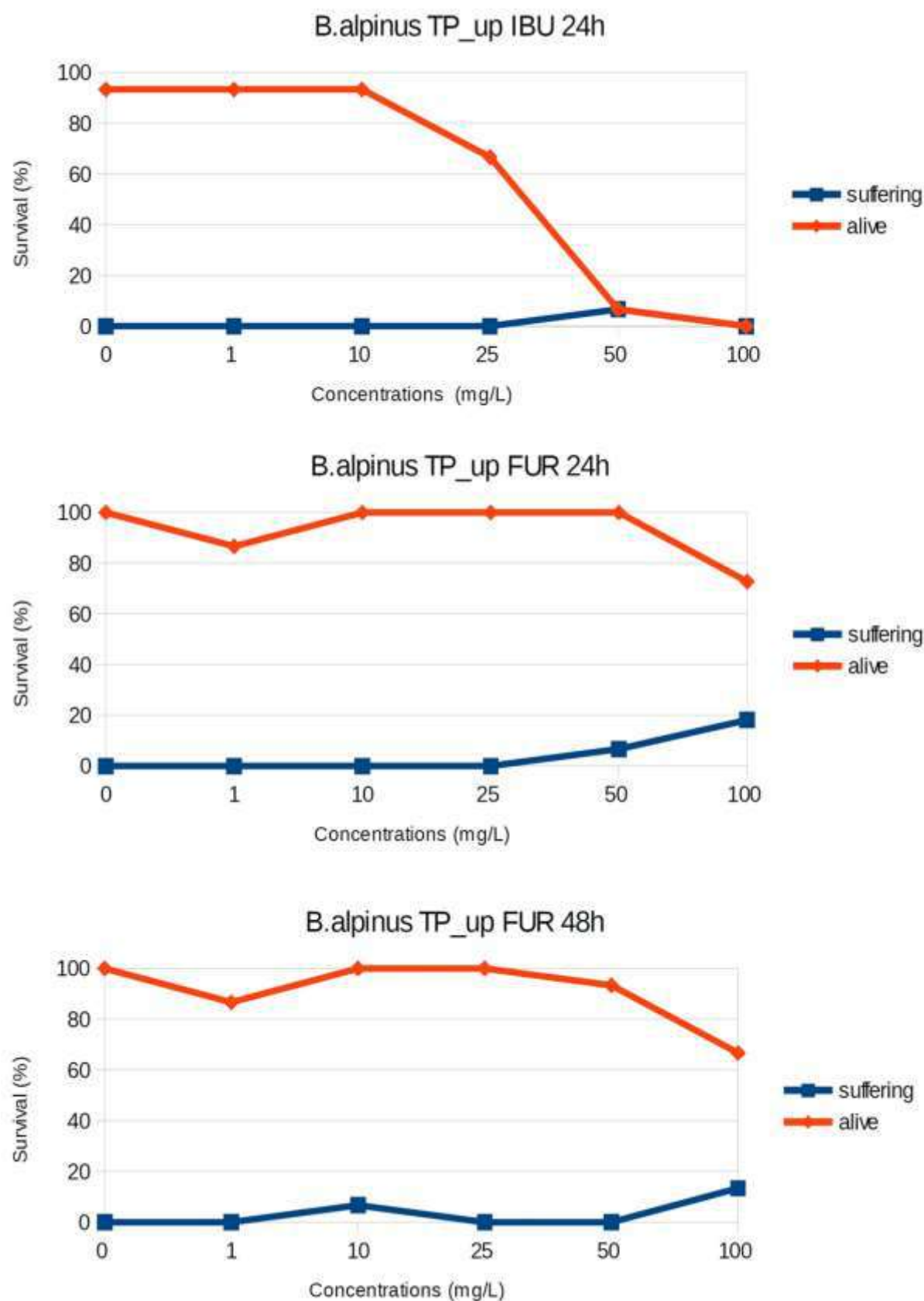
Le analisi pre- e post- impianto di depurazione del Tonale hanno evidenziato la carenza strutturale dell'impianto ad abbattere l'elevato carico di PPCPs specialmente in inverno. I dati dimostrano che le attività agronomiche delle valli trentine sembrano impattare le aree montane di alta quota, anche se ad oggi in misura ancora non preoccupante. Quindi andrà valutata la possibilità di modificare gli impianti per la depurazione, affinché i CE possano essere abbattuti, e di modificare le linee guida per la gestione delle risorse idriche destinate ai diversi usi (es. irriguo, acquacoltura) considerando anche la stagionalità dell'abbondanza dei CE (che dipende a sua volta dalla stagionalità delle attività produttive). Inoltre, le informazioni raccolte su batteri, insetti e cellule umane, potranno servire per l'identificazione di biomarcatori utili nel monitoraggio di contaminazione da CE - ad oggi non vi sono indici in grado di rilevare questo tipo di inquinamento nei corpi idrici recettori degli scarichi dei depuratori.

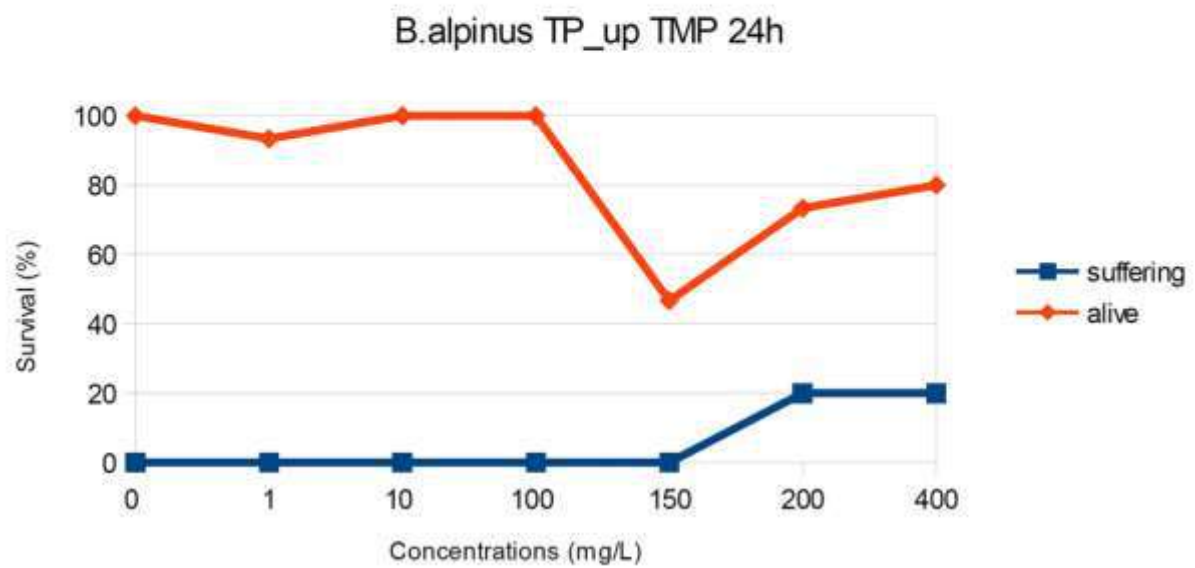
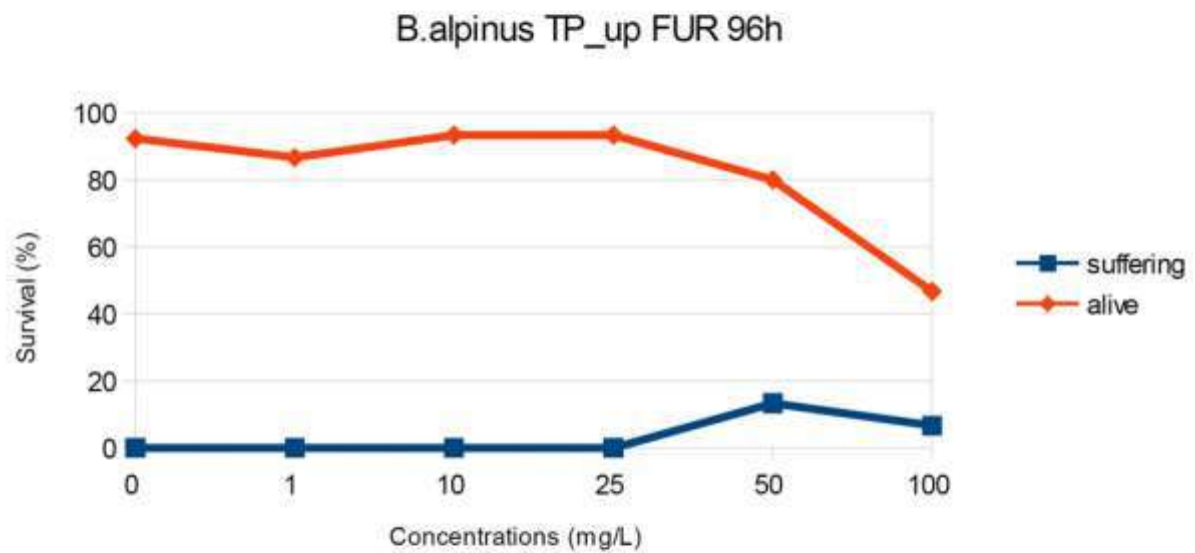
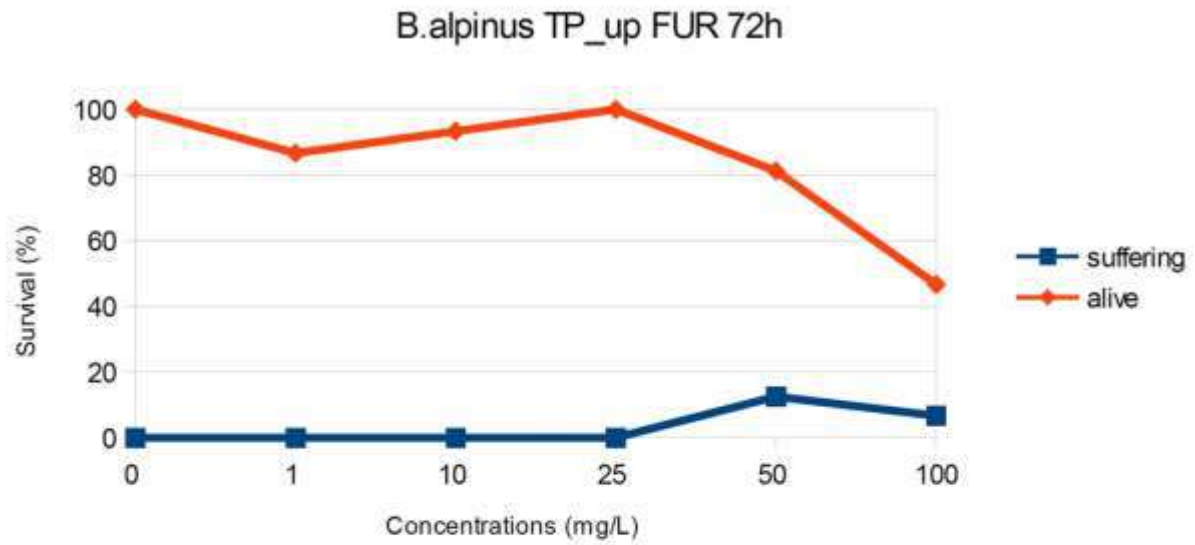
Nel prossimo biennio proseguirà la pubblicazione dei risultati scientifici sia su riviste ISI di settore disciplinare che divulgative, per informare e sensibilizzare cittadini, amministrazioni pubbliche e stakeholder sul tema dell'inquinamento "emergente" e la necessità di un uso più sostenibile della risorsa idrica. Inoltre, i risultati saranno presentati nel corso di conferenze divulgative per il pubblico generico sia nella sede del

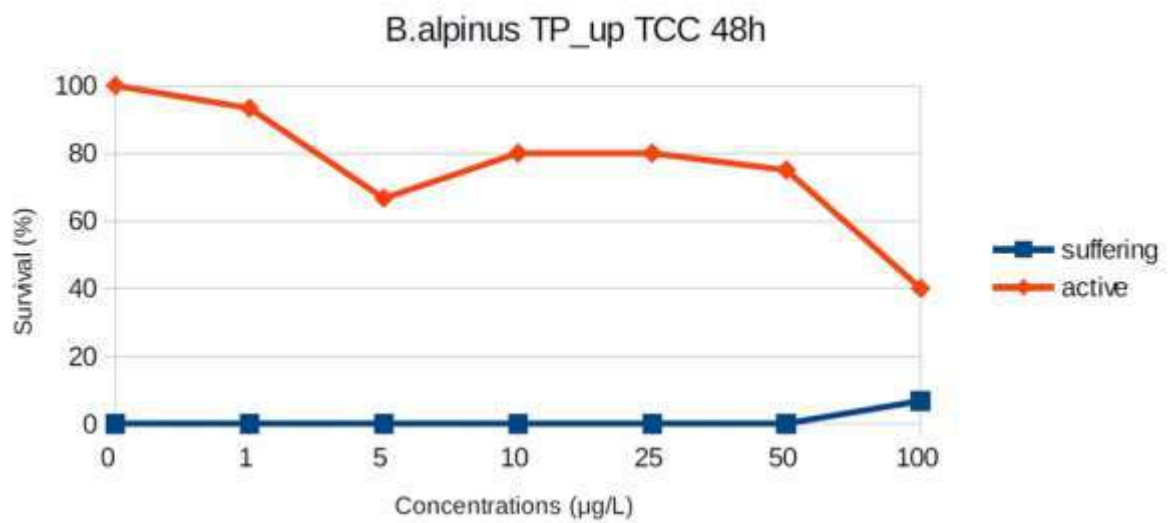
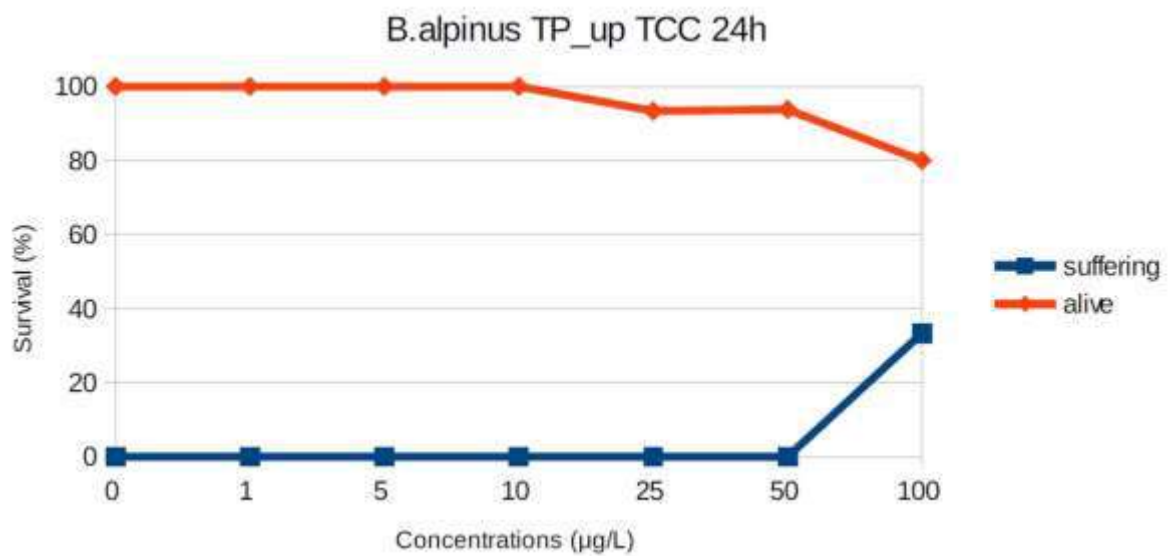
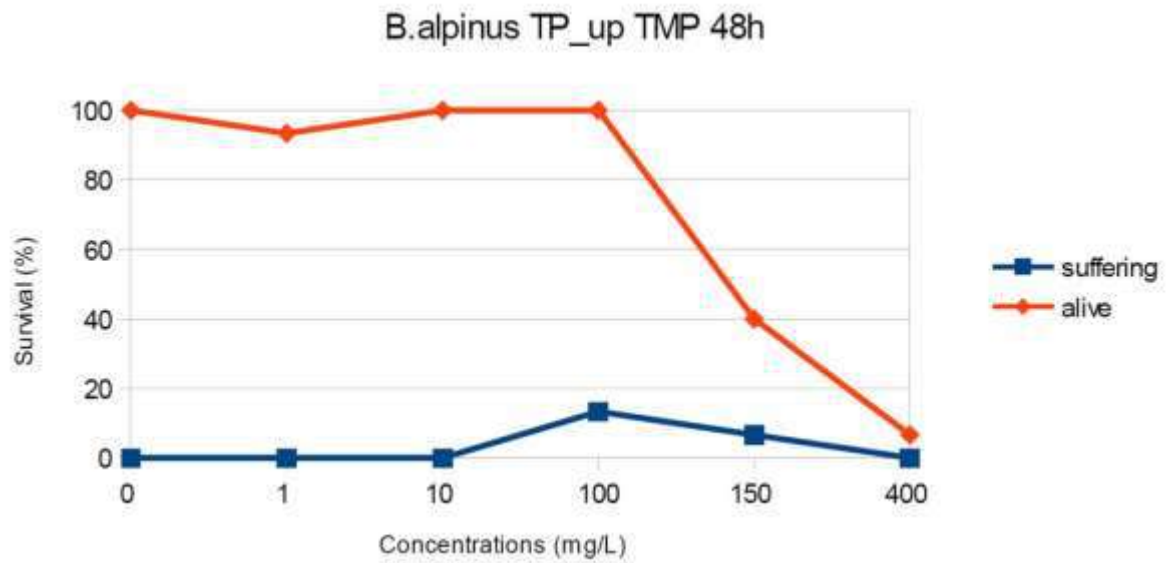
MUSE che sul territorio, nelle Comunità di Valle. Per un periodo pari a 5 anni dalla fine del progetto, verrà eseguita la valutazione ex post del progetto, per verificarne gli effetti a lungo termine, in modo da esprimere un giudizio finale sulle ricadute effettive sul sistema economico trentino. Tra gli obiettivi, verificare se le amministrazioni pubbliche avranno adottato gli strumenti conoscitivi messi a disposizione dal progetto per una diversa gestione delle acque pubbliche, che tenga conto del fatto che i CE rimangono negli effluenti dei depuratori e che si trovano anche a monte dei depuratori se vi sono fonti di sversamento.

Altro parametro da valutare sarà il livello di conoscenza della problematica dei cittadini, utilizzatori e allo stesso tempo ultimo bersaglio dei CE dispersi nell'ambiente, attraverso questionari, incontri ecc.: da una maggiore conoscenza possono derivare azioni e comportamenti più responsabili e rispettosi dell'ambiente.

Appendice 1 – Grafici di sopravvivenza e Curve di Weibull.







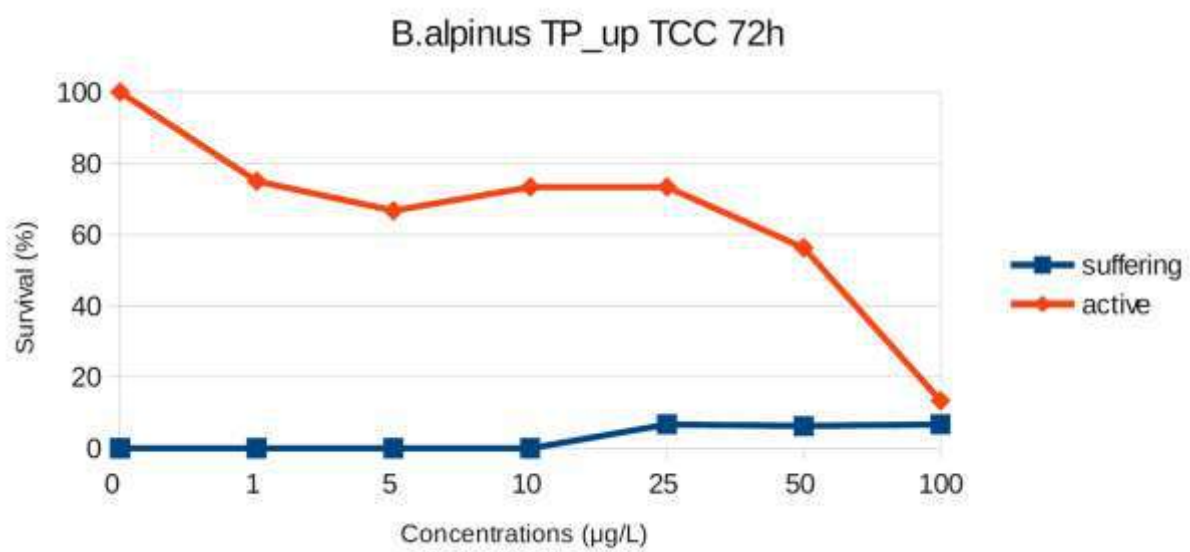
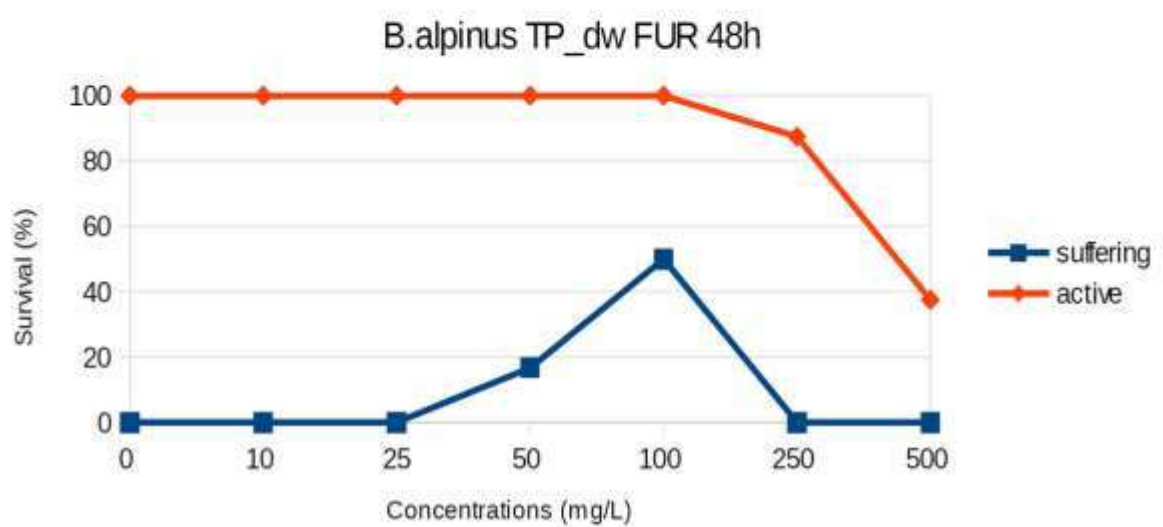
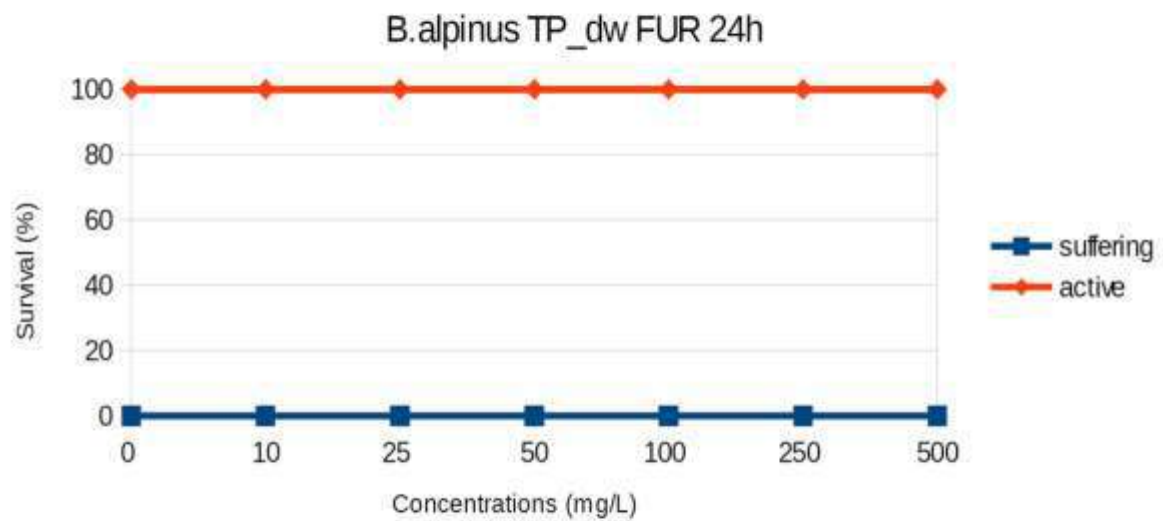
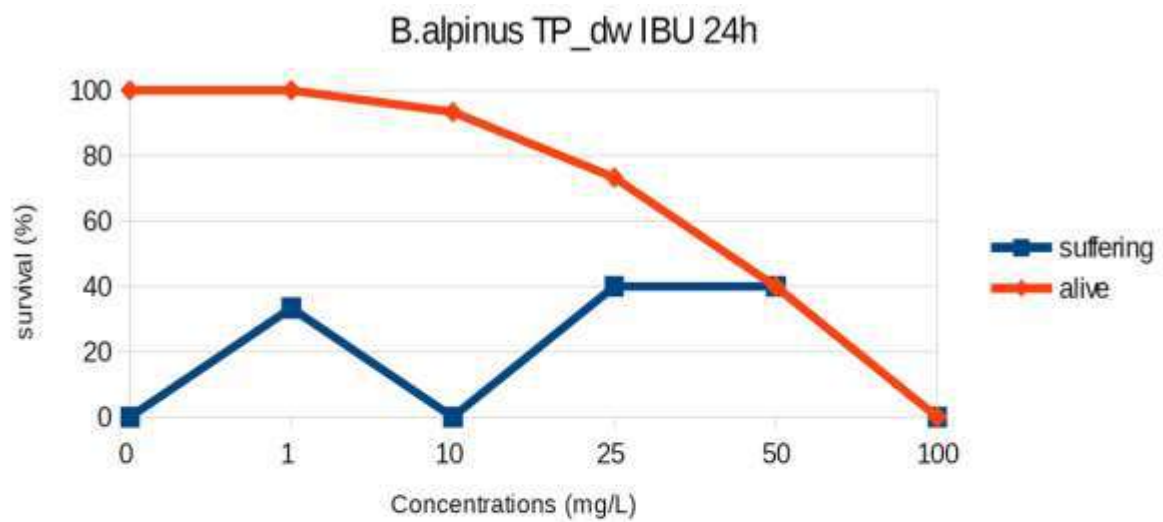
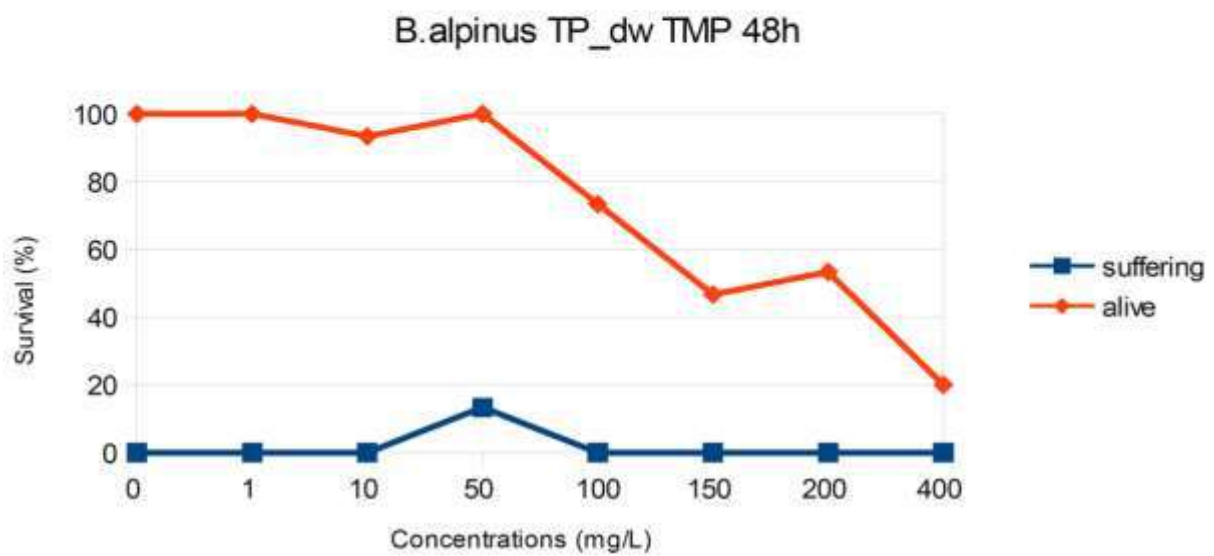
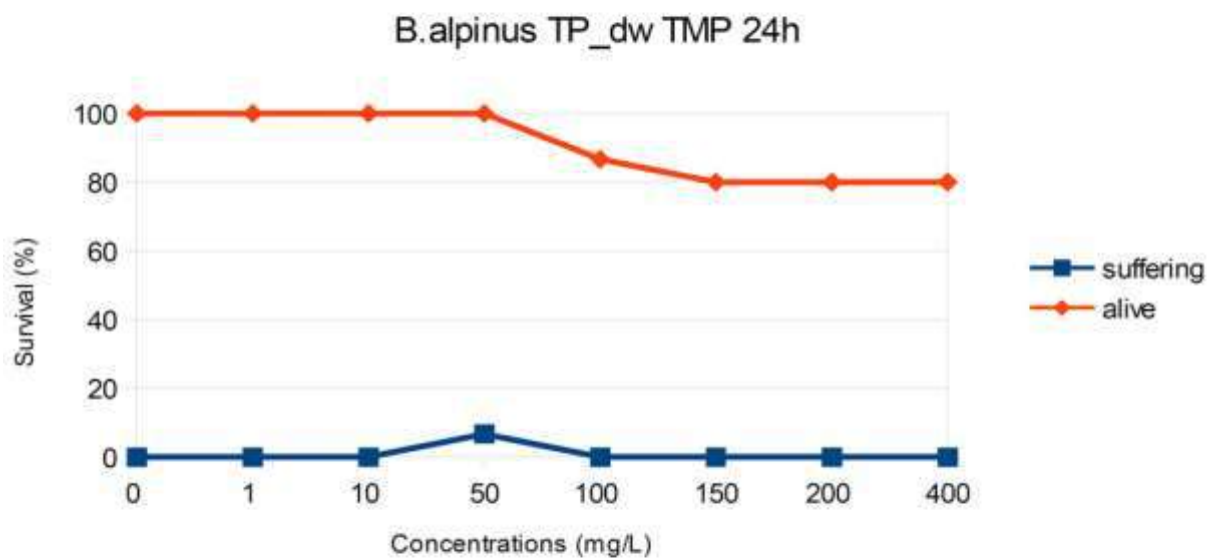
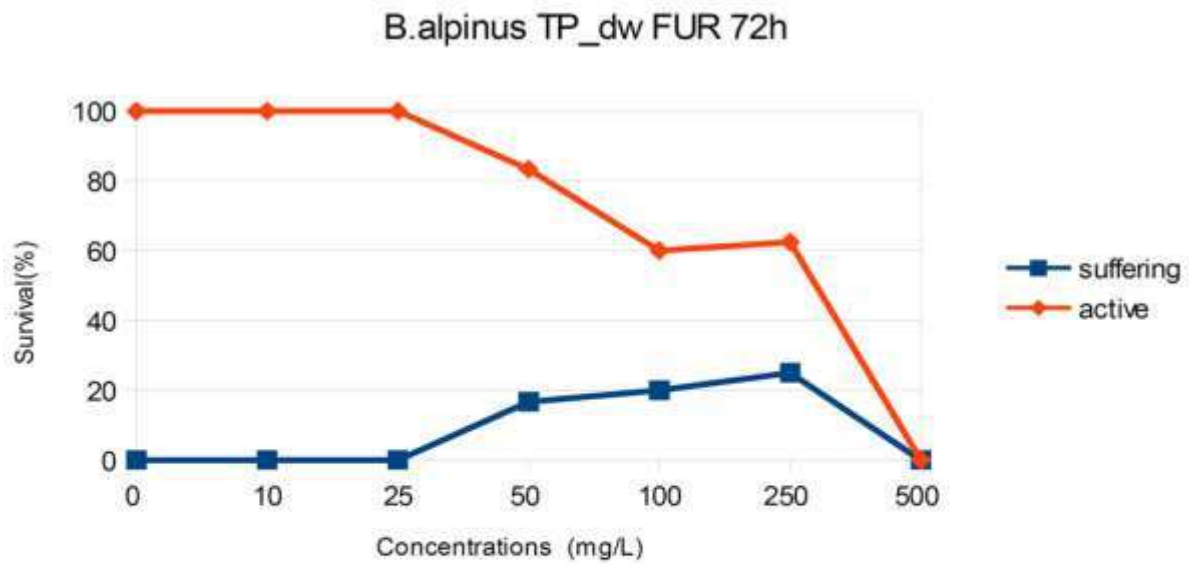


Figura A1-1 - Andamento di sopravvivenza di larve di *B. alpinus* (PTm). Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, sofferenti e pupe.





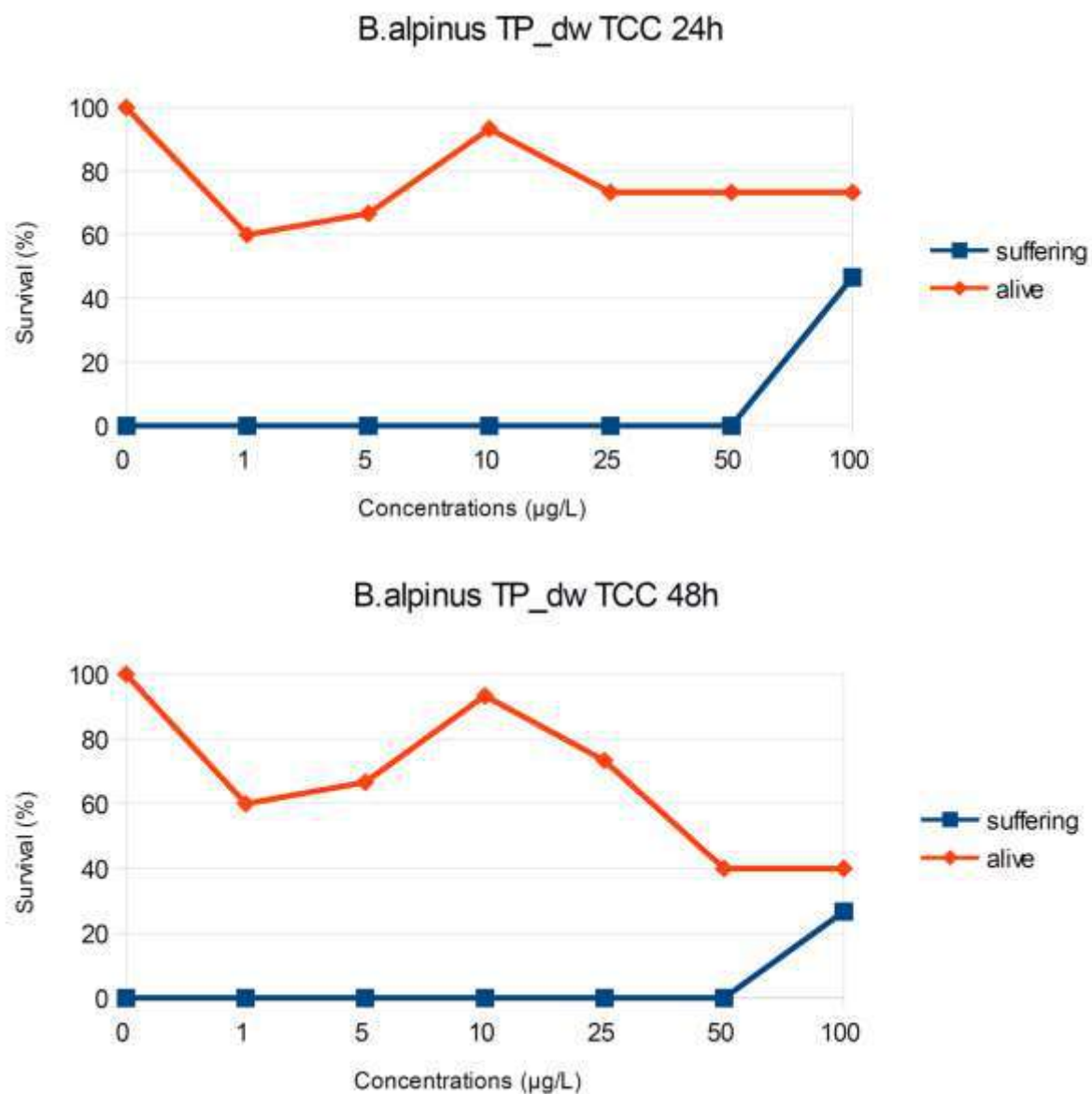


Figura A1-2 - Andamento di sopravvivenza di larve di *B. alpinus* (PTv). Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, sofferenti e pupe.

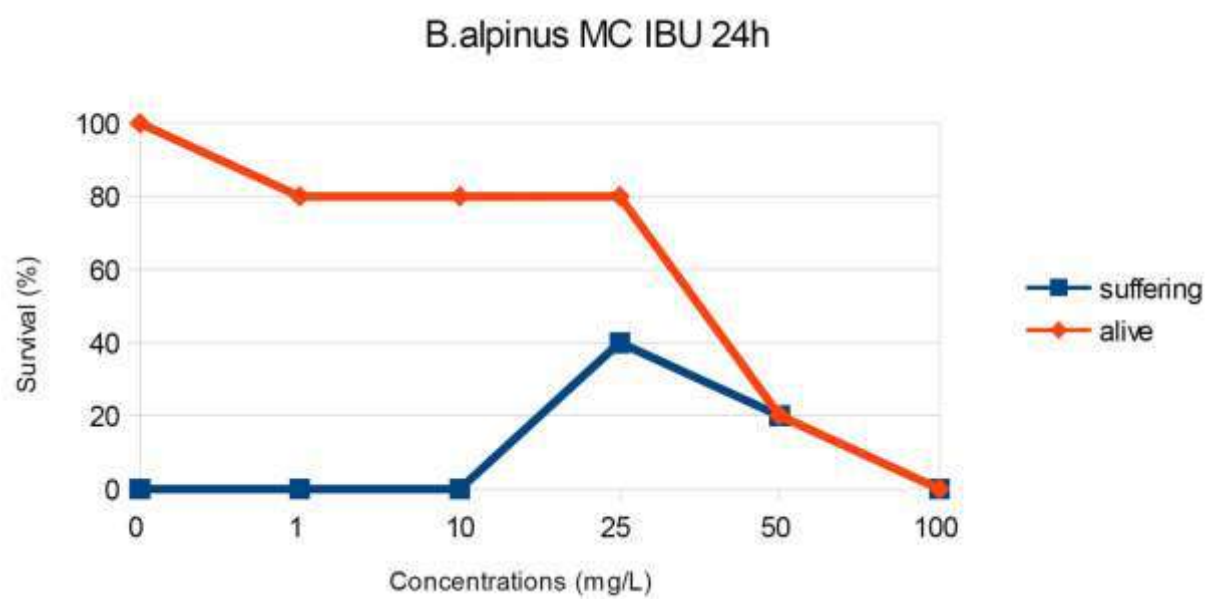
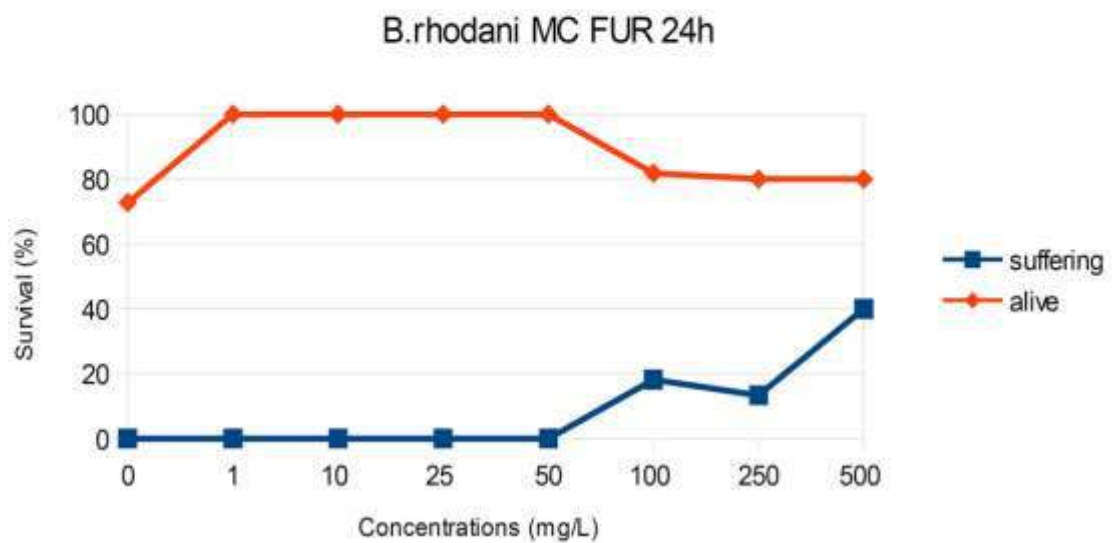
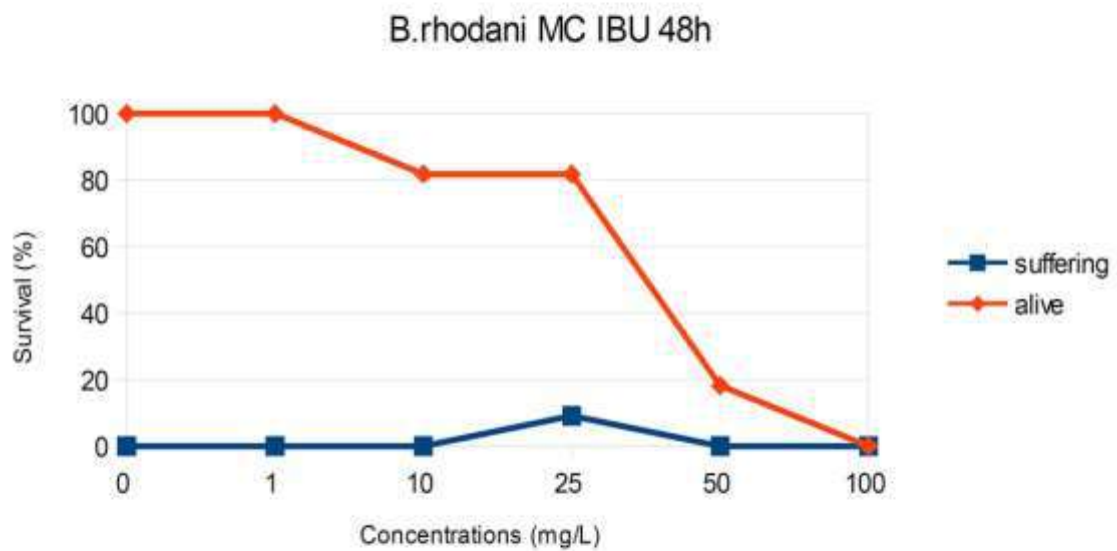
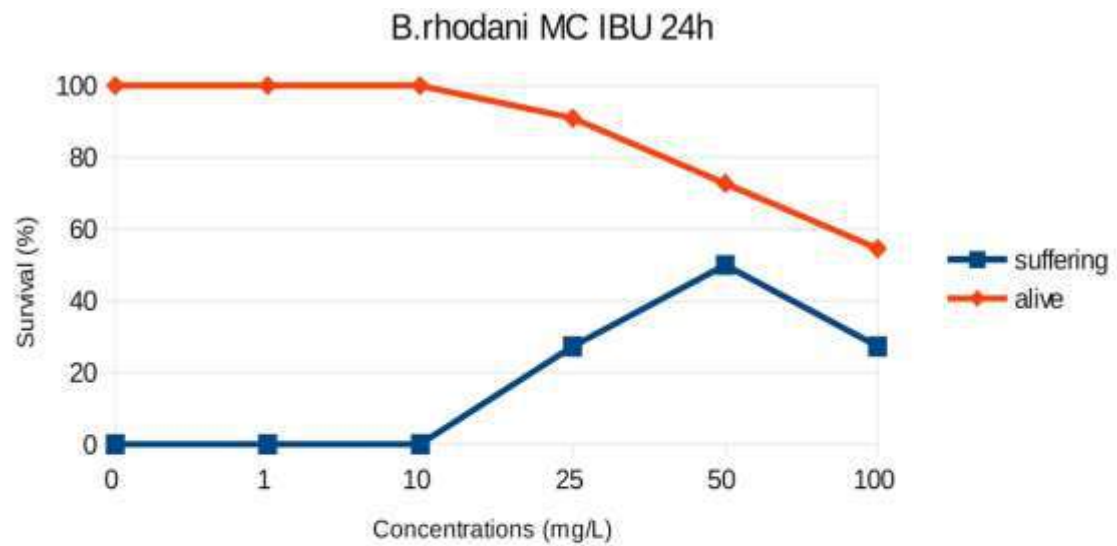
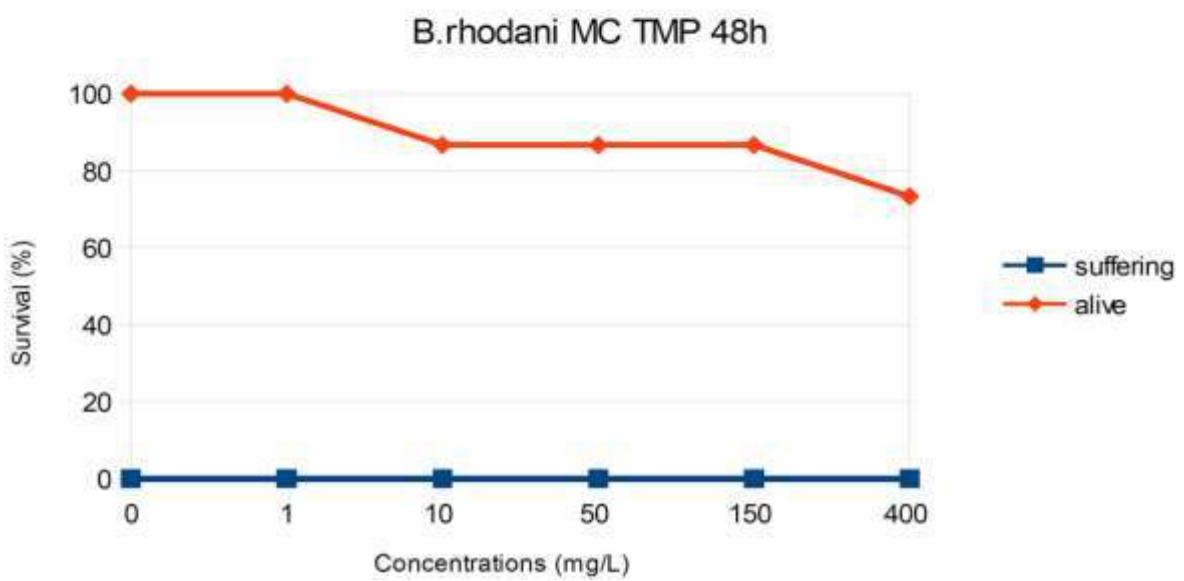
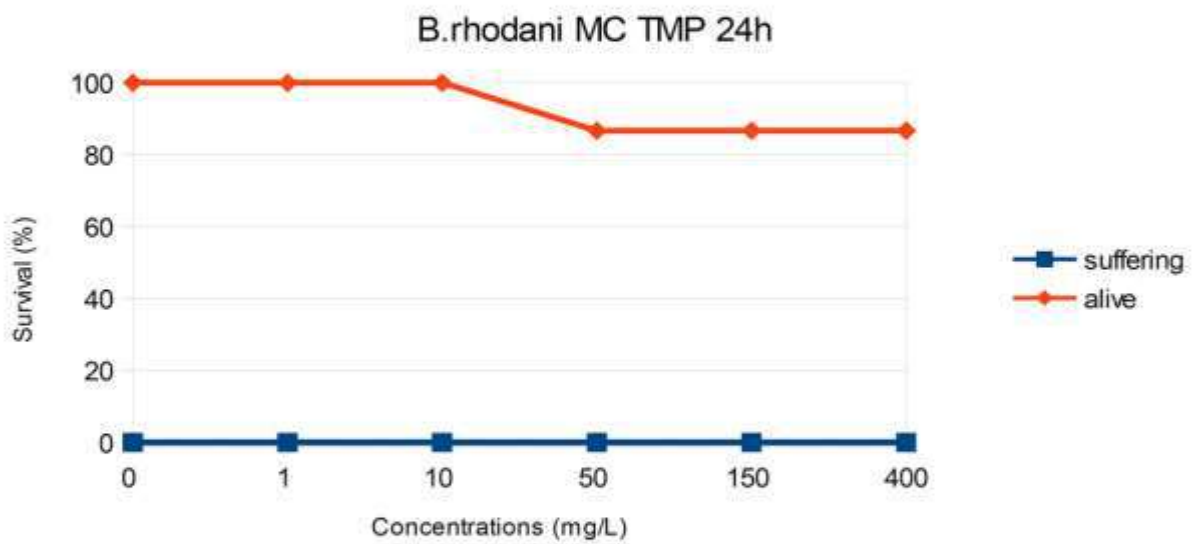
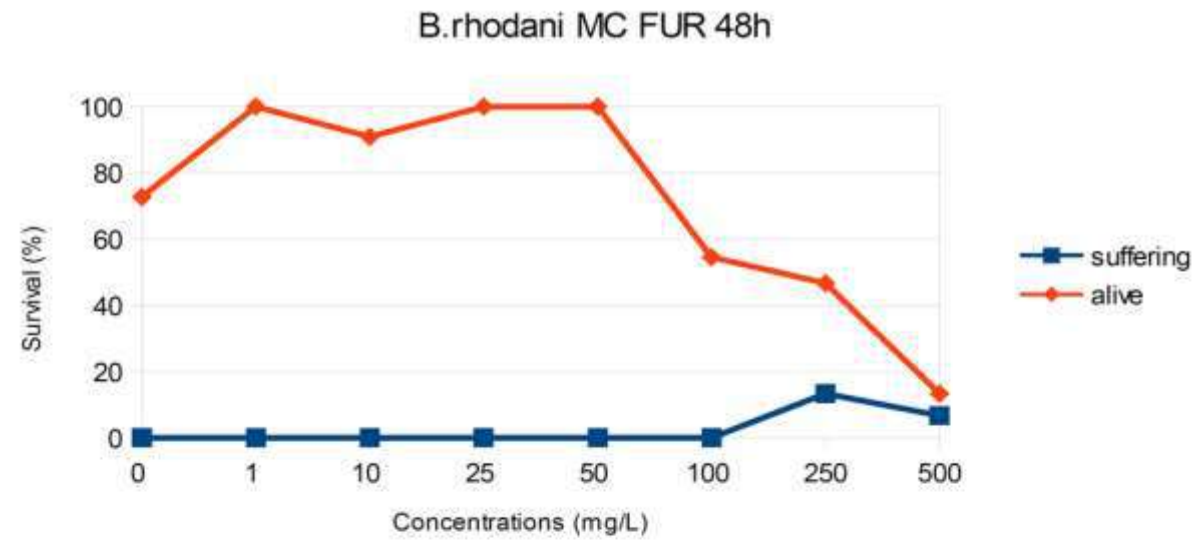
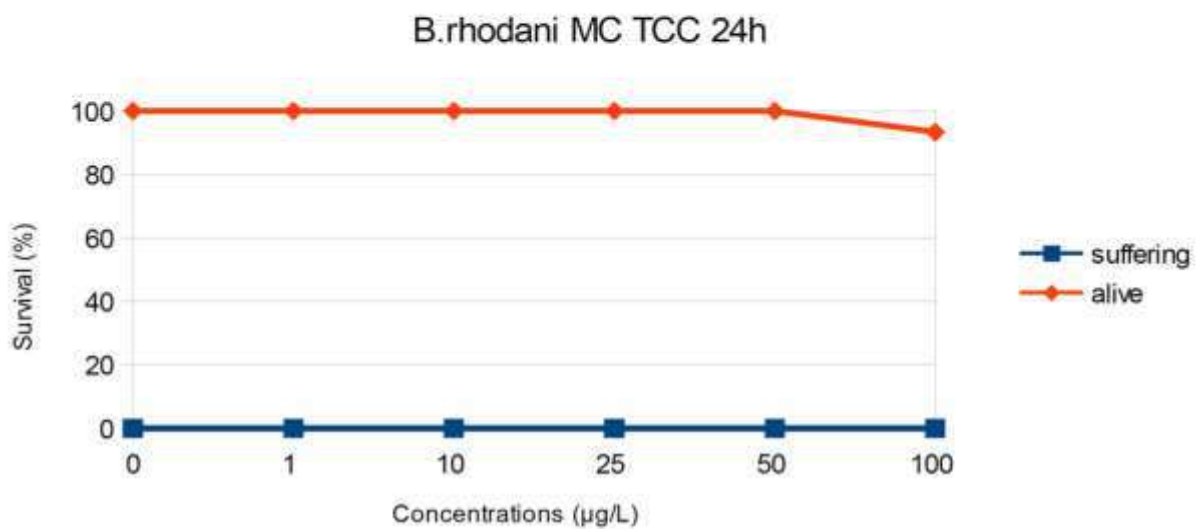
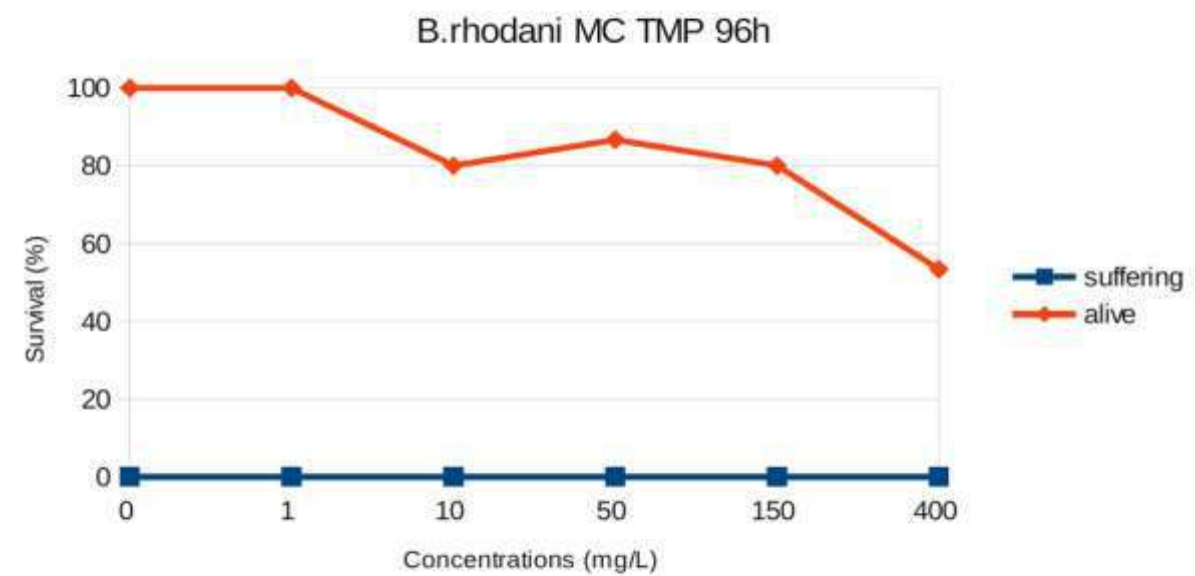
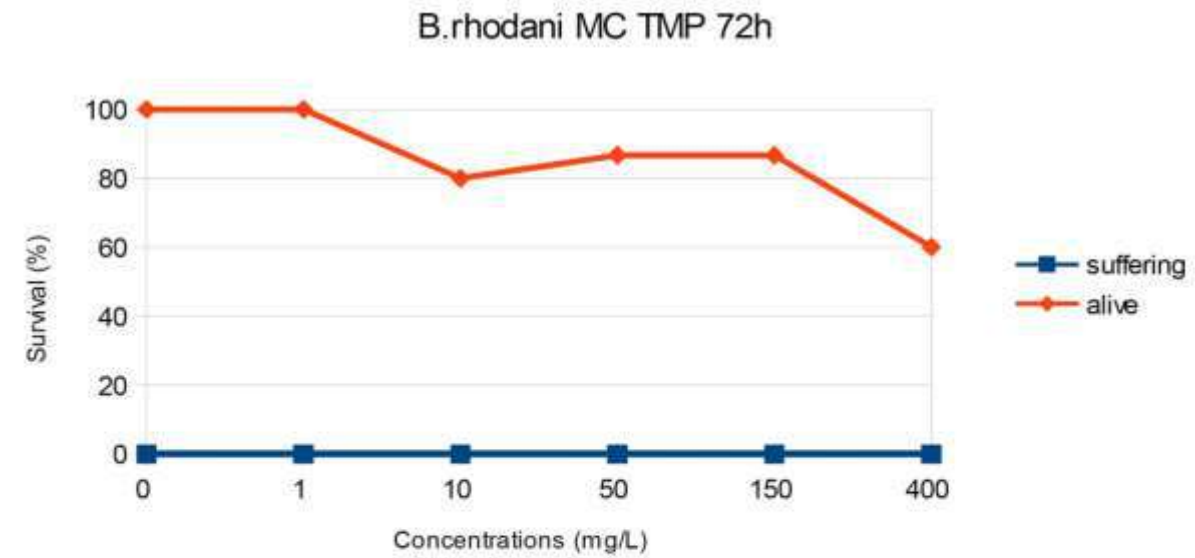


Figura A1-3 - Andamento di sopravvivenza di larve di *B. alpinus* (ML). Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, sofferenti e pupe.







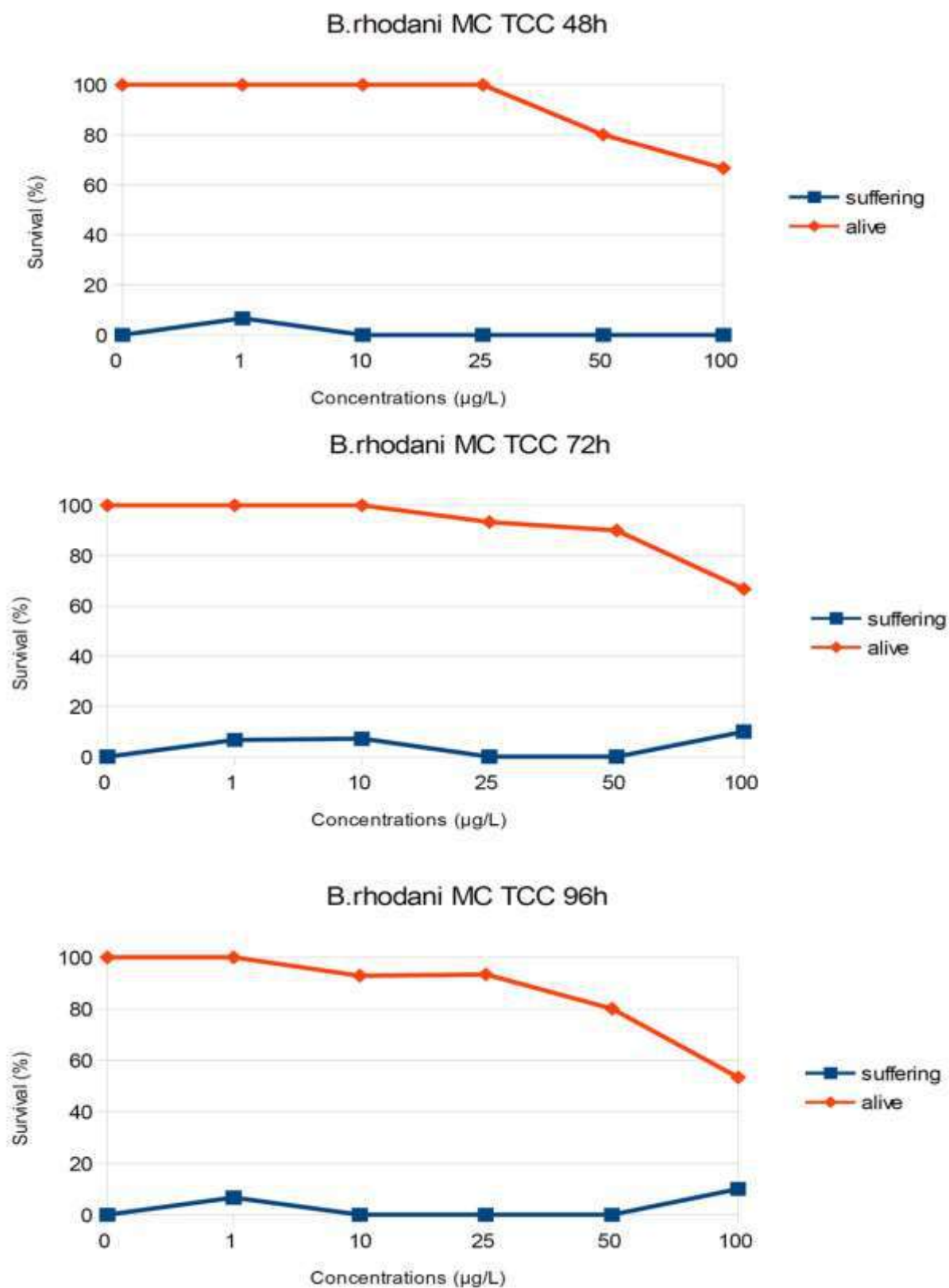
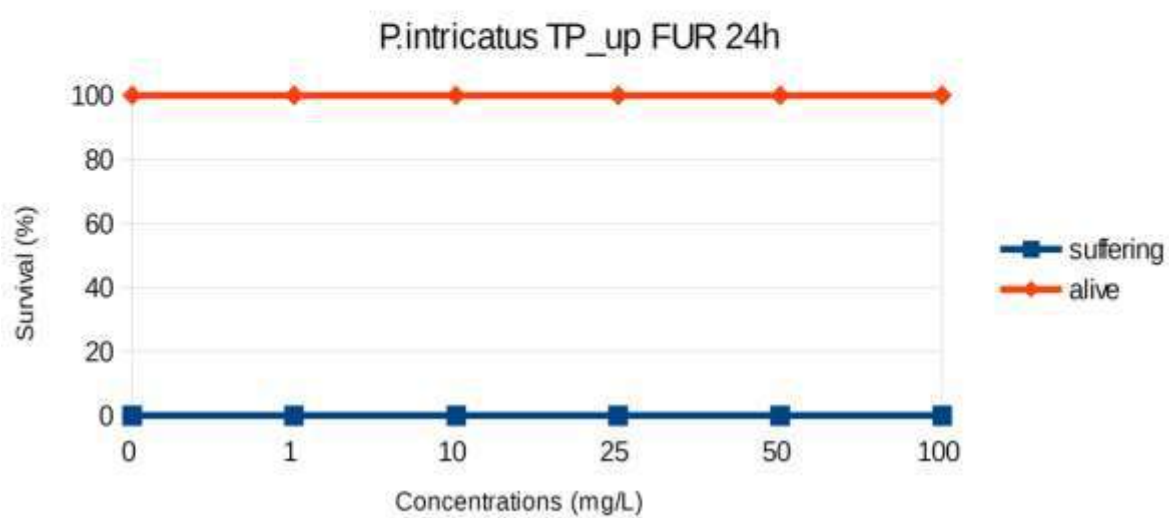
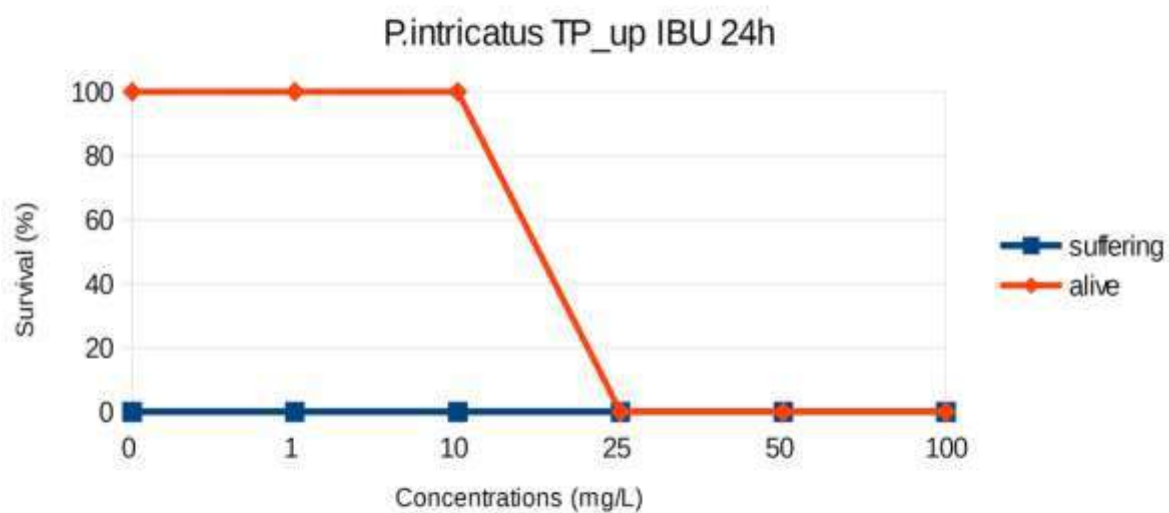
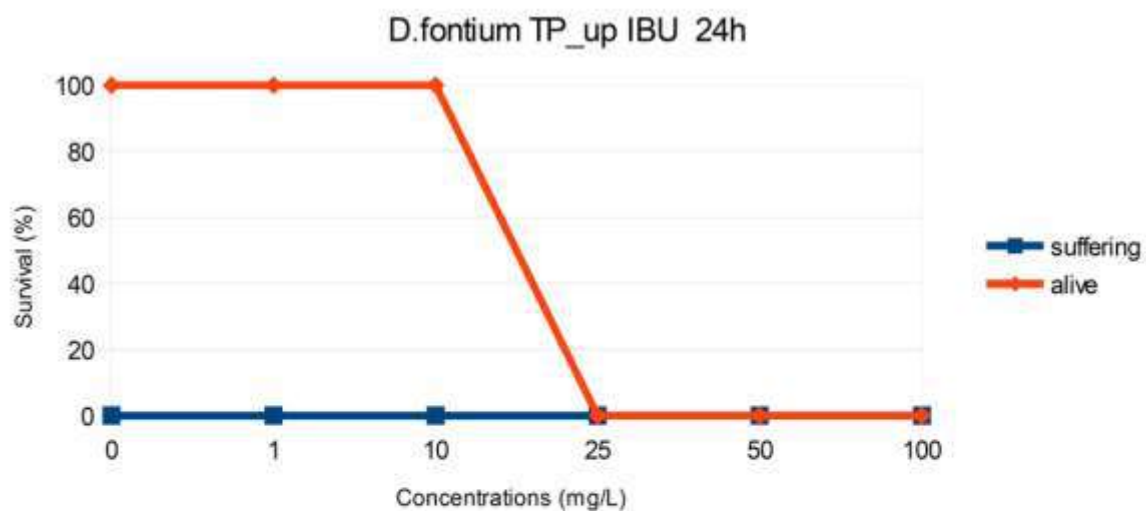


Figura A1-4 - Andamento di sopravvivenza di larve di *B. rhodani* (ML). Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, sofferenti e pupe.



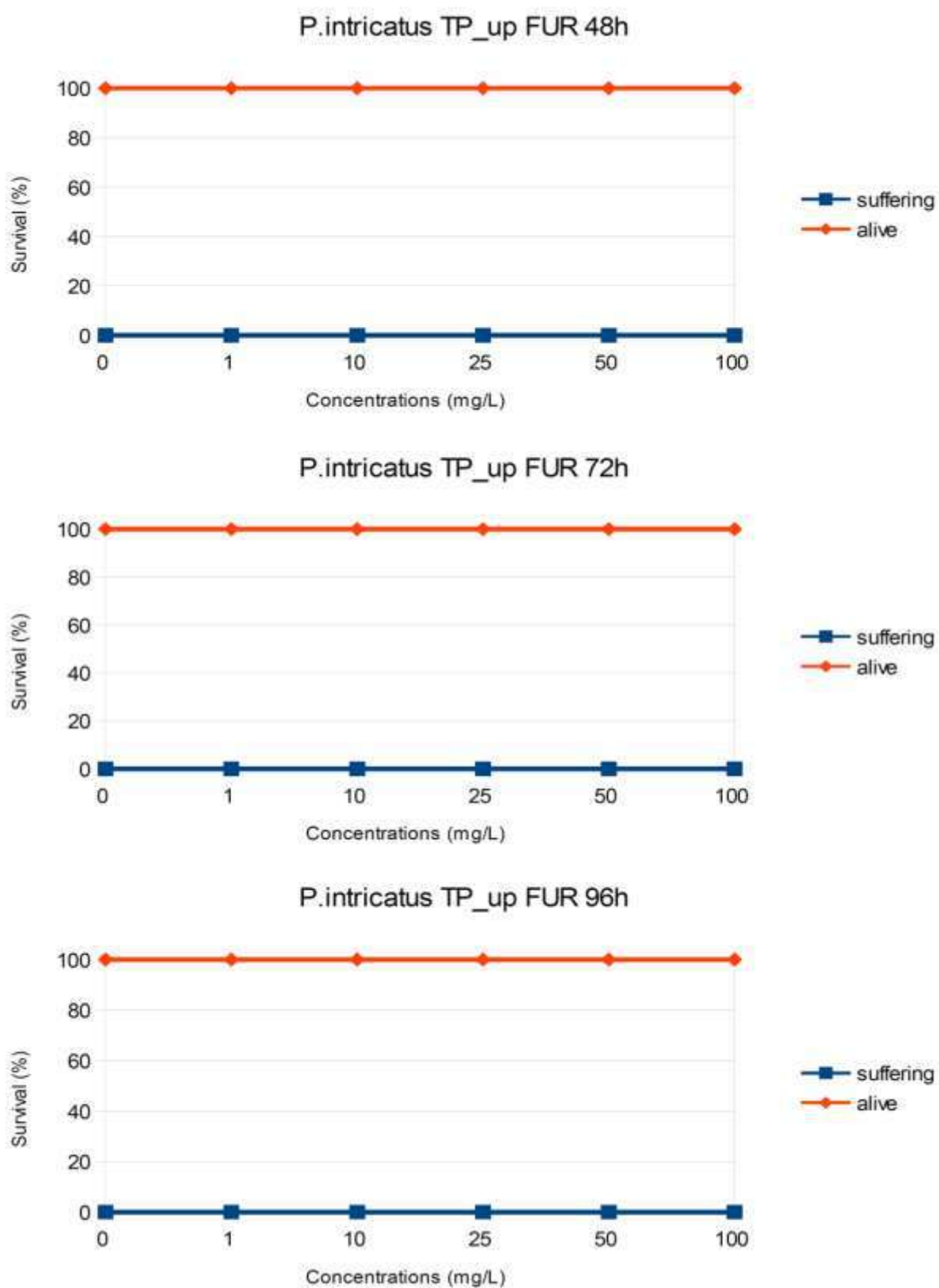


Figura A1-5 - Andamento di sopravvivenza di larve di *P. intricatus* e *D. alpinus* (PTm). Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, sofferenti e pupe.

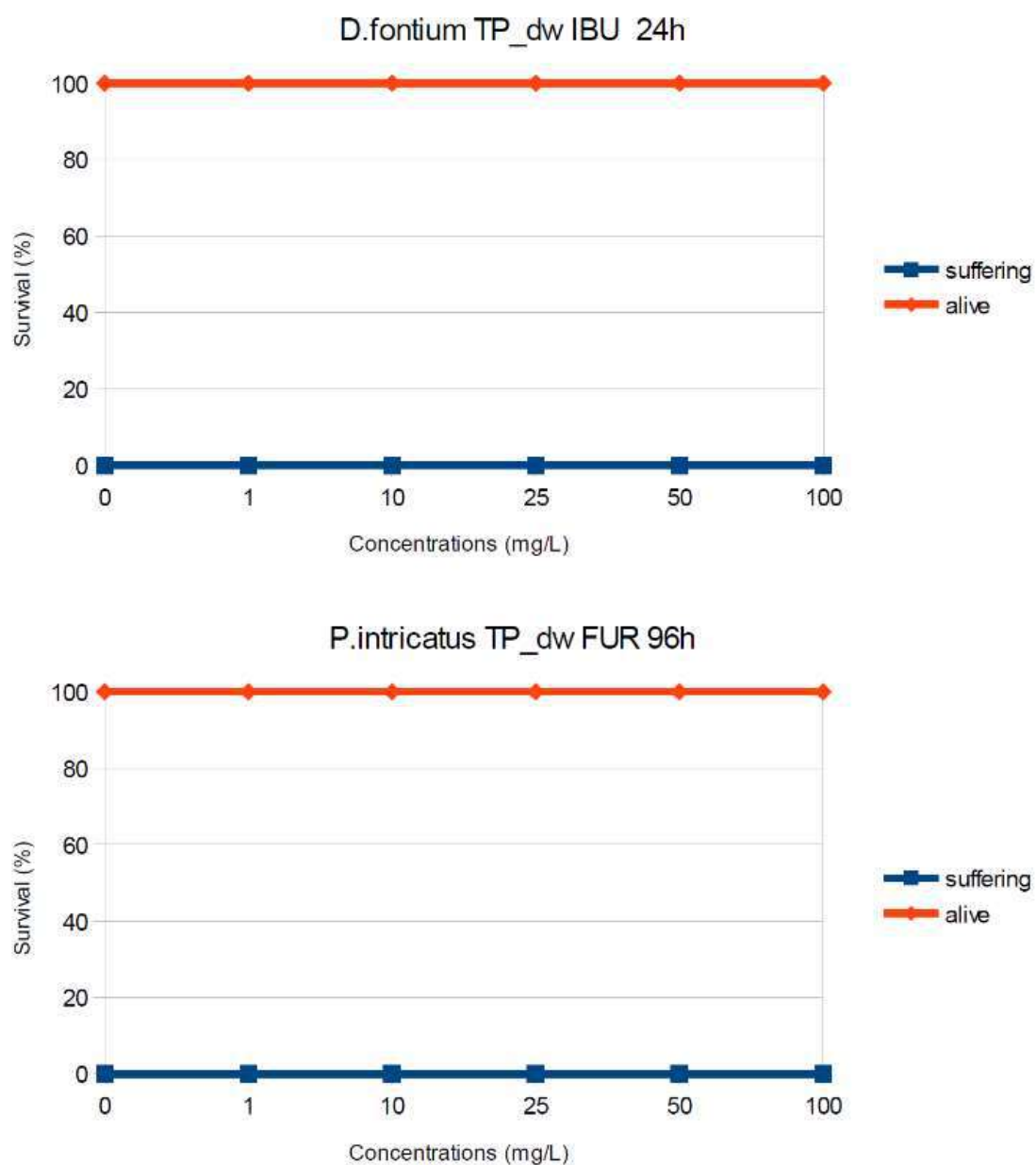
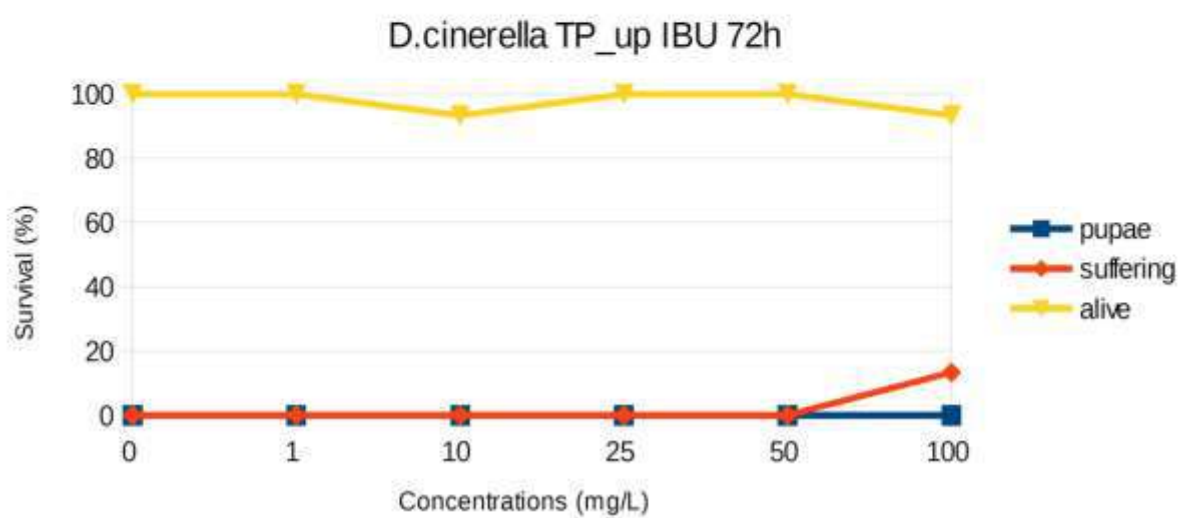
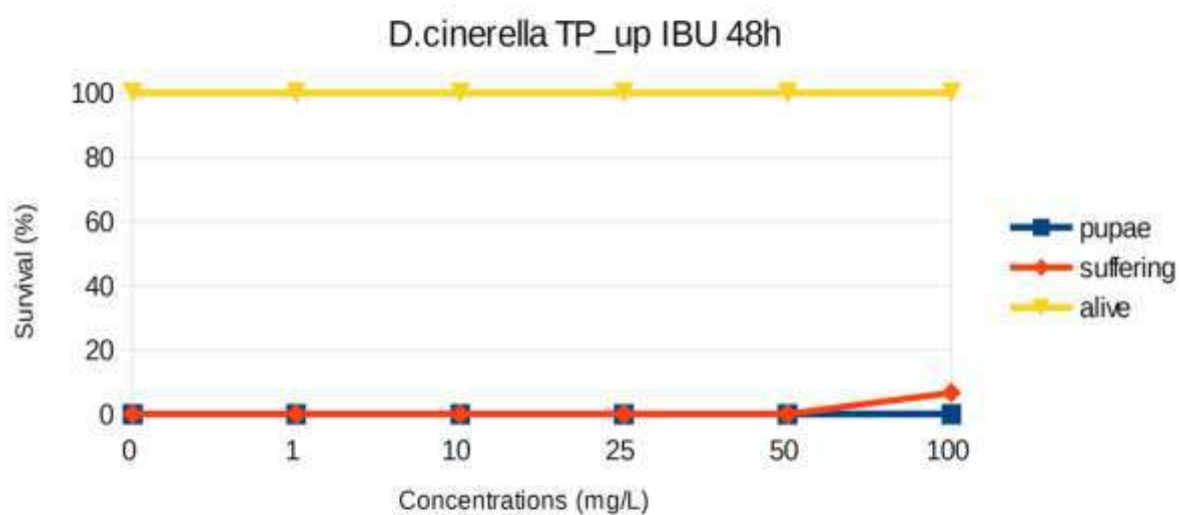
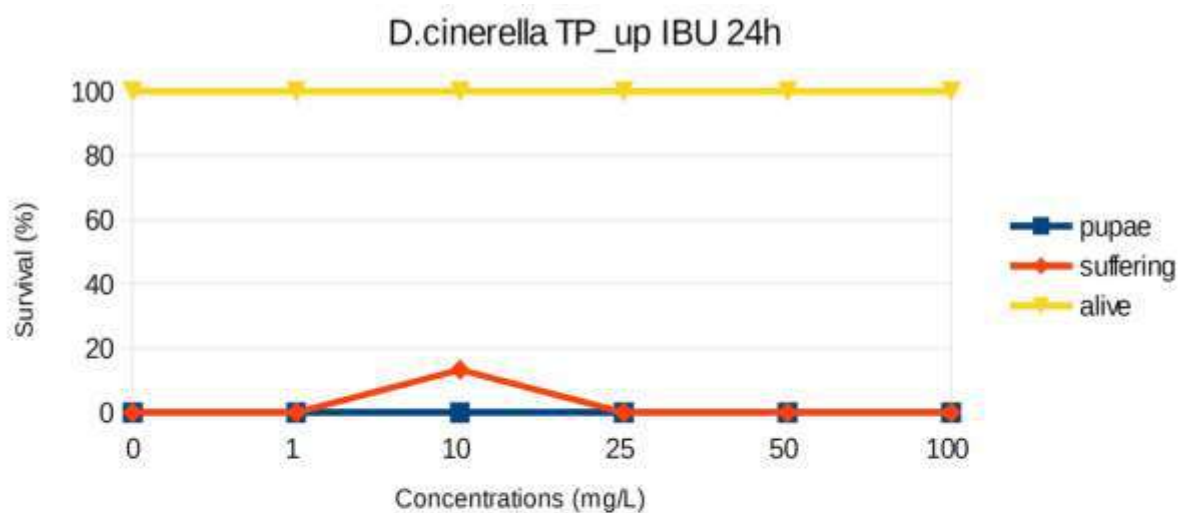
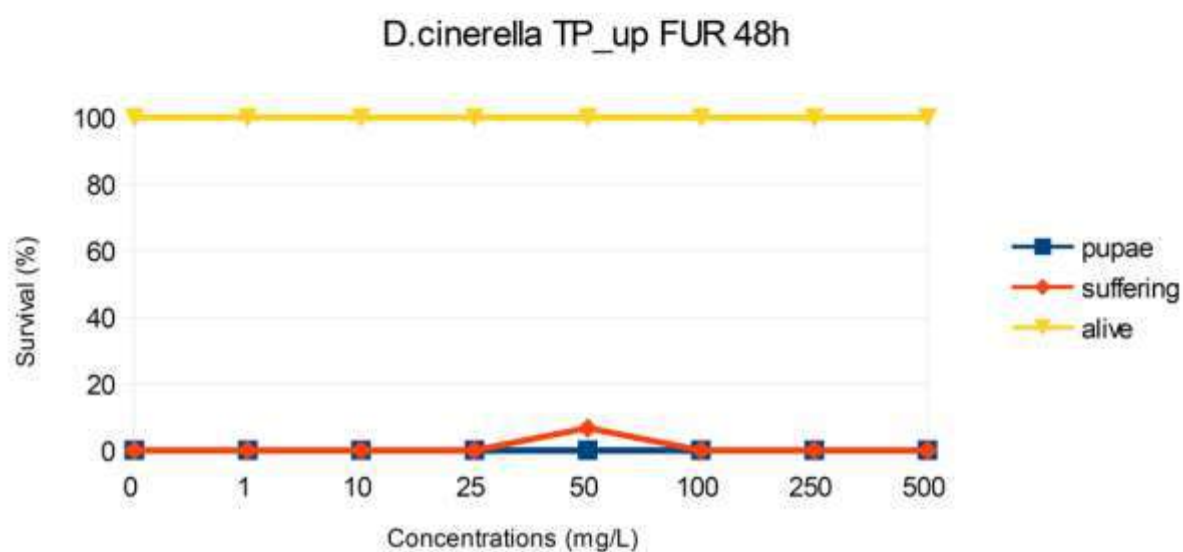
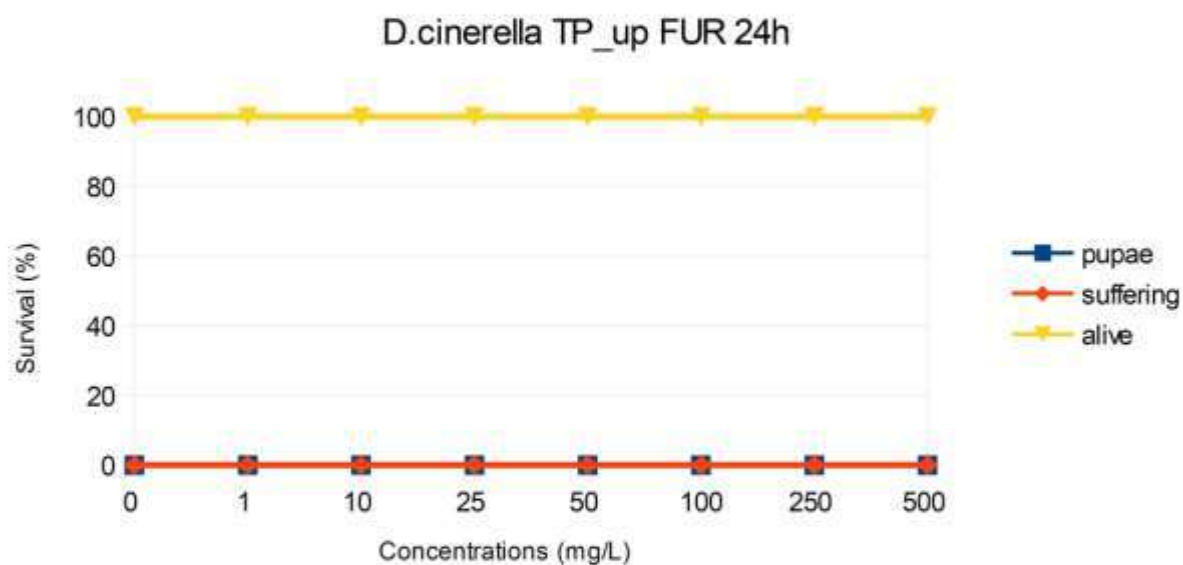
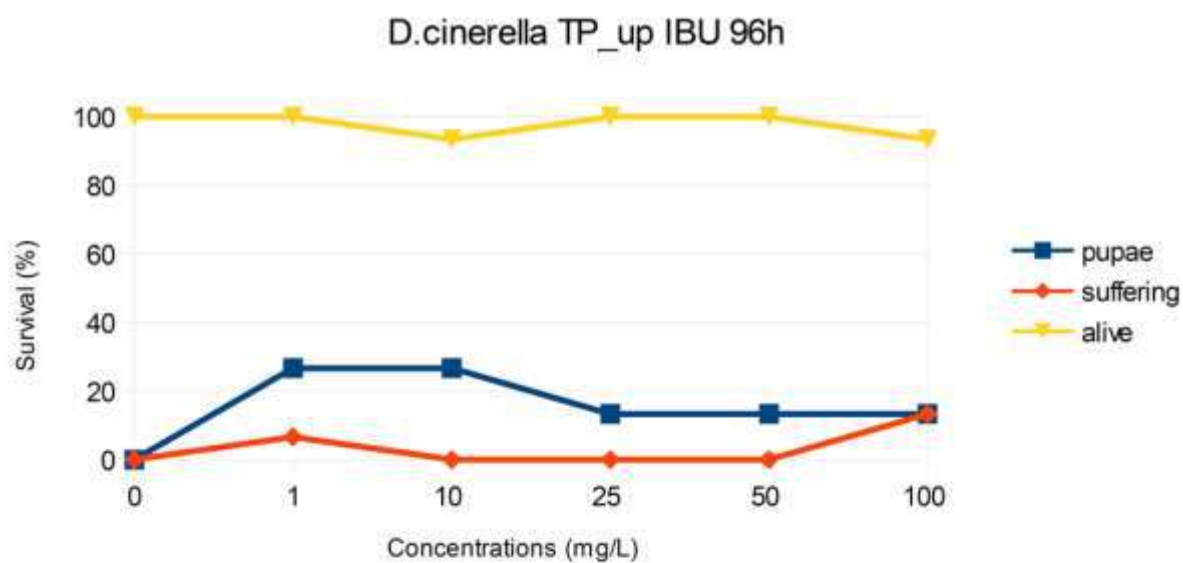
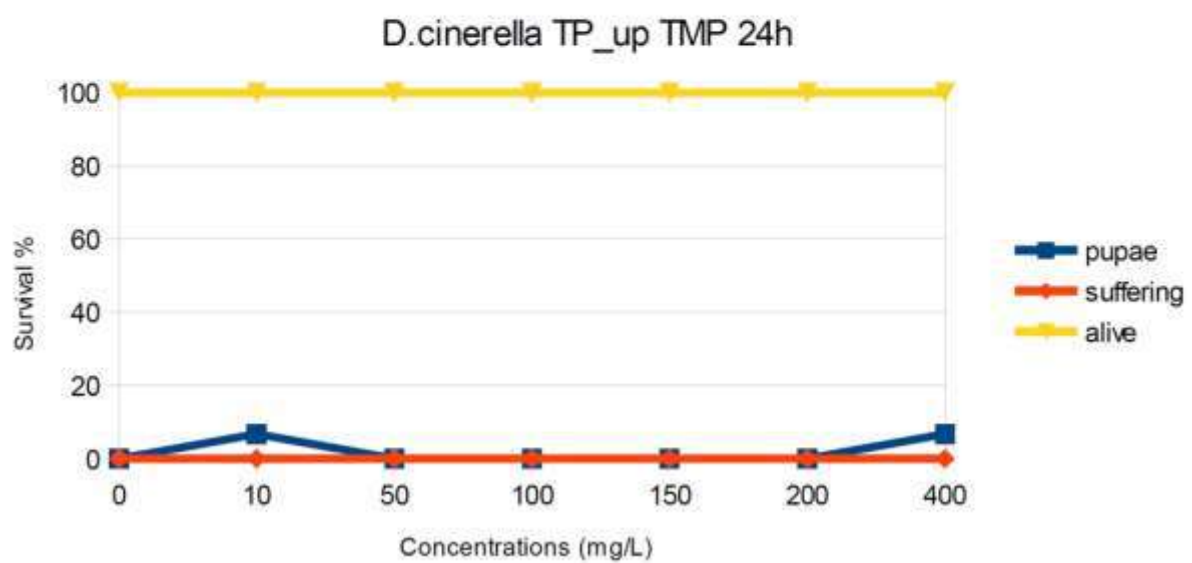
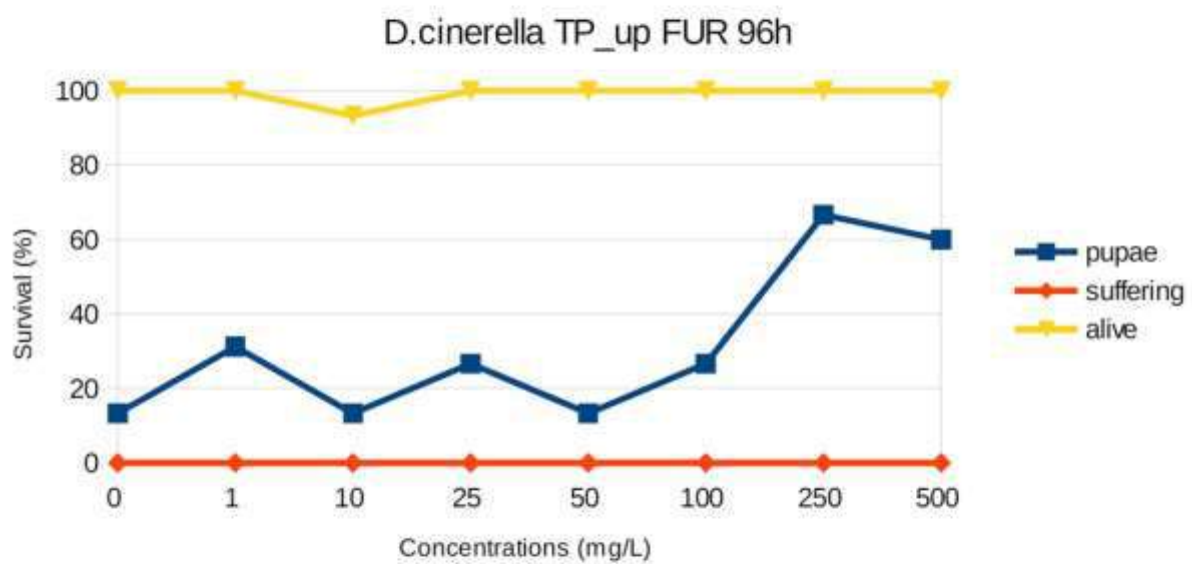
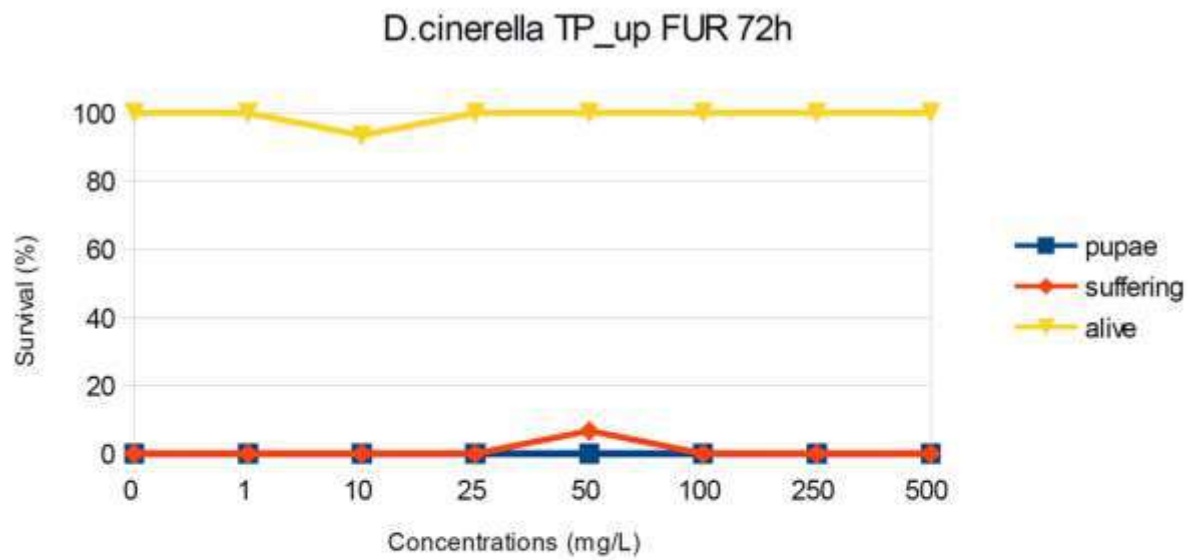
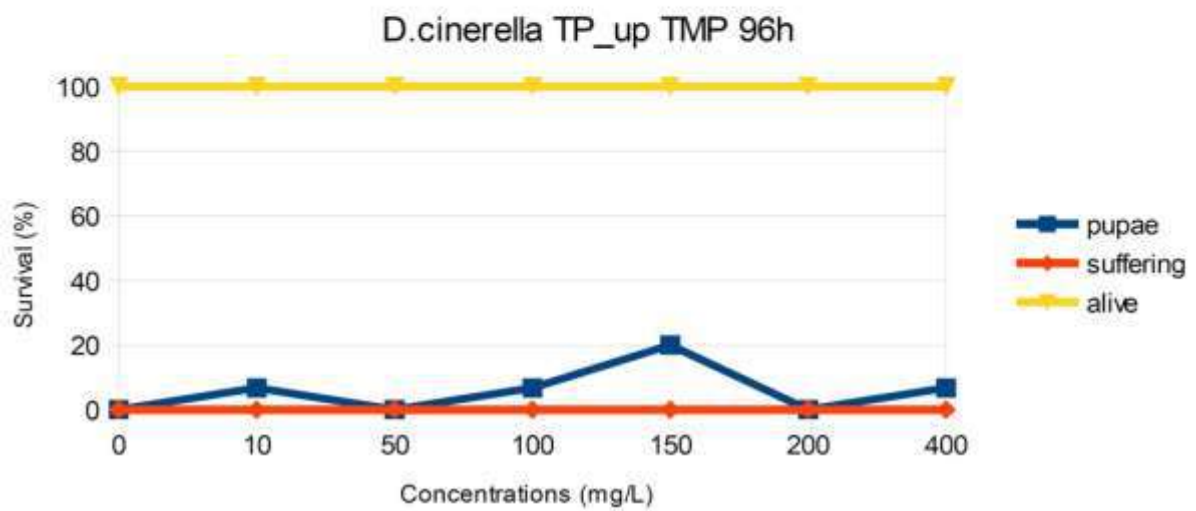
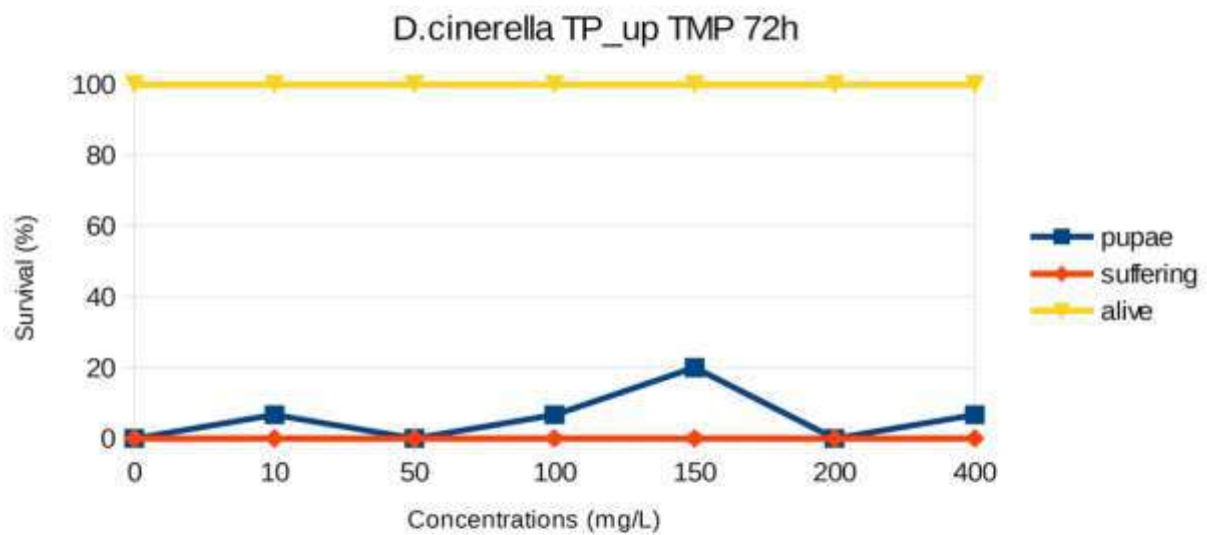
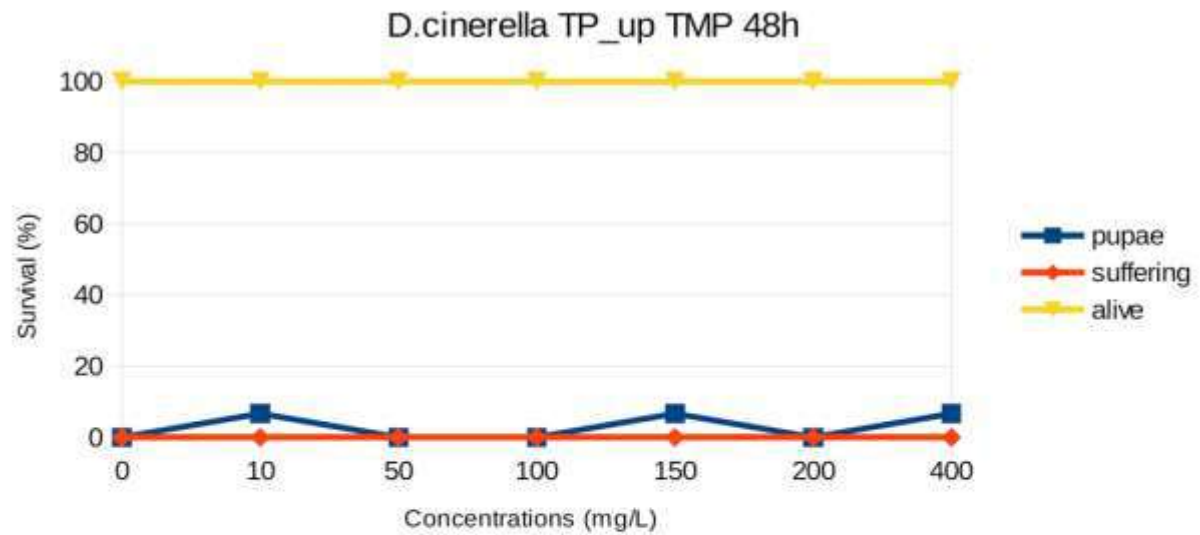


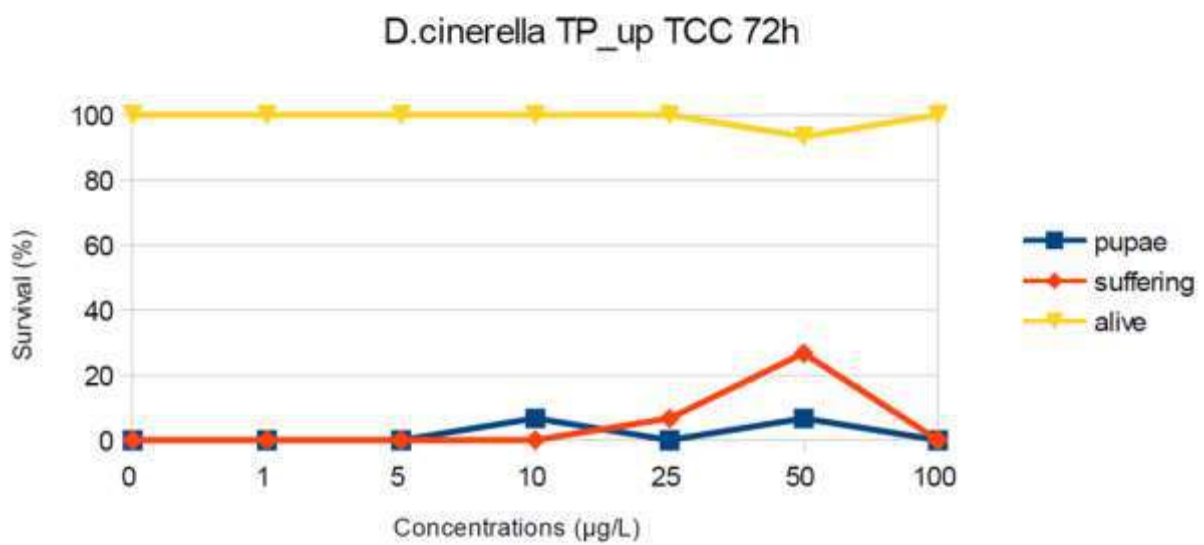
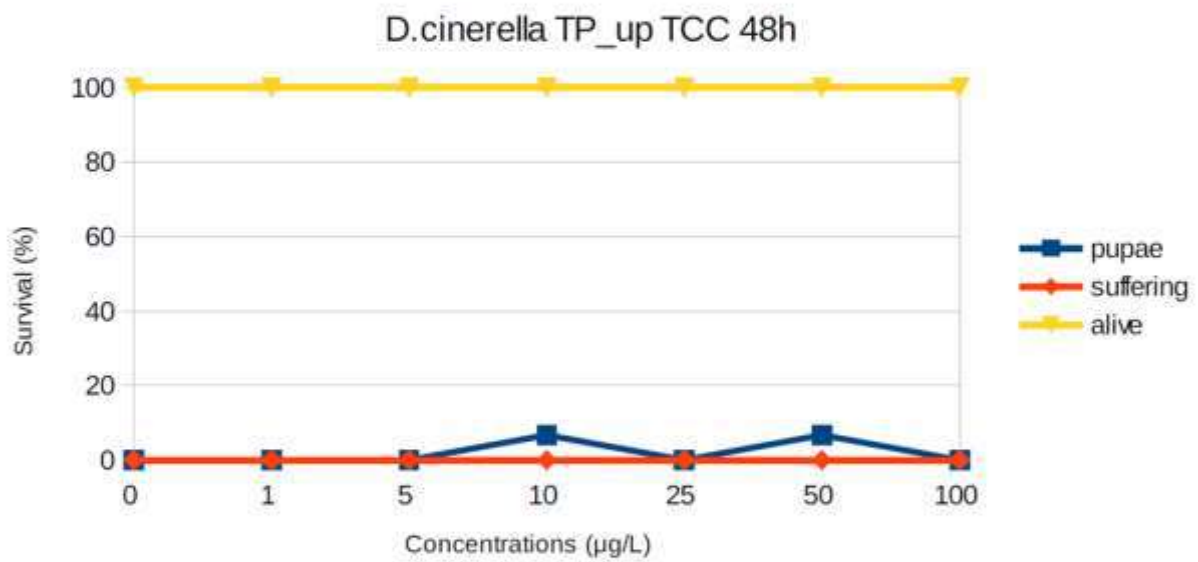
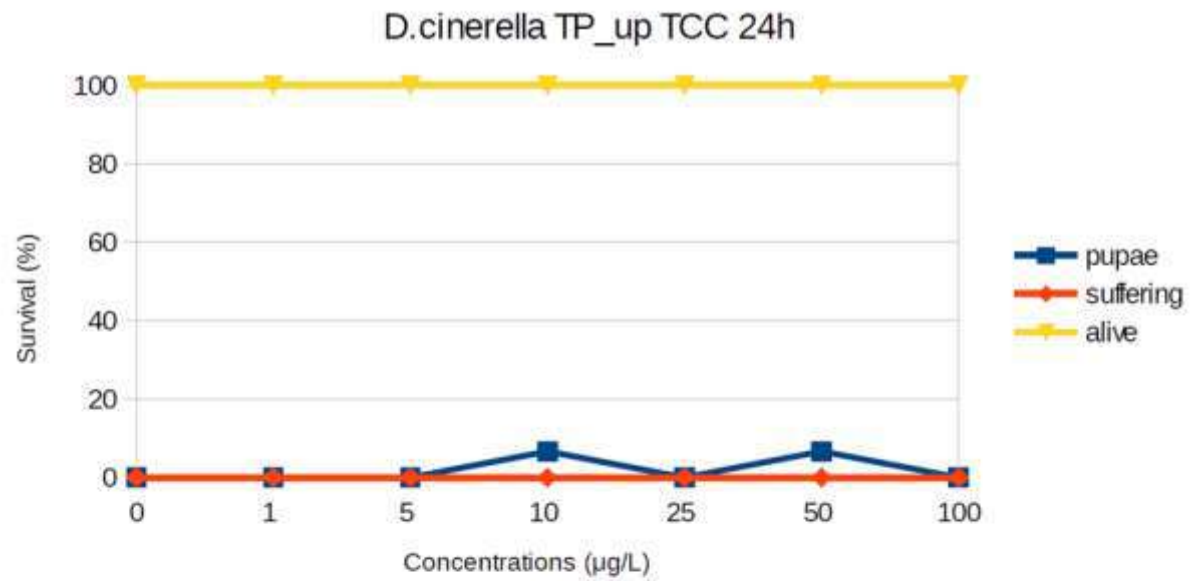
Figura A1-6 - Andamento di sopravvivenza di larve di *P. intricatus* e *D. alpinus* (PTv). Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, sofferenti e pupe.











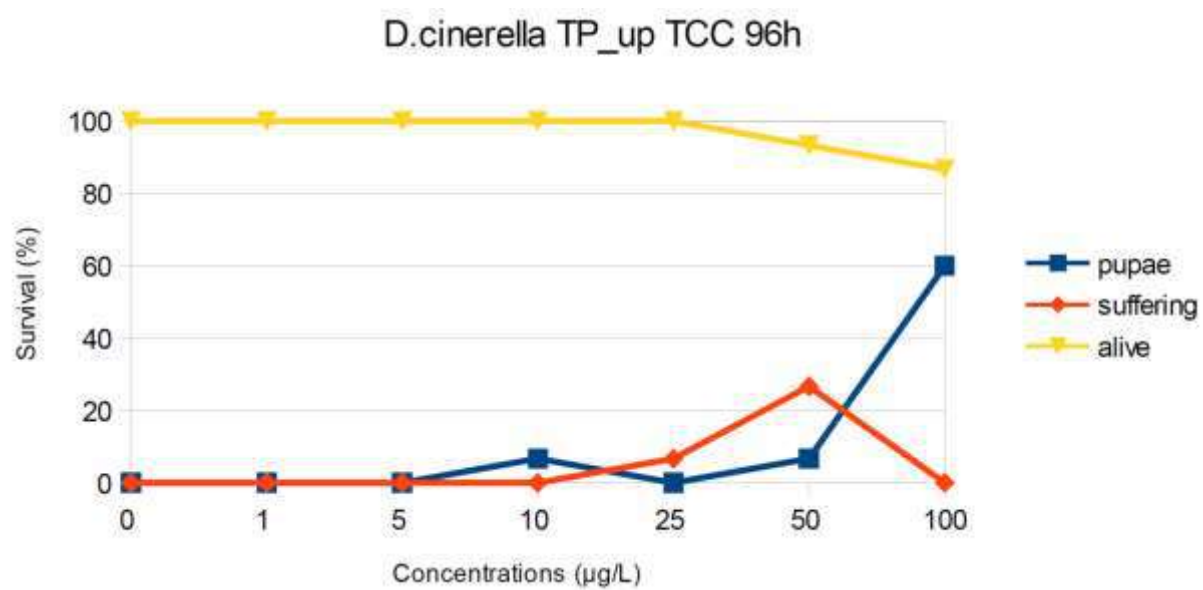
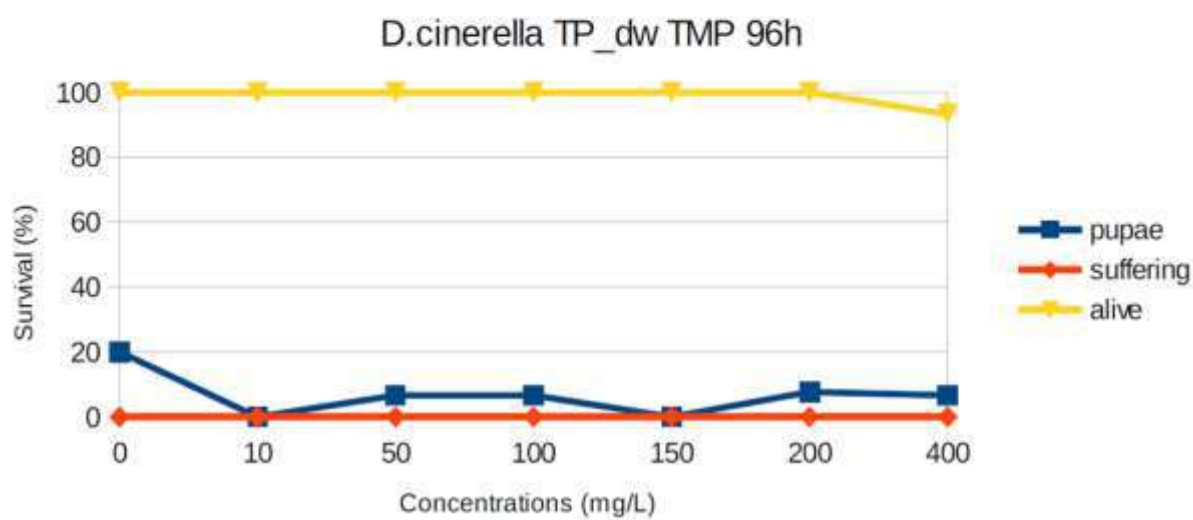
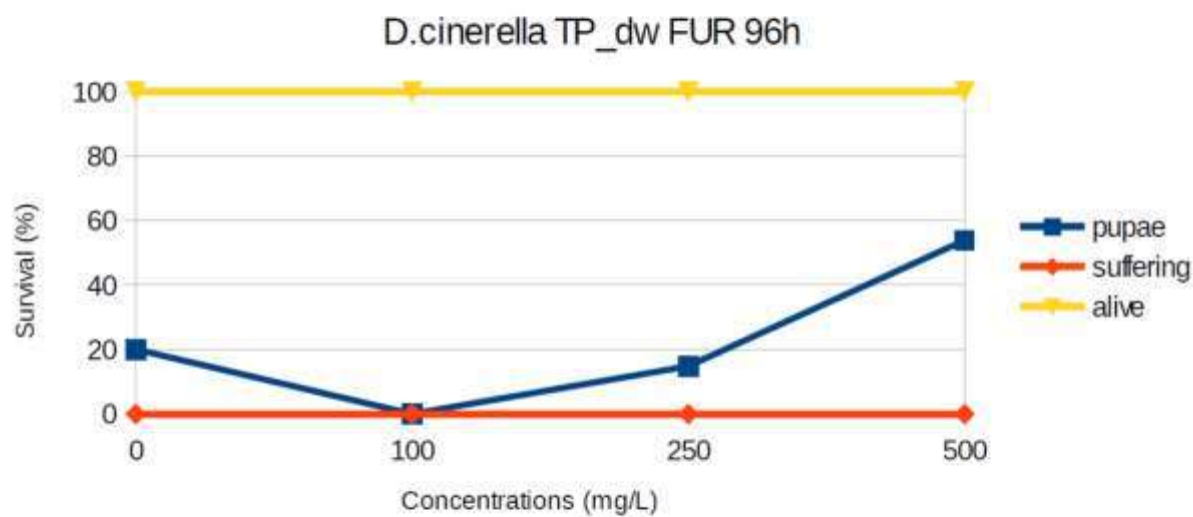
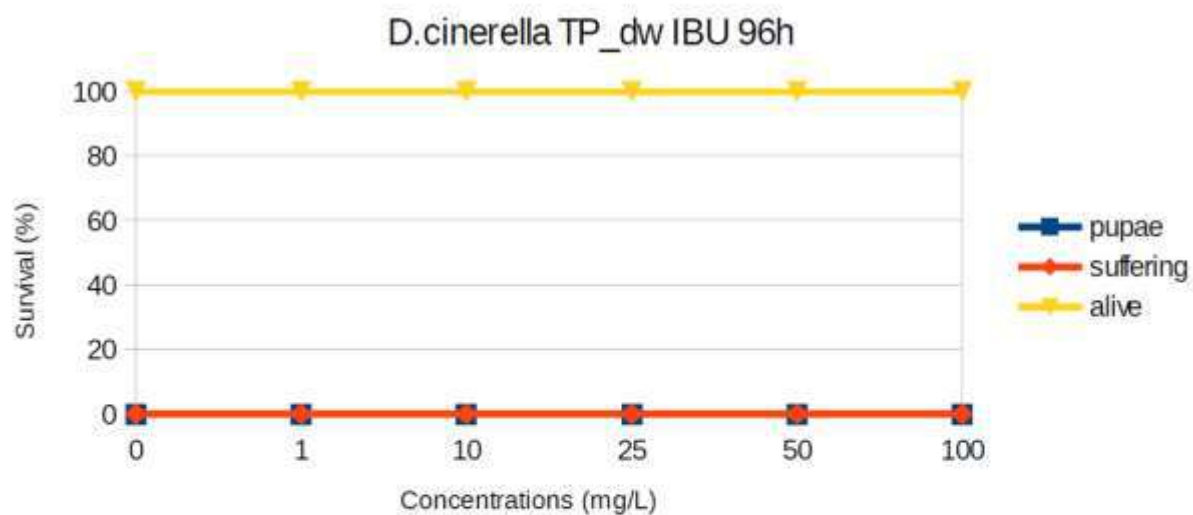


Figura A1-7 - Andamento di sopravvivenza di larve di *D. cinerella* (PTm). Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, sofferenti e pupe.



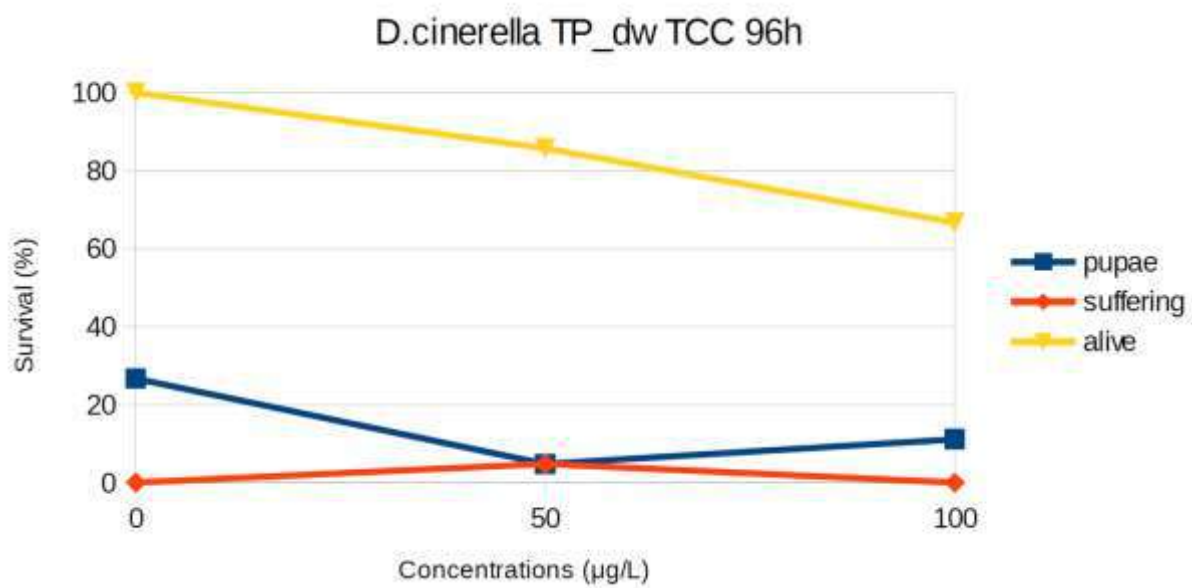
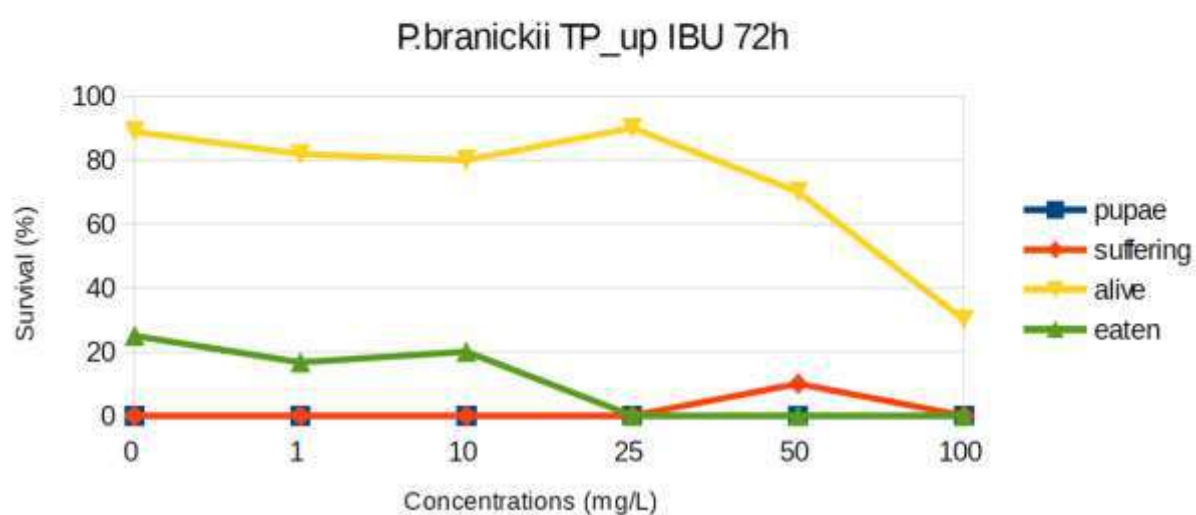
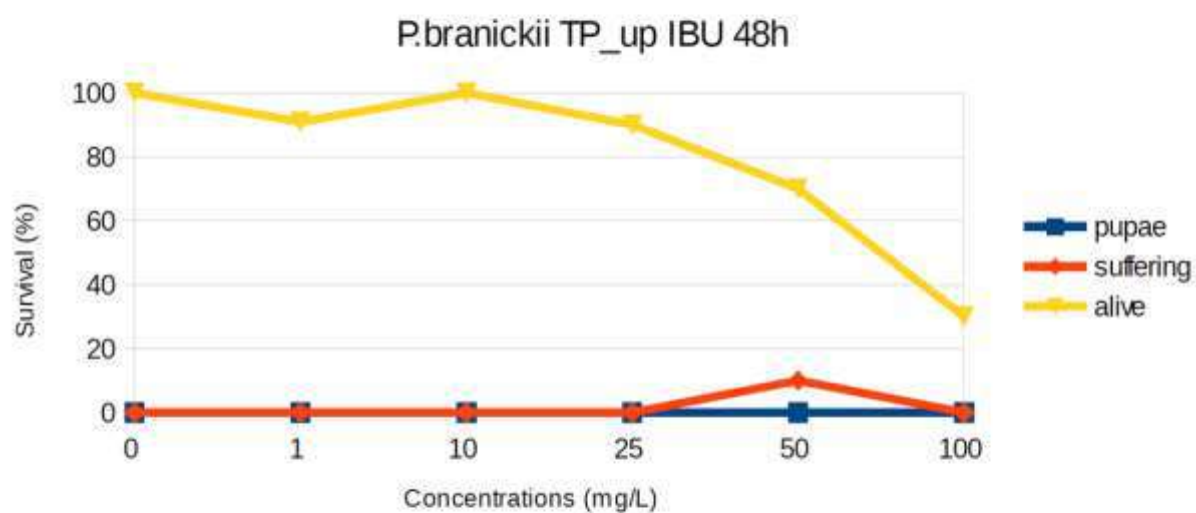
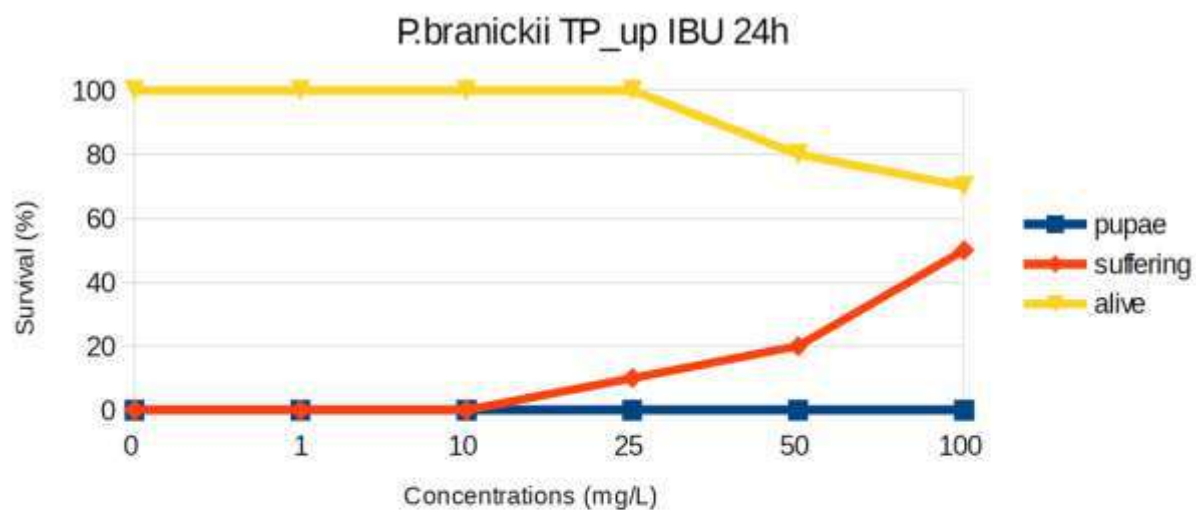
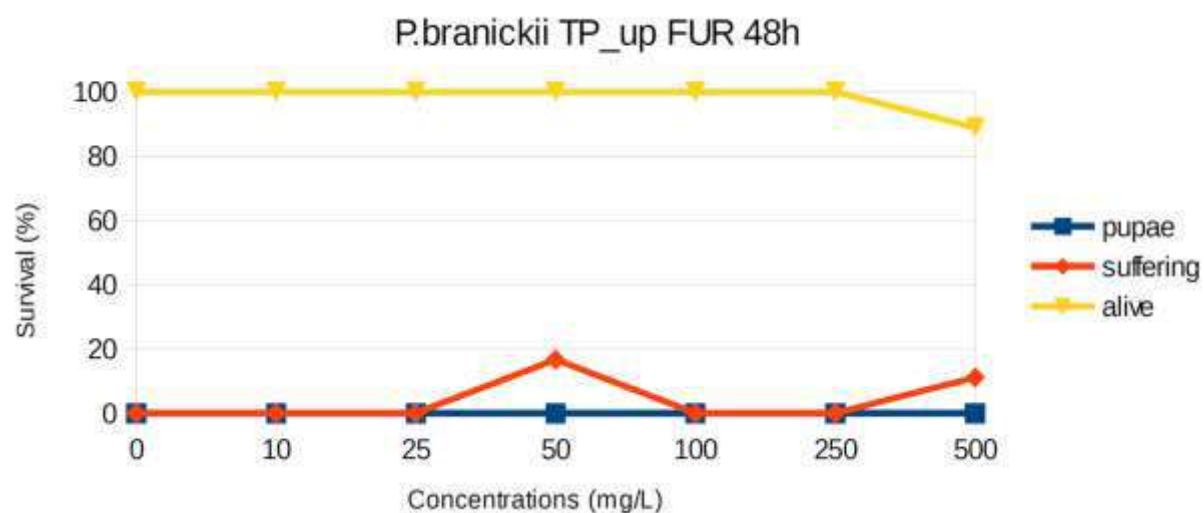
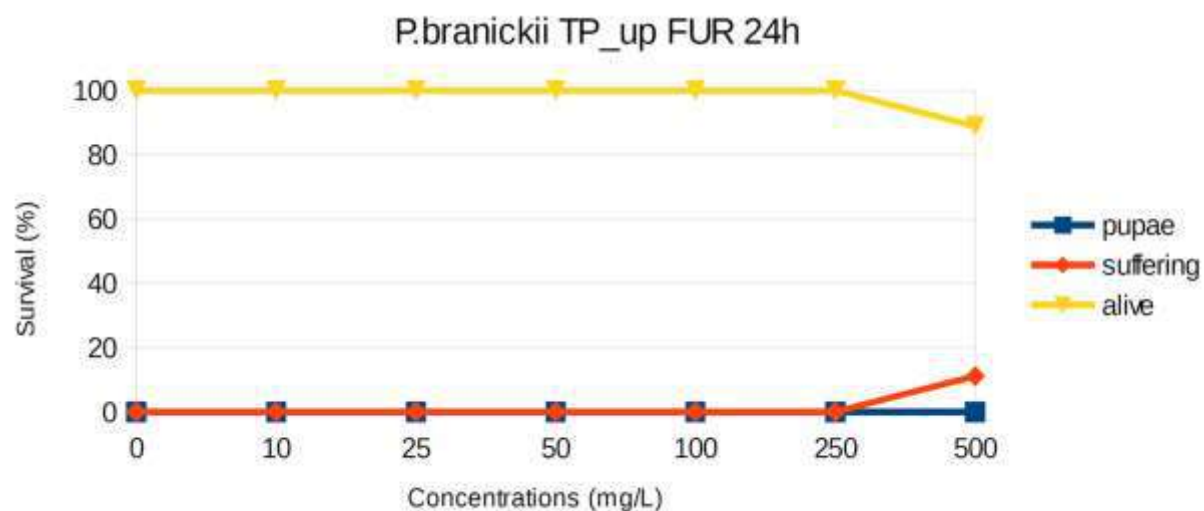
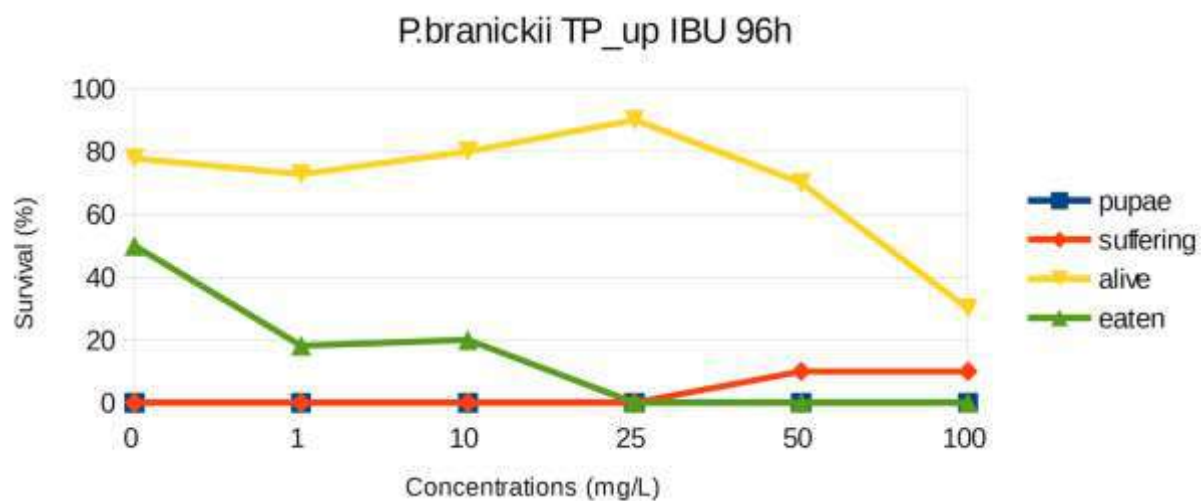
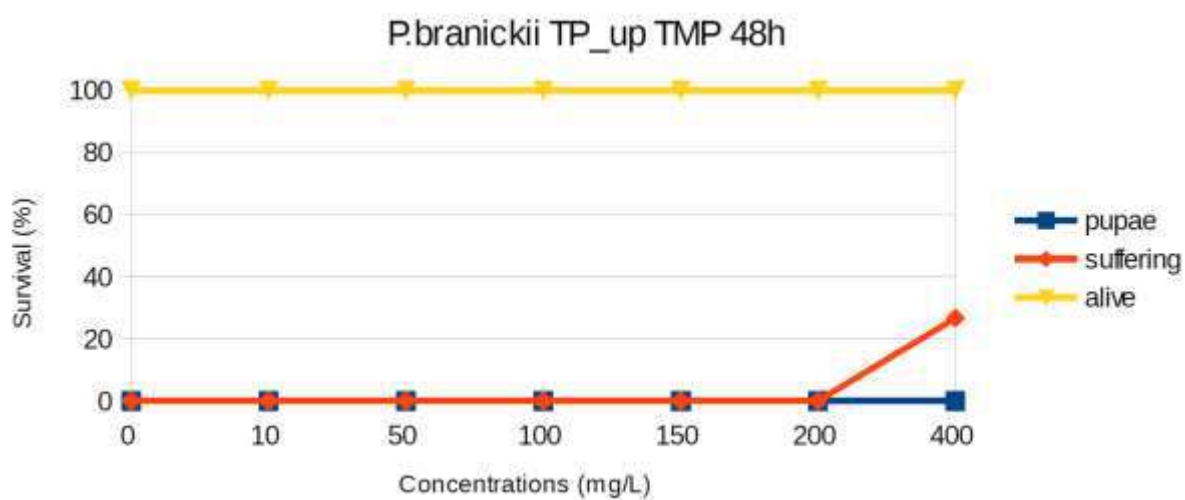
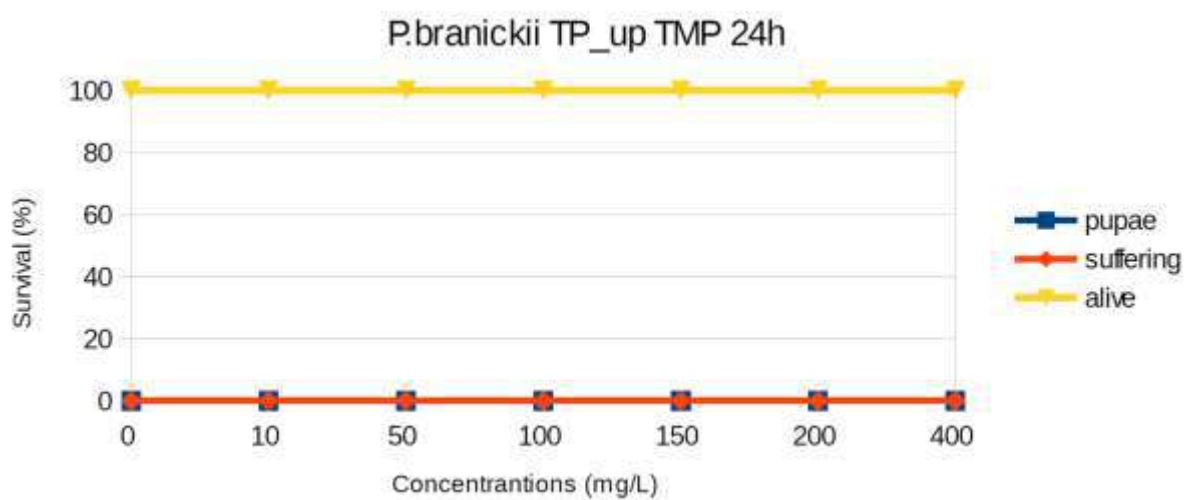
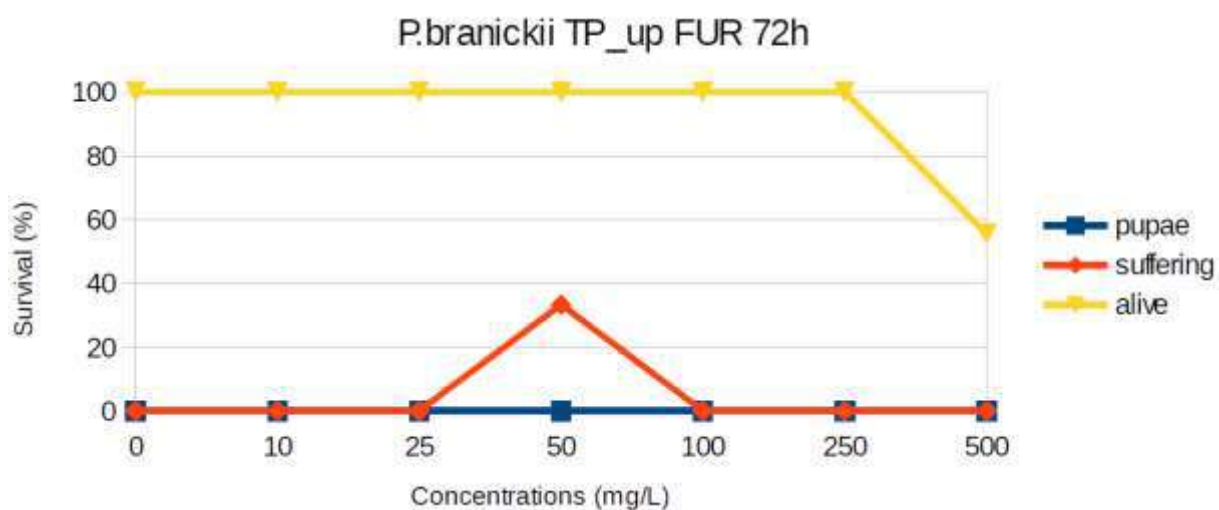
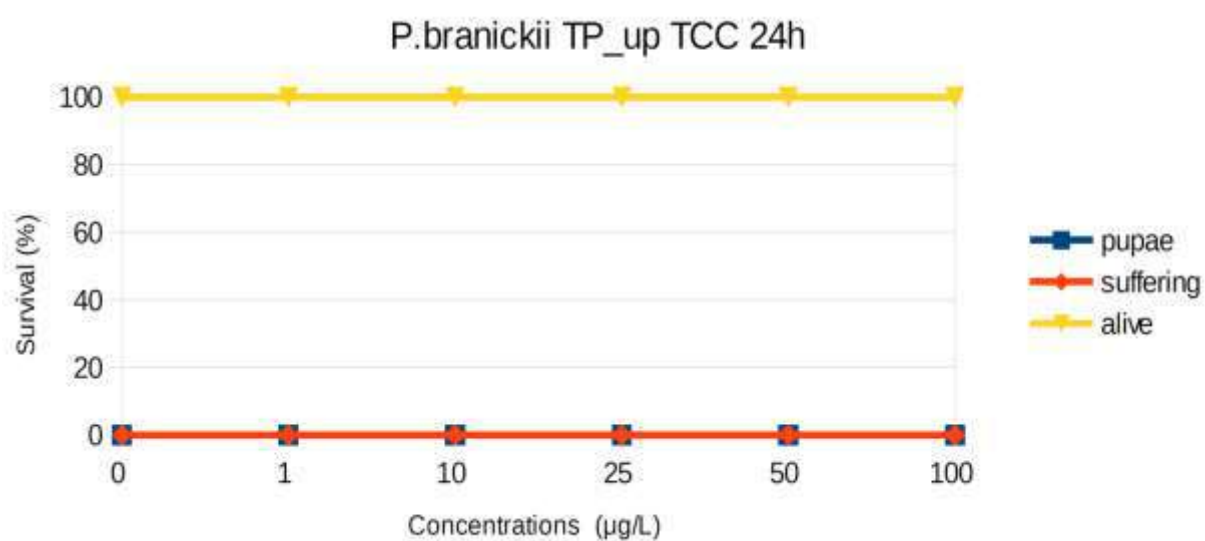
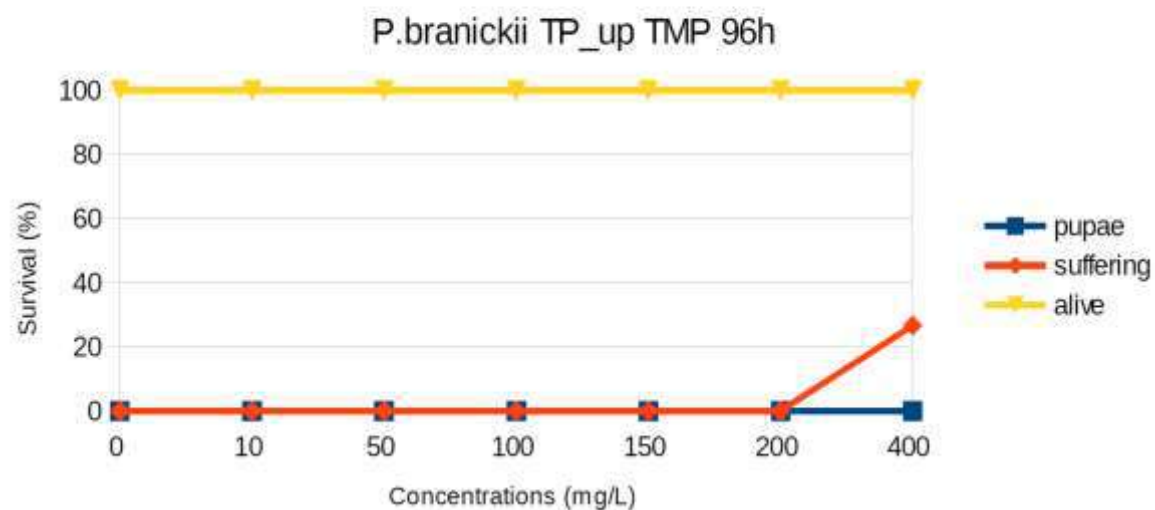
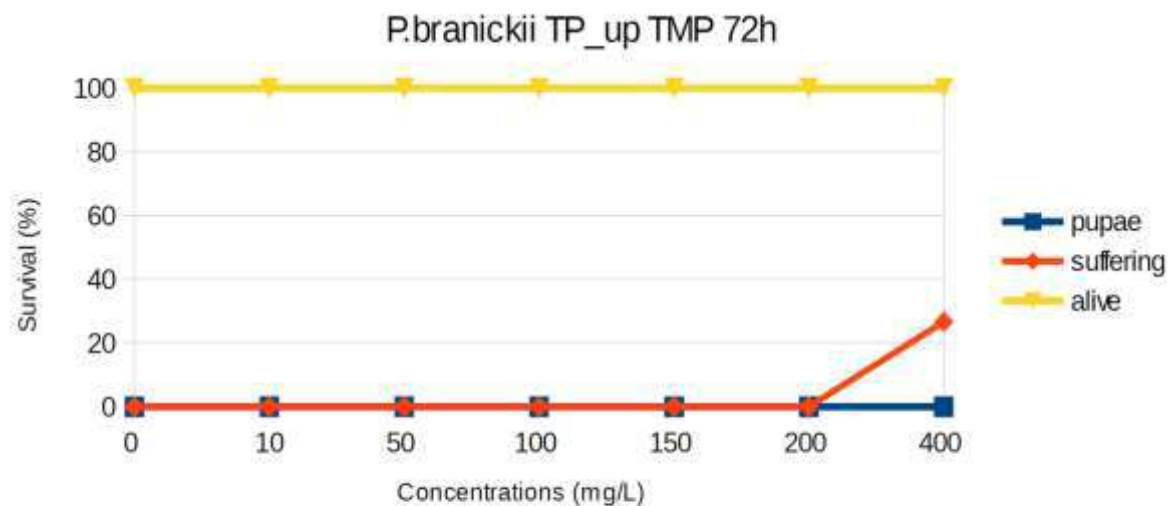


Figura A1-8 - Andamento di sopravvivenza di larve di *D. cinerella* (PTv). Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, sofferenti e pupe.









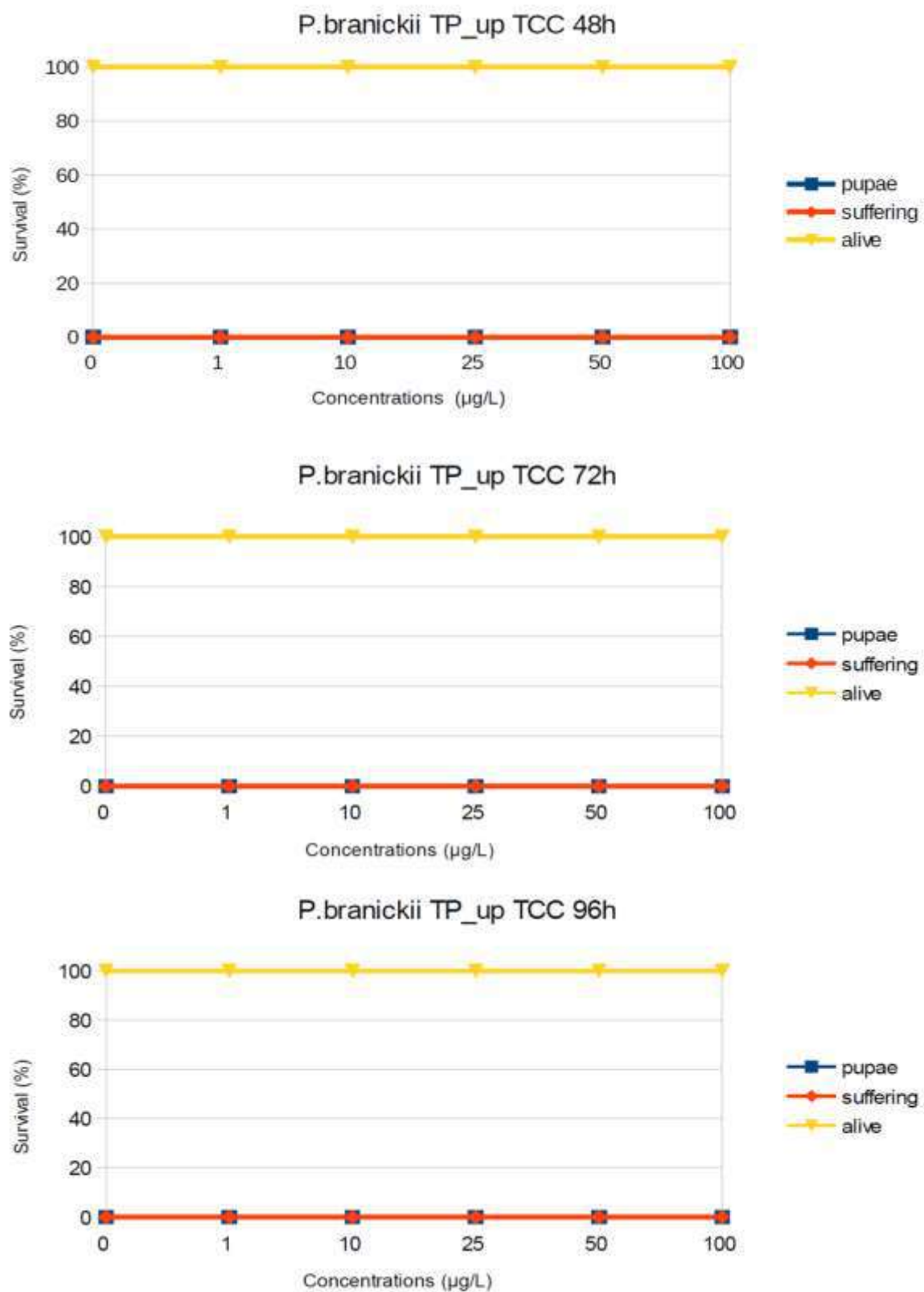
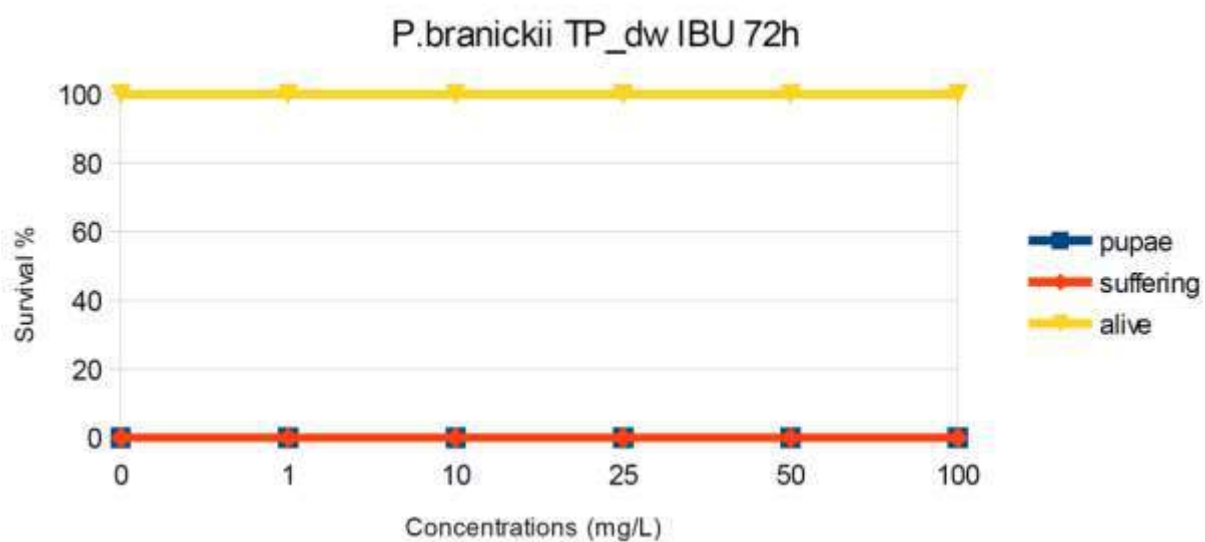
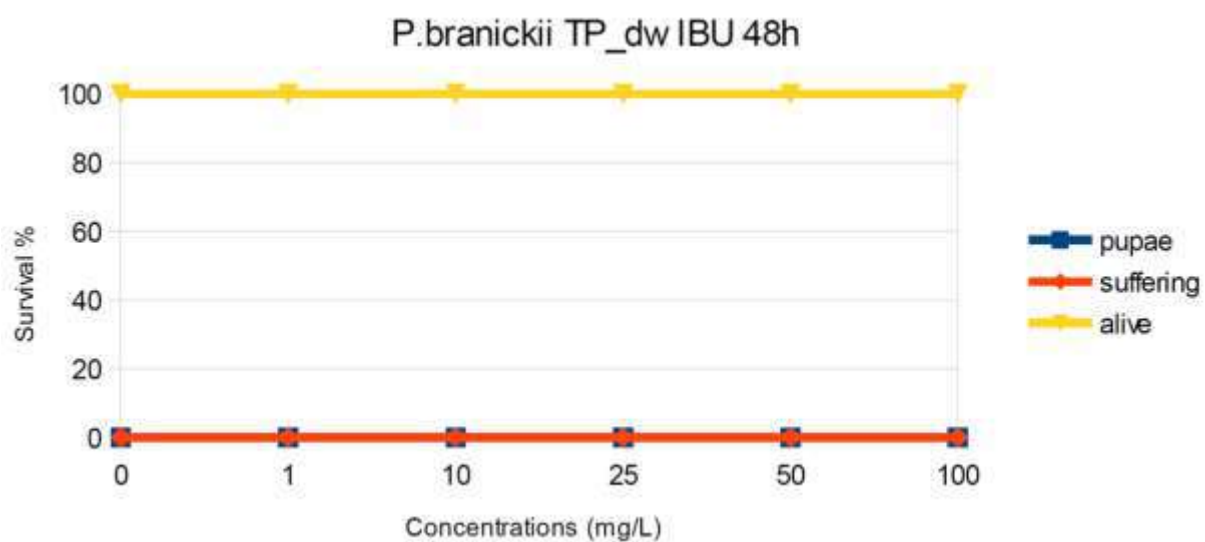
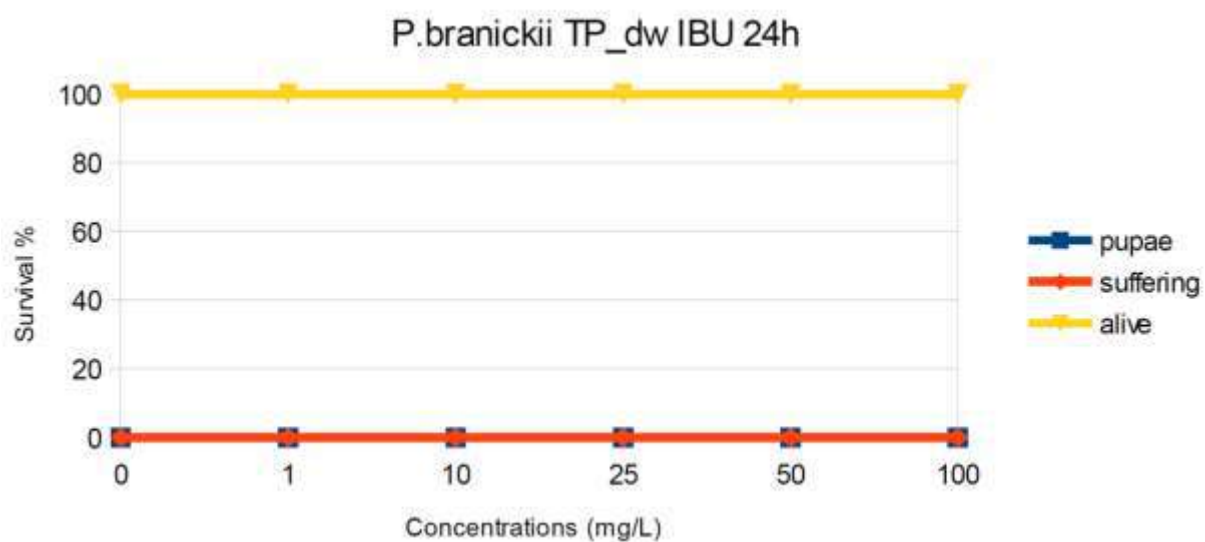
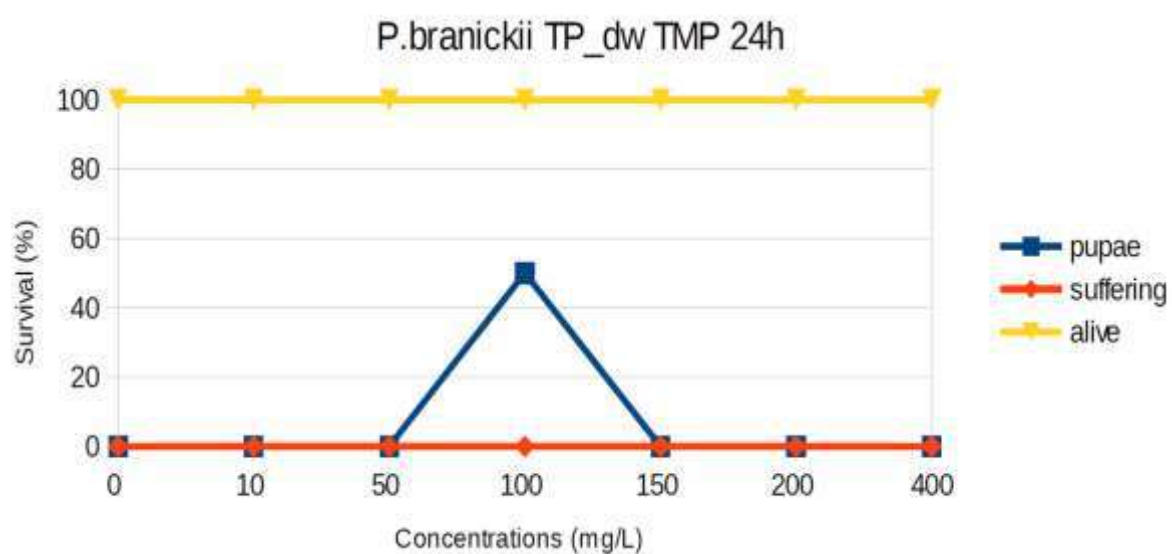
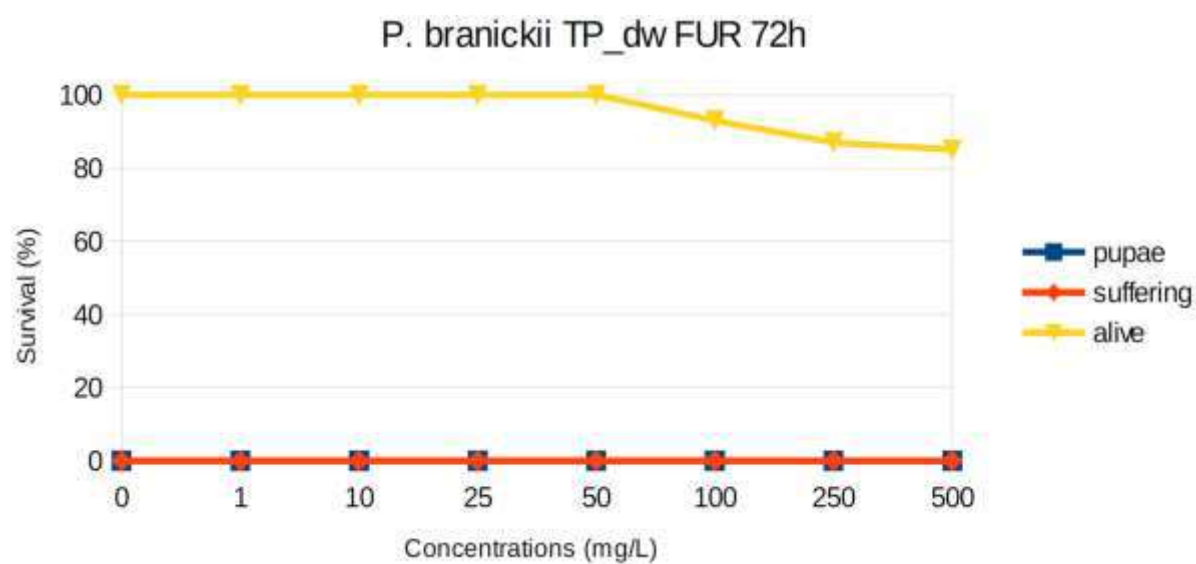
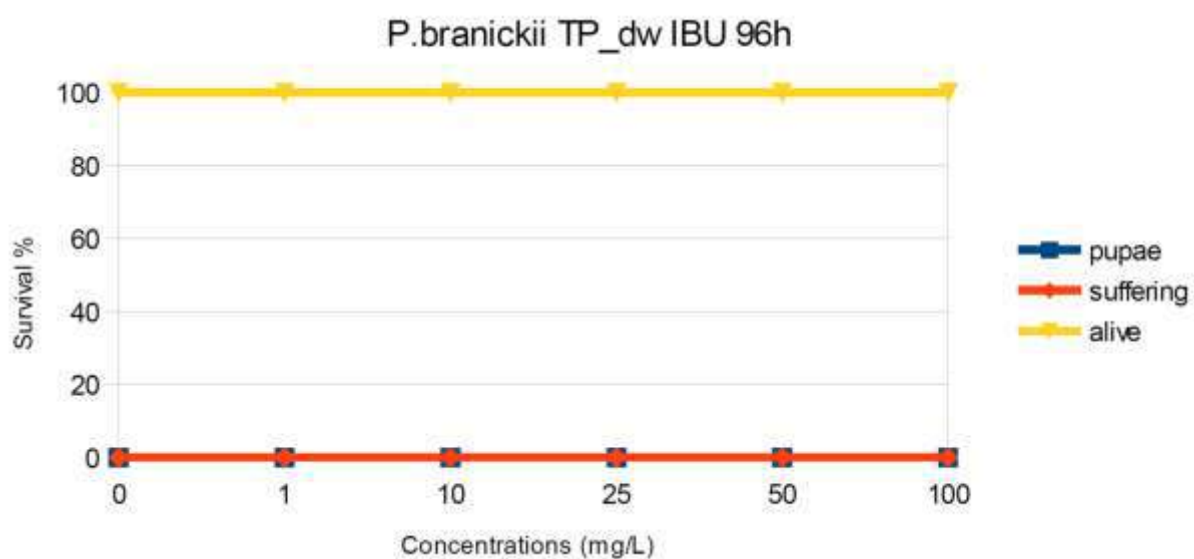
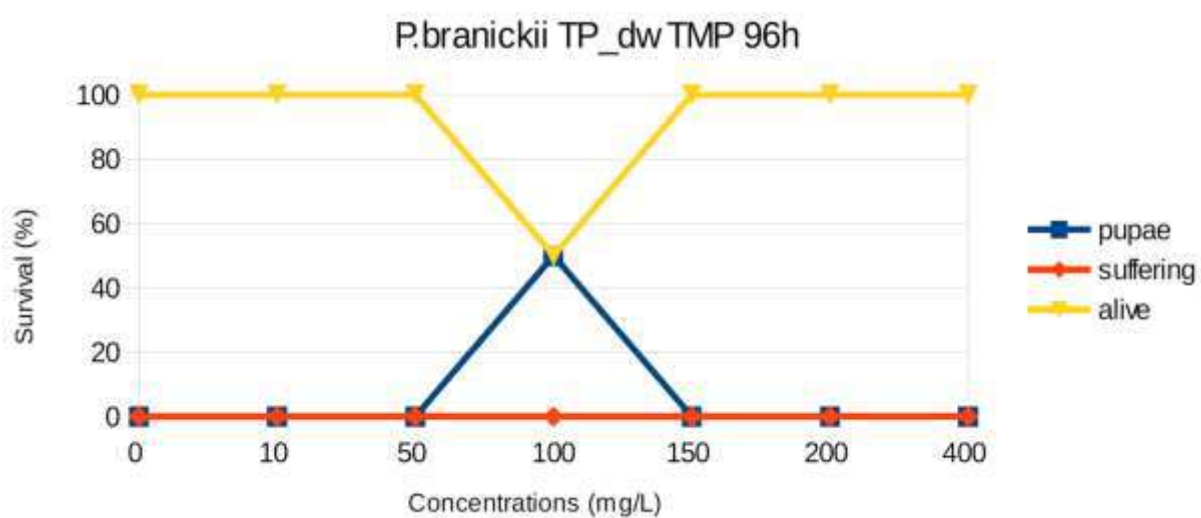
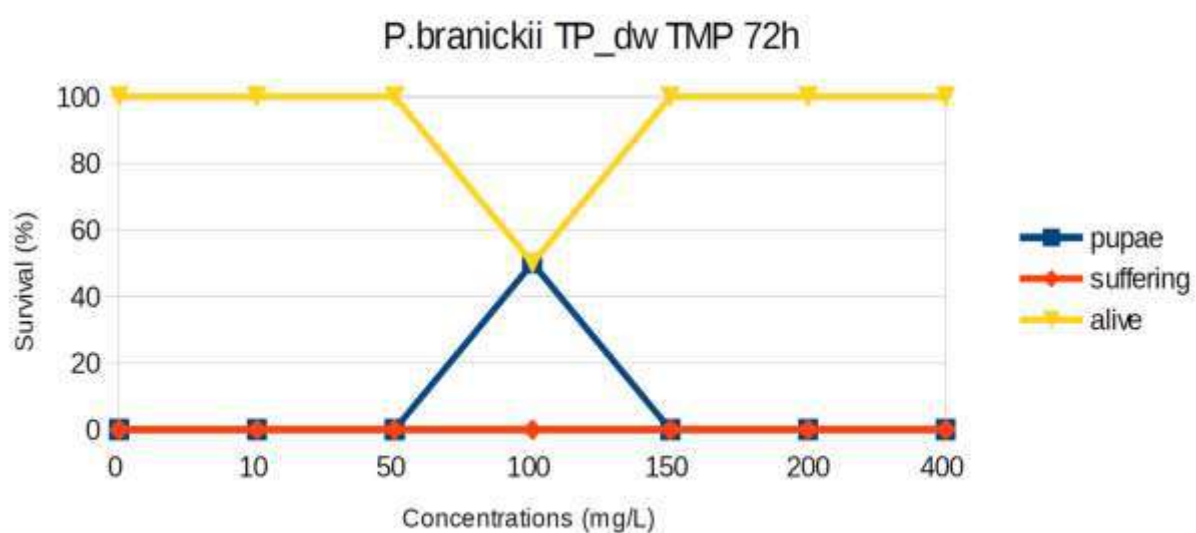
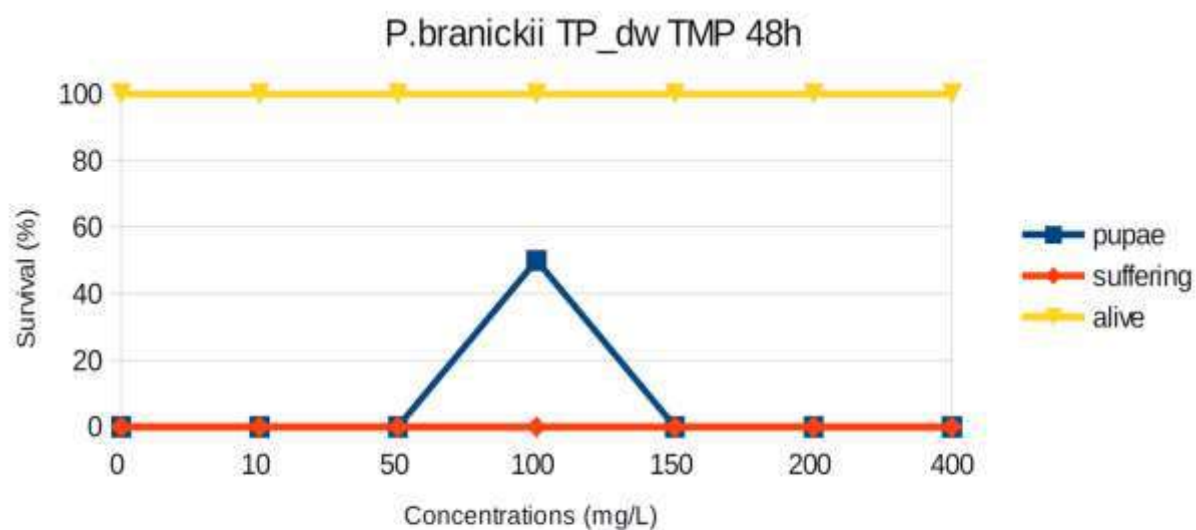
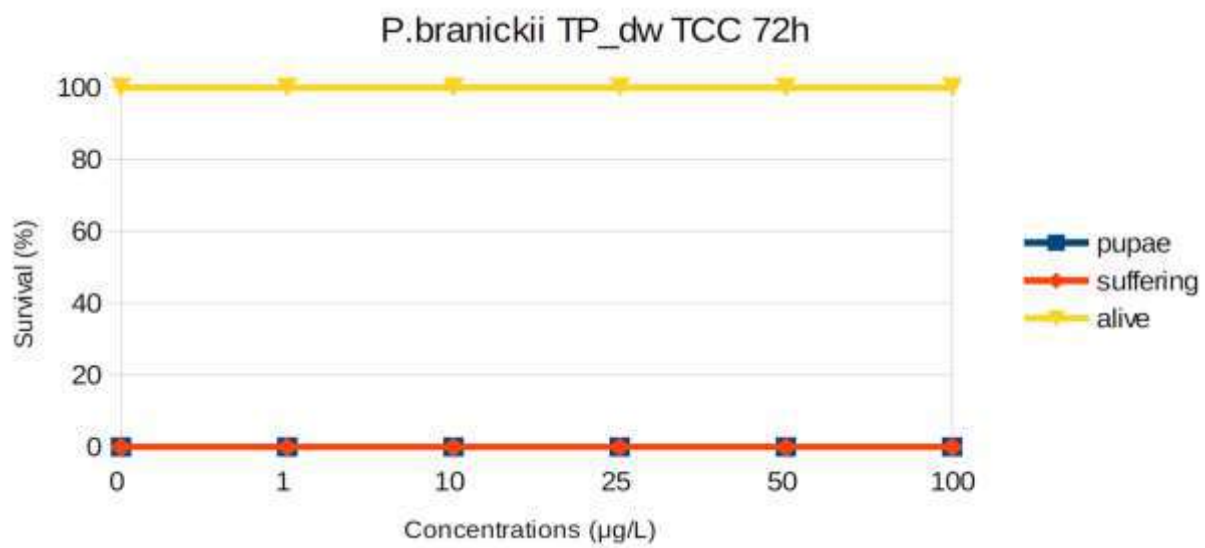
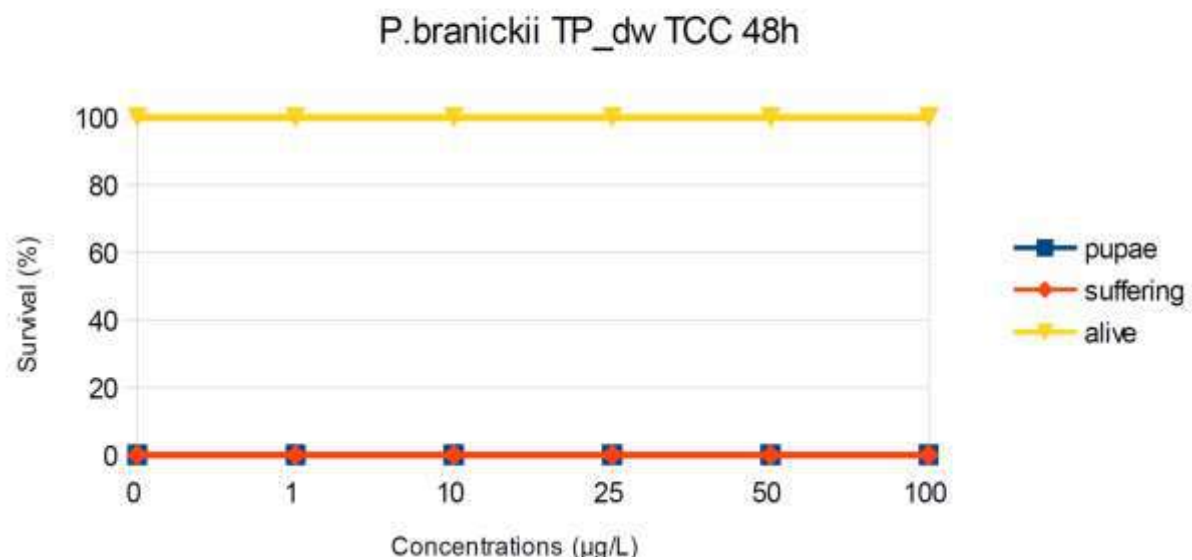
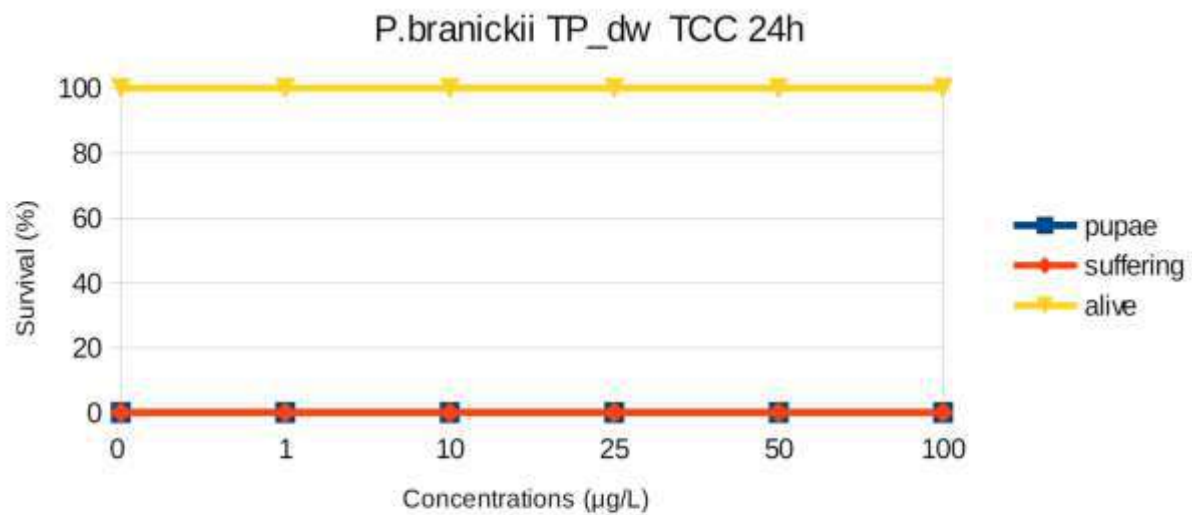


Figura A1-9 - Andamento di sopravvivenza di larve di *P. branickii* (PTm). Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, sofferenti e pupe.









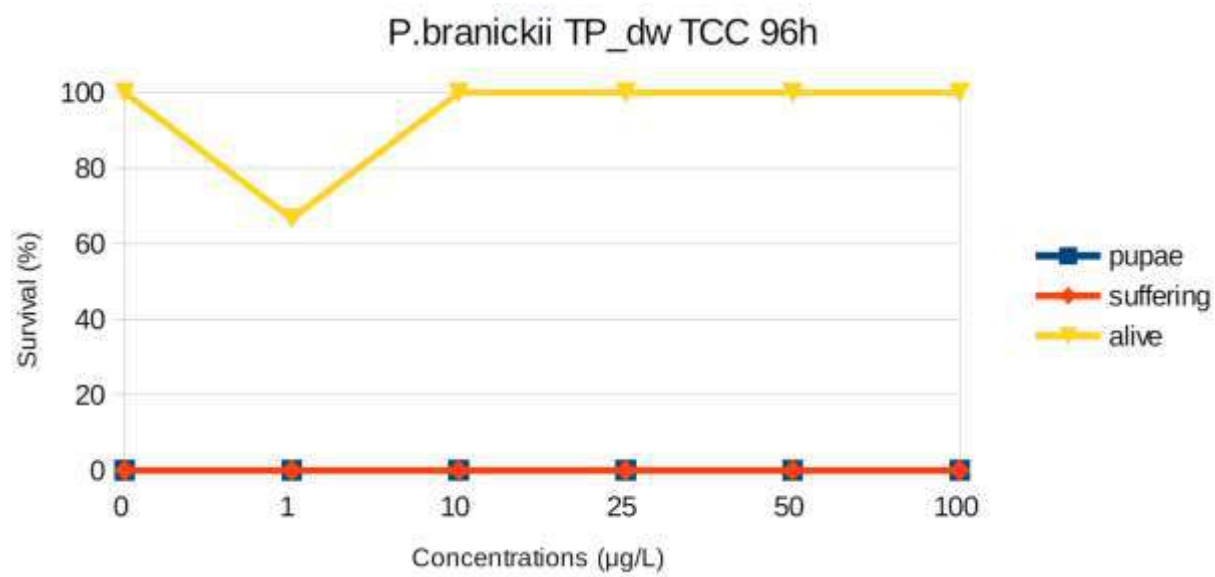
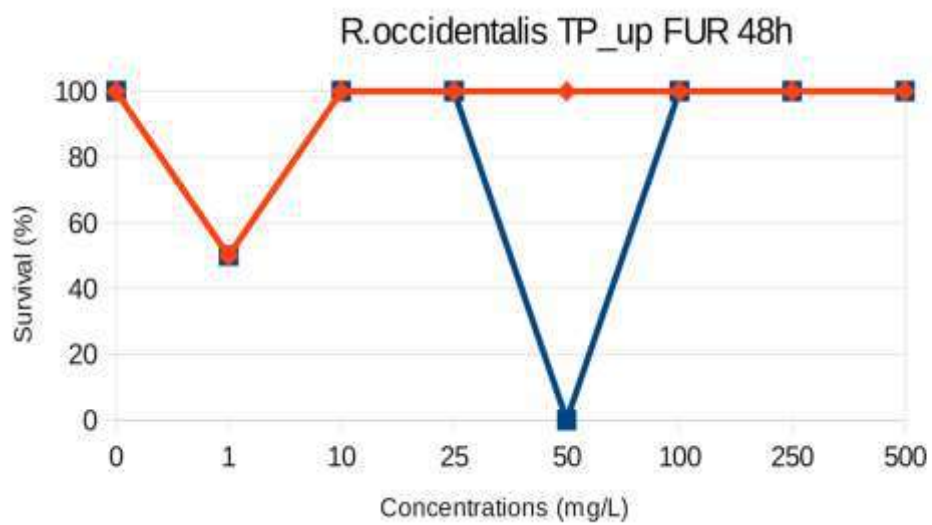
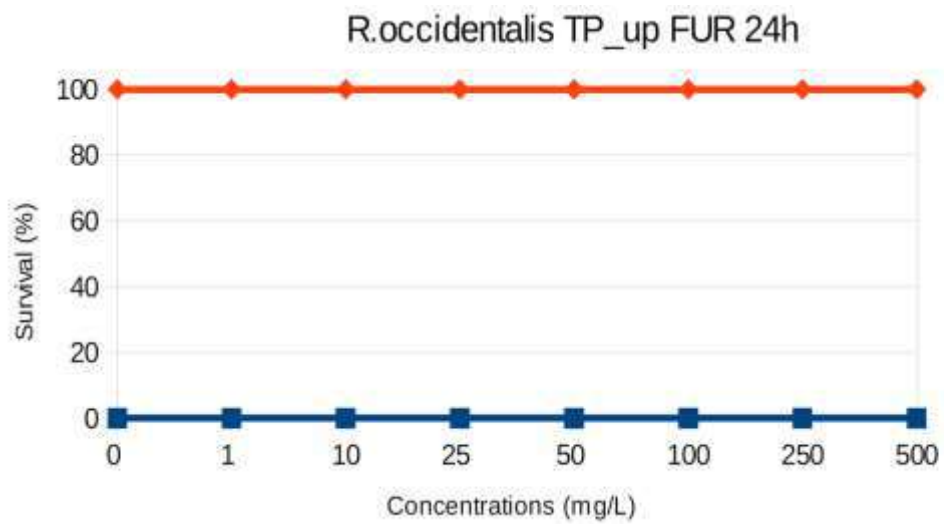
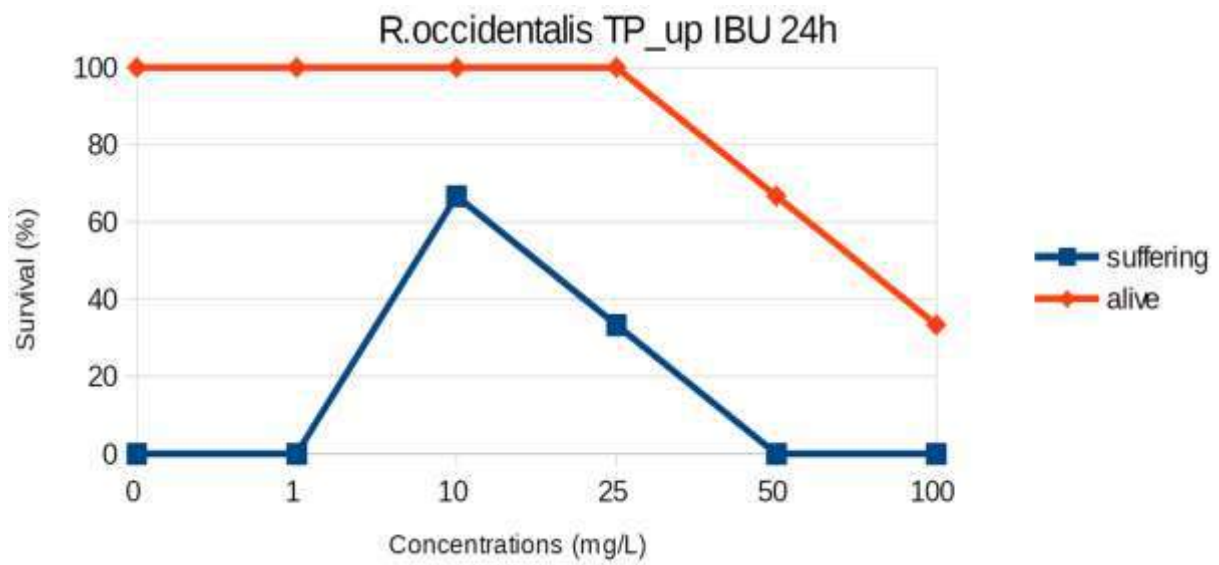


Figura 106 - Andamento di sopravvivenza di larve di *P. branickii* (PTv). Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, sofferenti e pupe.



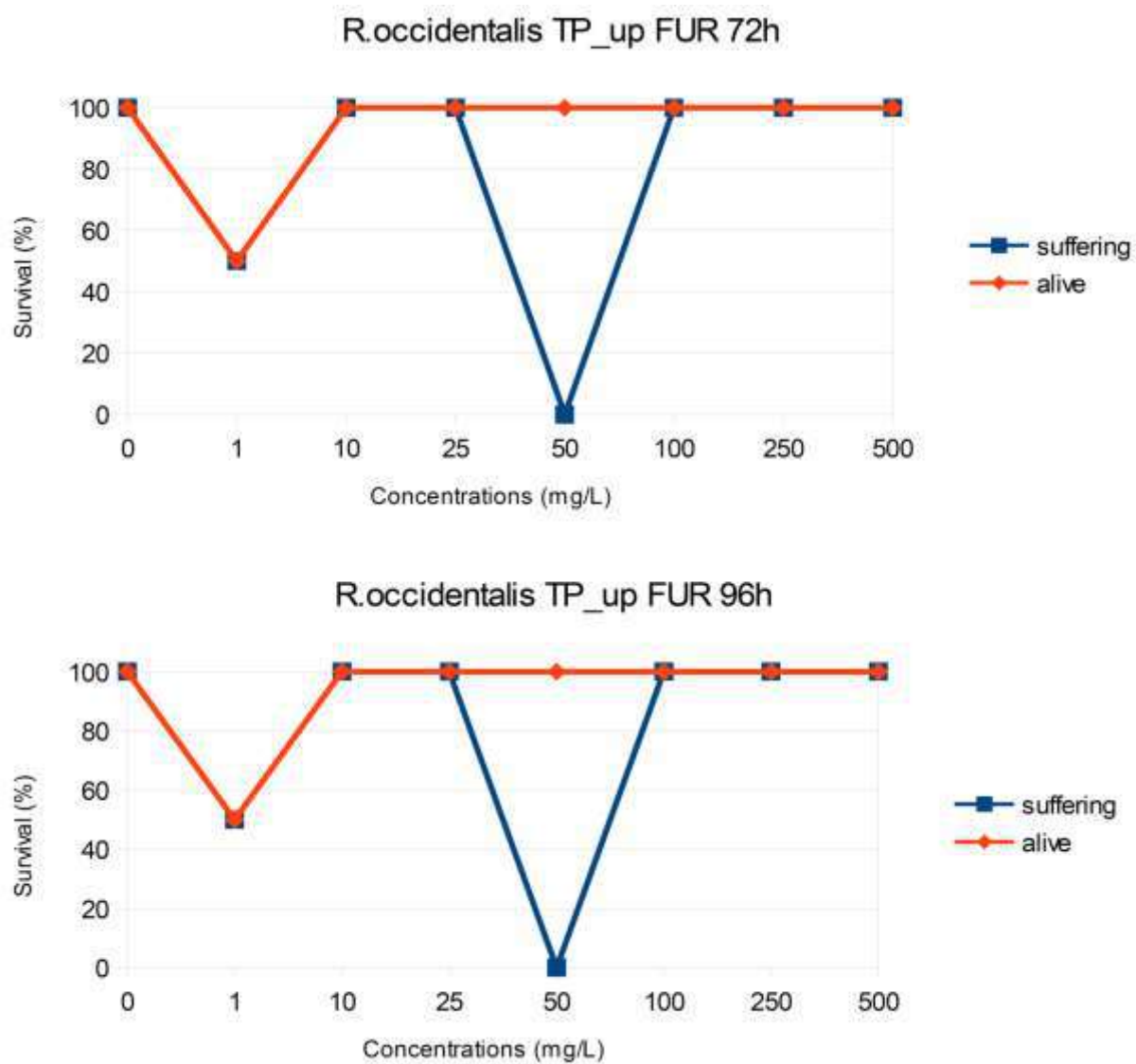


Figura A1-11107 - - Andamento di sopravvivenza di larve di *R. occidentalis* (PTm). Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, sofferenti e pupe.

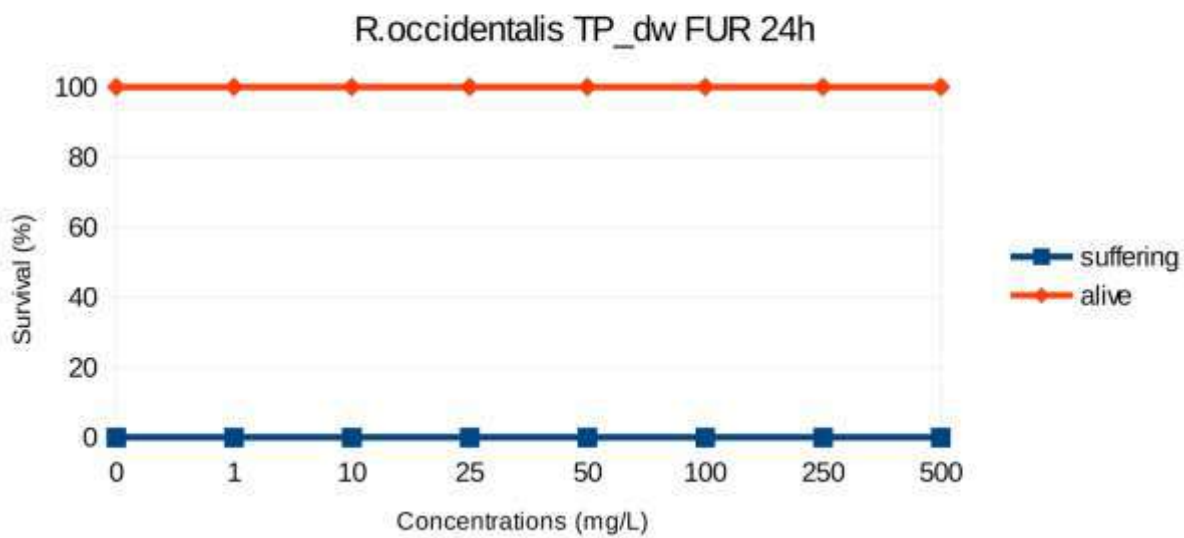
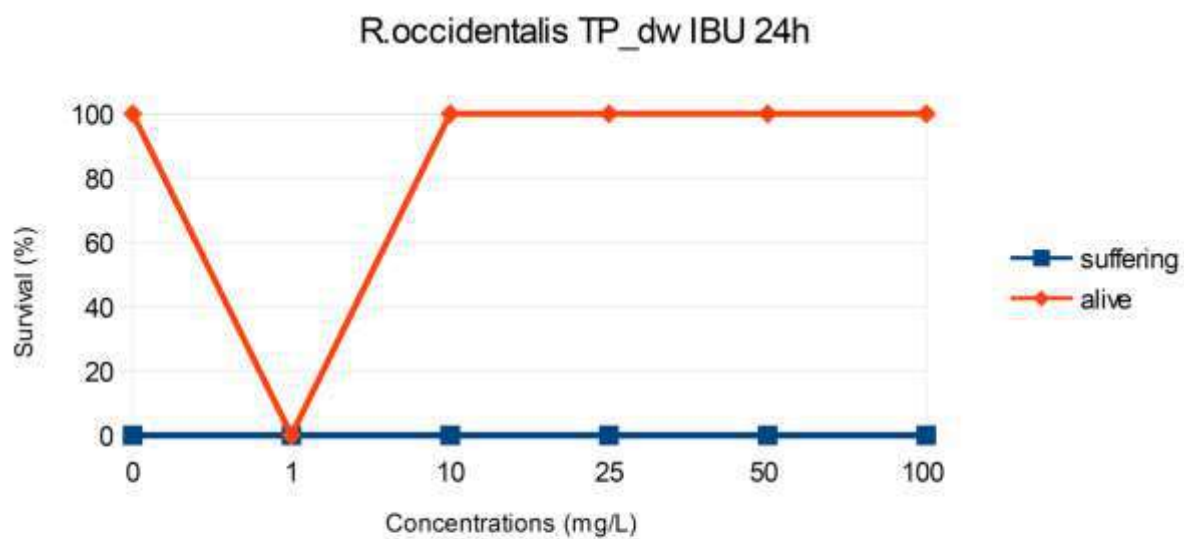
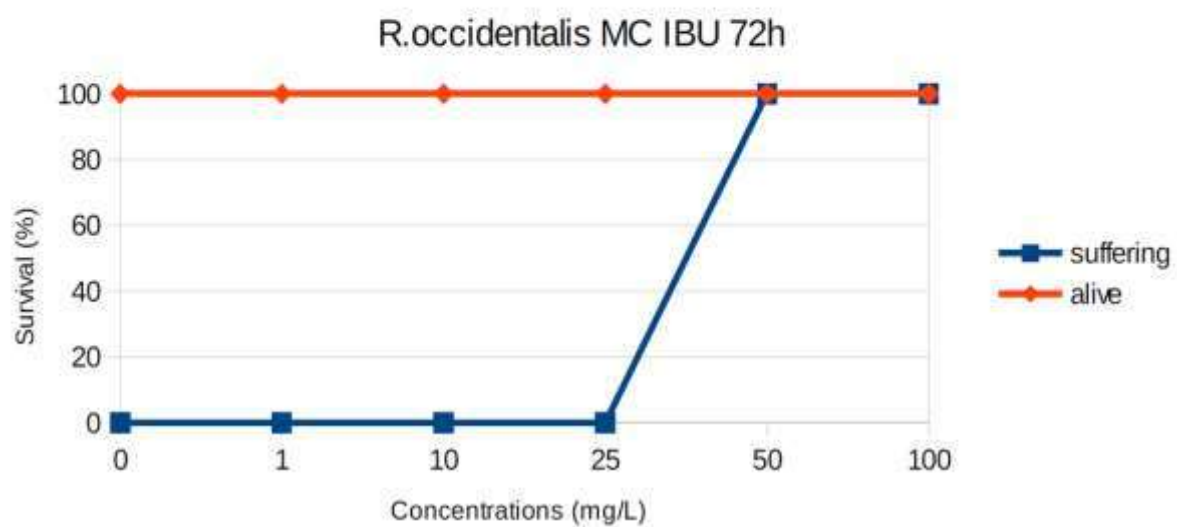
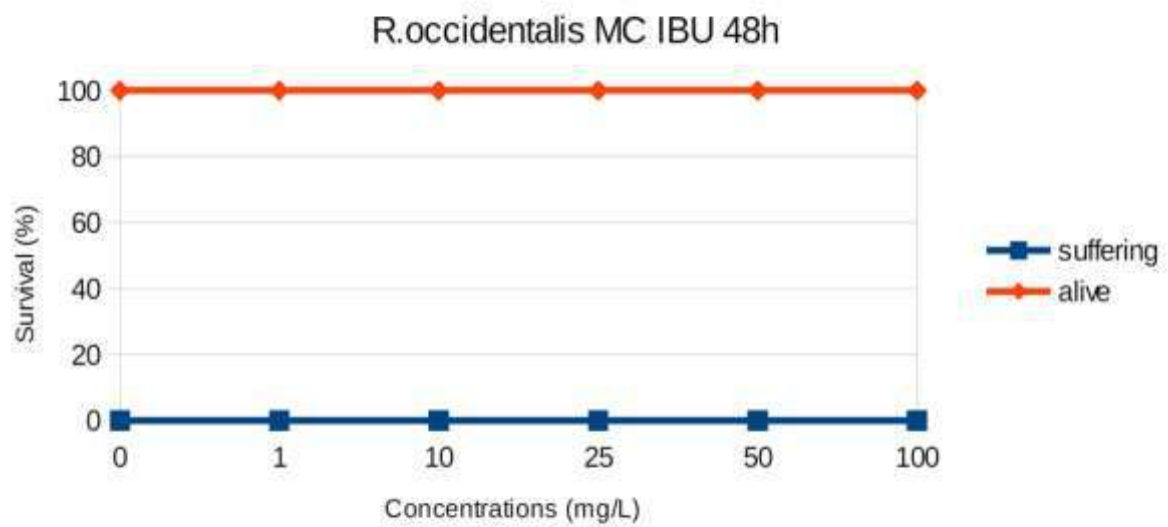
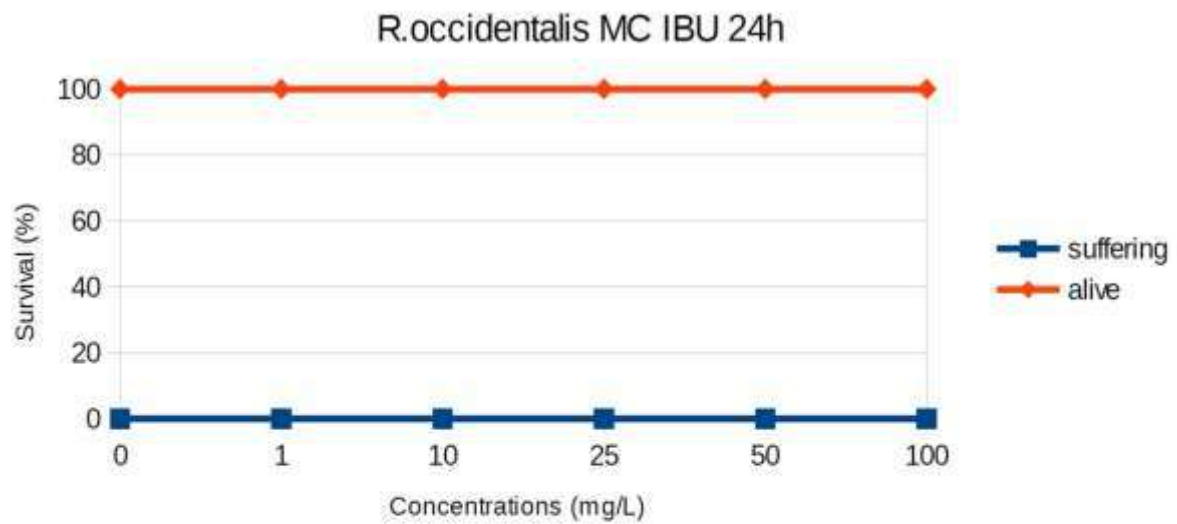
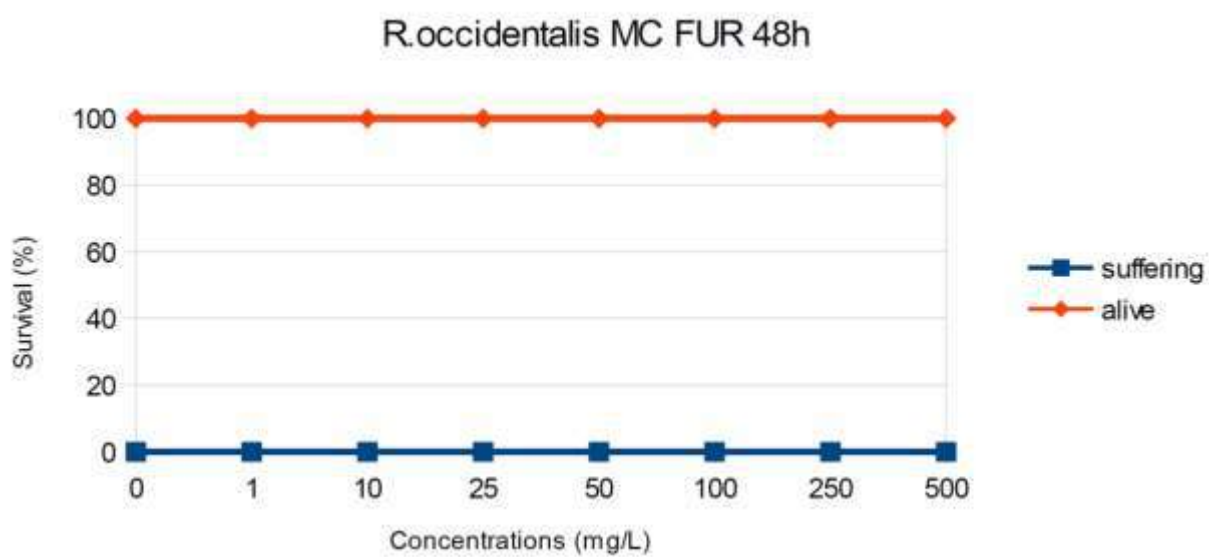
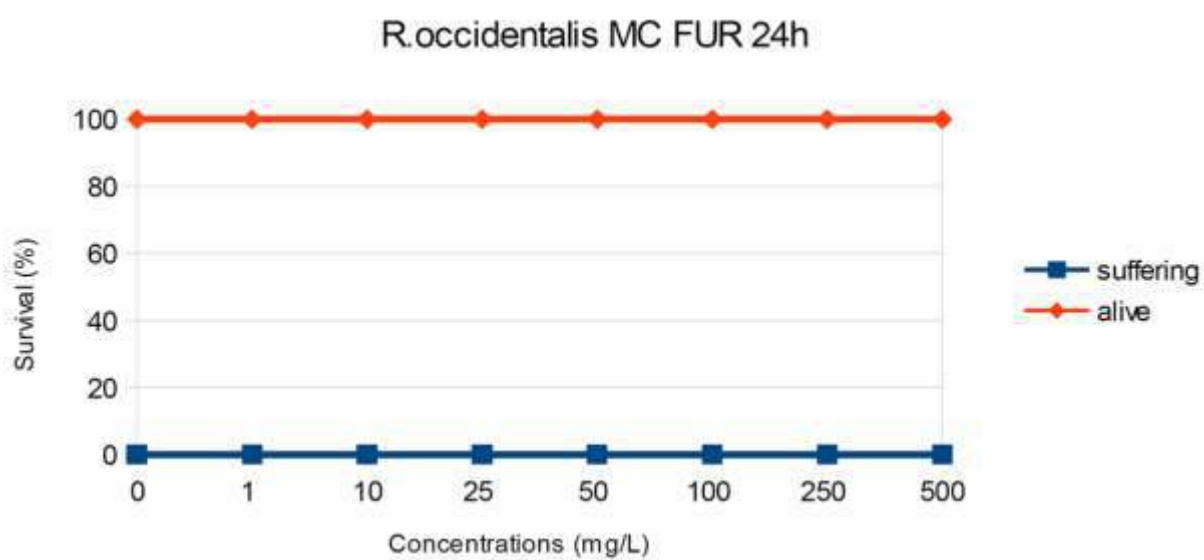
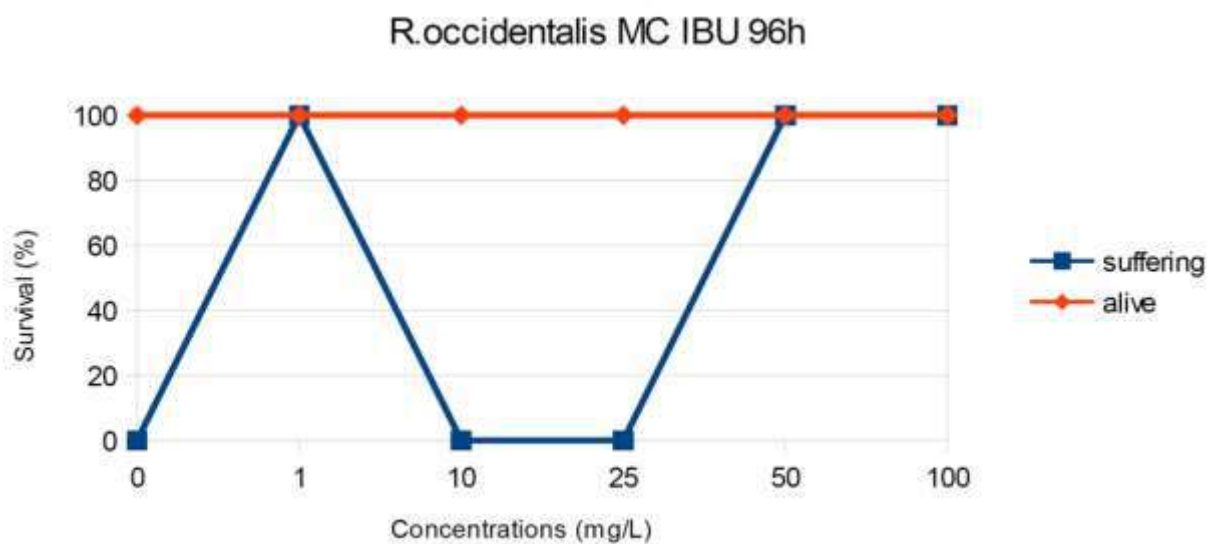


Figura A1-12108 - Andamento di sopravvivenza di larve di *R. occidentalis* (PTv). Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi e sofferenti.





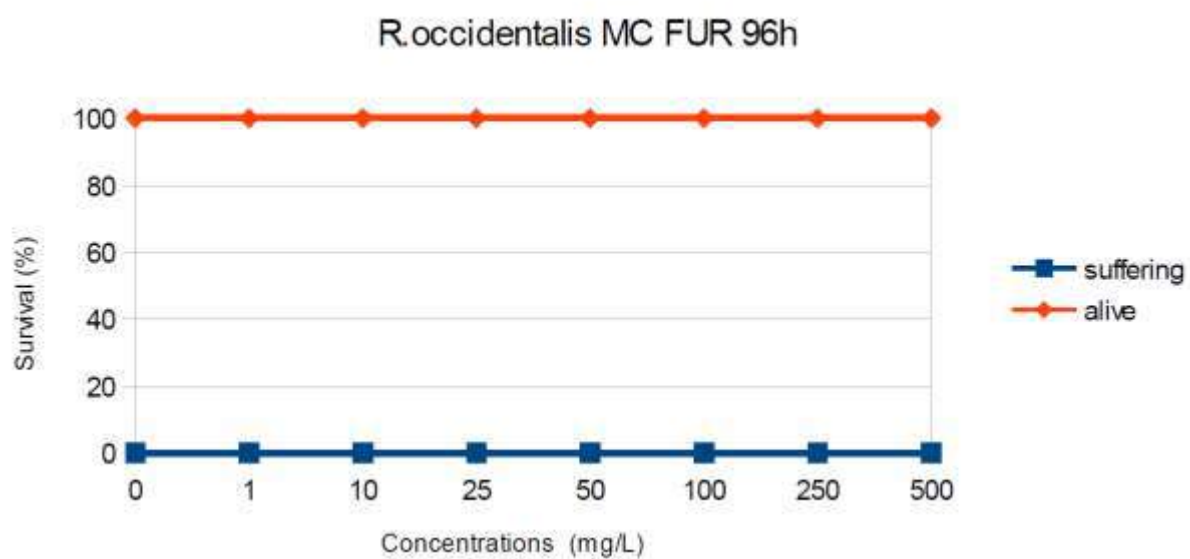
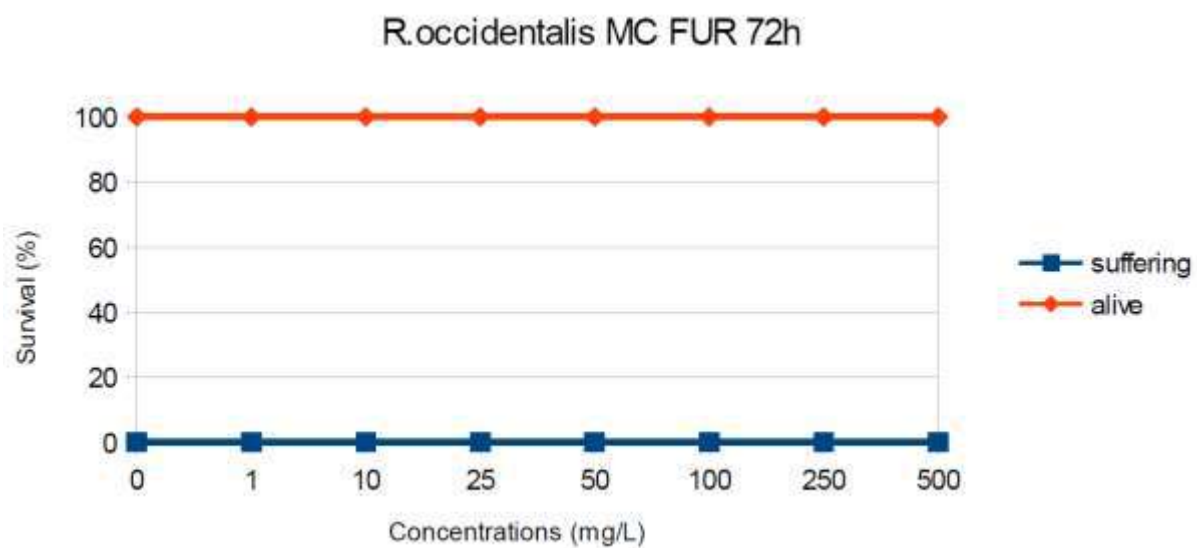
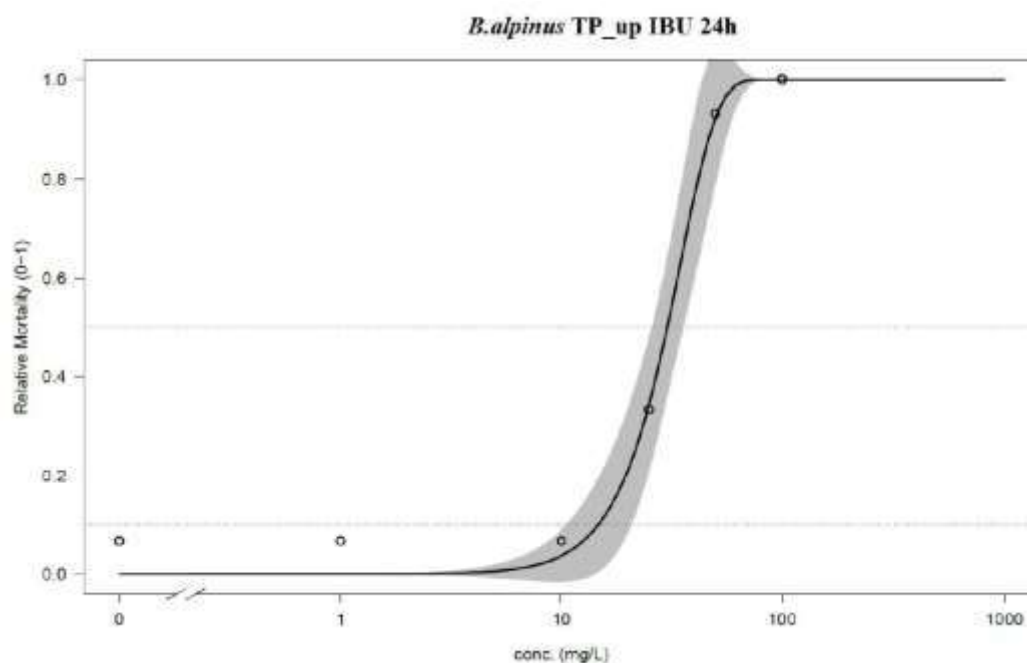


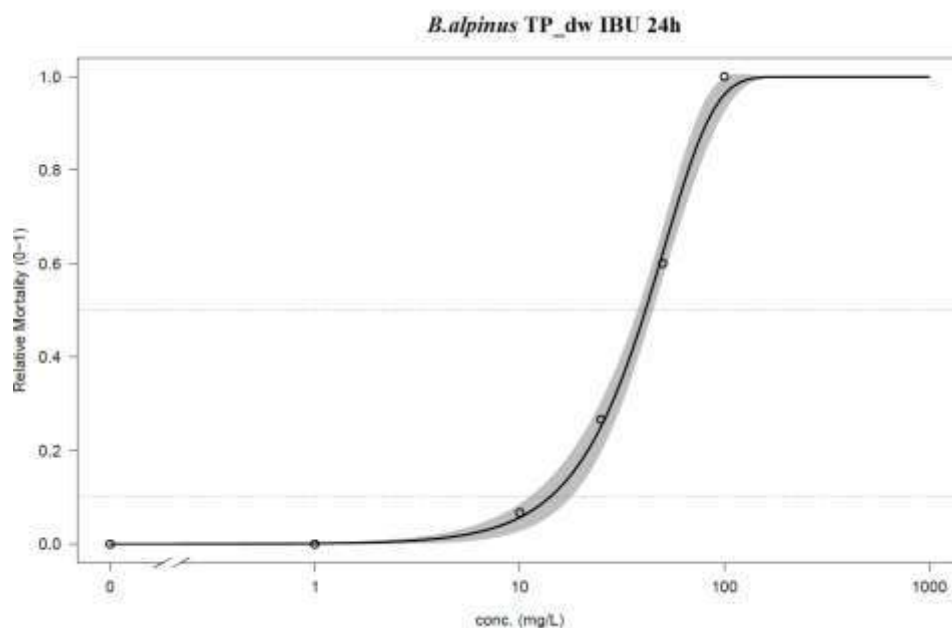
Figura A1-13 - Andamento di sopravvivenza di larve di *R. occidentalis* (ML). Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi e sofferenti.



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	2.63284	0.43858	6.00310	0.0039
c (Intercept)	34.77665	2.00169	17.37362	0.0001

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	6.0601	1.6979	1.3461	10.774
1:5	11.2550	2.0283	5.6236	16.886
1:10	14.7939	2.0351	9.1436	20.444
1:15	17.4412	1.9705	11.9701	22.912
1:20	19.6729	1.8882	14.4304	24.915
1:25	21.6657	1.8057	16.6523	26.679
1:30	23.5089	1.7327	18.6983	28.320
1:35	25.2565	1.6768	20.6010	29.912
1:40	26.9454	1.6452	22.3777	31.513
1:45	28.6042	1.6449	24.0373	33.171
1:50	30.2573	1.6823	25.5864	34.928
1:55	31.9280	1.7632	27.0327	36.823
1:60	33.6409	1.8918	28.3883	38.893
1:65	35.4248	2.0726	29.6703	41.179
1:70	37.3171	2.3111	30.9005	43.734
1:75	39.3701	2.6165	32.1057	46.635
1:80	41.6664	3.0061	33.3200	50.013
1:85	44.3520	3.5150	34.5929	54.111
1:90	47.7379	4.2229	36.0132	59.463
1:95	52.7560	5.3813	37.8151	67.697
1:99	62.1155	7.8110	40.4288	83.802

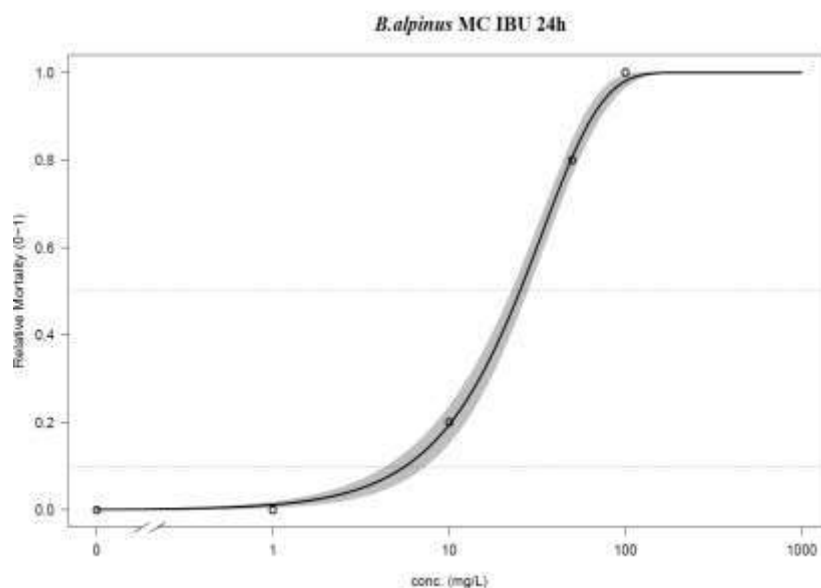
Tabella A1-1 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *B. alpinus*, Ibuprofen exposure (TP_up).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	1.7522	0.1208	14.5052	1e-04
c (Intercept)	50.7127	1.5467	32.7880	0e+00

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	3.67225	0.64943	1.86916	5.4753
1:5	9.30958	1.06261	6.35931	12.2598
1:10	14.03929	1.22300	10.64371	17.4349
1:15	17.97913	1.28235	14.41876	21.5395
1:20	21.54492	1.29730	17.94303	25.1468
1:25	24.90639	1.28918	21.32706	28.4857
1:30	28.15741	1.27000	24.63132	31.6835
1:35	31.36051	1.24894	27.89291	34.8281
1:40	34.56401	1.23471	31.13590	37.9921
1:45	37.81027	1.23671	34.37661	41.2439
1:50	41.14092	1.26521	37.62814	44.6537
1:55	44.60119	1.33092	40.90597	48.2964
1:60	48.24464	1.44422	44.23483	52.2544
1:65	52.13967	1.61496	47.65583	56.6235
1:70	56.38016	1.85367	51.23354	61.5268
1:75	61.10492	2.17486	55.06653	67.1433
1:80	66.53791	2.60314	59.31045	73.7654
1:85	73.08529	3.18662	64.23782	81.9328
1:90	81.62796	4.03613	70.42187	92.8341
1:95	94.85591	5.50633	79.56788	110.1439
1:99	121.23867	8.86153	96.63512	145.8422

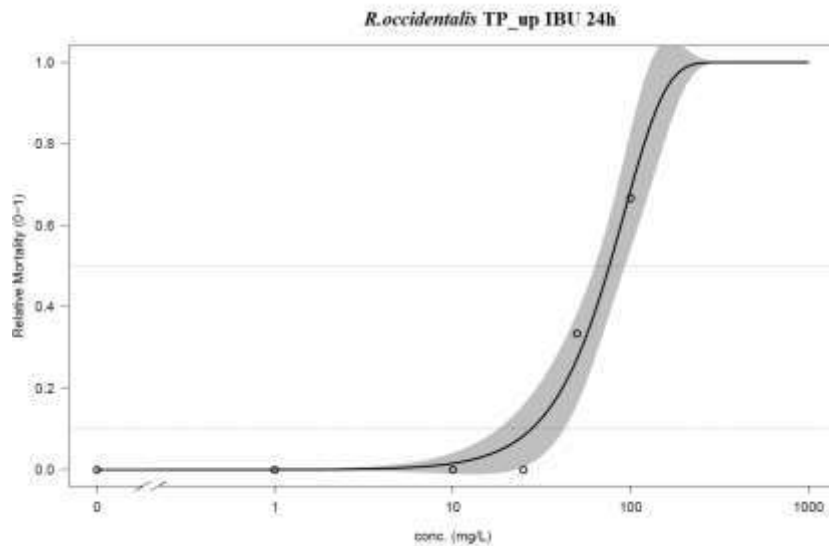
Tabella A1-2 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *B. alpinus*, Ibuprofen exposure (TP_dw).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	1.261371	0.052064	24.227339	2e-04
e (Intercept)	33.674438	1.016854	33.116284	1e-04

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	0.87792	0.13816	0.43822	1.3176
1:5	3.19633	0.33721	2.12316	4.2695
1:10	5.65576	0.47046	4.15855	7.1530
1:15	7.97470	0.55932	6.19471	9.7547
1:20	10.25335	0.62459	8.26562	12.2411
1:25	12.54102	0.67510	10.39256	14.6895
1:30	14.87125	0.71596	12.59275	17.1497
1:35	17.27209	0.75091	14.88234	19.6618
1:40	19.77072	0.78327	17.27799	22.2634
1:45	22.39638	0.81644	19.79809	24.9947
1:50	25.18307	0.85435	22.46416	27.9020
1:55	28.17269	0.90176	25.30289	31.0425
1:60	31.41961	0.96471	28.34947	34.4897
1:65	34.99779	1.05094	31.65322	38.3424
1:70	39.01327	1.17072	35.28753	42.7390
1:75	43.62764	1.33844	39.36812	47.8872
1:80	49.10766	1.57654	44.09040	54.1249
1:85	55.94620	1.92545	49.81856	62.0739
1:90	65.23200	2.47531	57.35444	73.1095
1:95	80.36488	3.51748	69.17068	91.5591
1:99	113.00917	6.20244	93.27023	132.7481

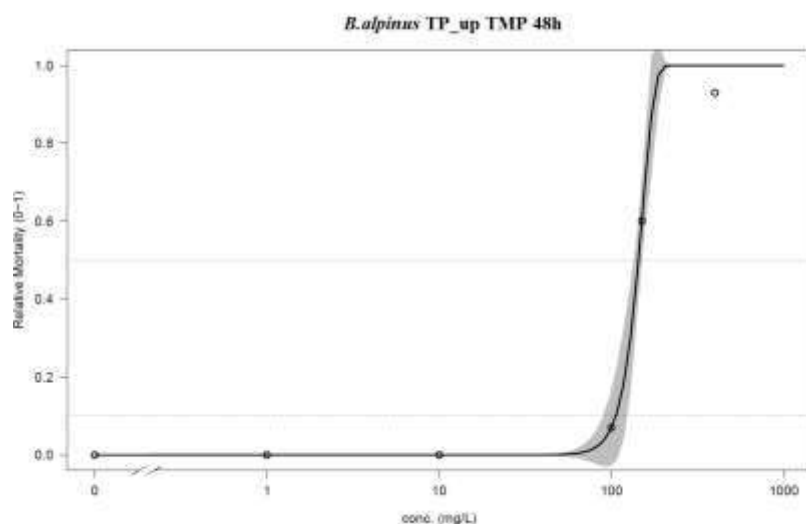
Tabella A1-3 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *B. alpinus*, Ibuprofen exposure (ML).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	1.86780	0.28487	6.55679	0.0028
e (Intercept)	92.35910	6.57789	14.04083	0.0001

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	7.86810	2.78771	0.12819	15.608
1:5	18.83046	4.23460	7.07332	30.588
1:10	27.68424	4.69362	14.65267	40.716
1:15	34.91457	4.80437	21.57551	48.254
1:20	41.37321	4.77957	28.10300	54.643
1:25	47.40103	4.70063	34.35000	60.452
1:30	53.18285	4.61648	40.36544	66.000
1:35	58.83908	4.56677	46.15970	71.519
1:40	64.46029	4.58900	51.71919	77.201
1:45	70.12368	4.71952	57.02019	83.227
1:50	75.90309	4.99131	62.04499	89.761
1:55	81.87683	5.43159	66.79631	96.957
1:60	88.13588	6.06237	71.30406	104.968
1:65	94.79486	6.90523	75.62288	113.967
1:70	102.00957	7.98982	79.82628	124.193
1:75	110.00881	9.36607	84.00443	136.013
1:80	119.16006	11.12516	88.27166	150.048
1:85	130.12731	13.44672	92.79324	167.461
1:90	144.34635	16.74102	97.86584	190.827
1:95	166.18580	22.30831	104.24800	228.124
1:99	209.20584	34.67517	112.93213	305.479

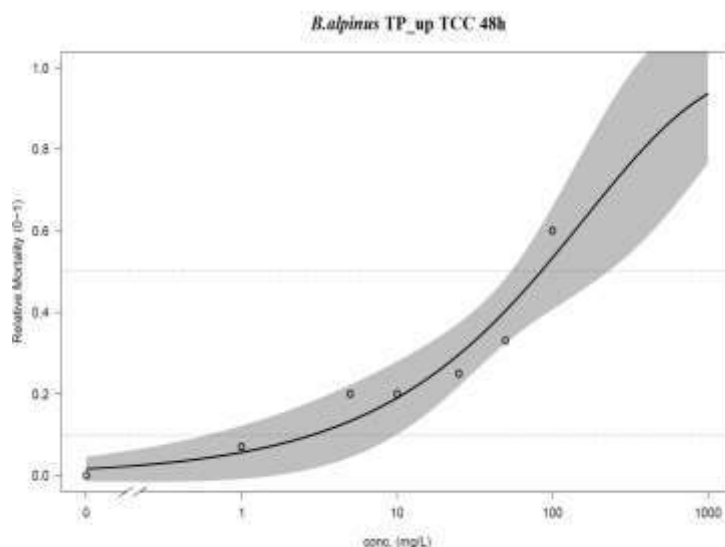
Tabella A1-4 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *R. occidentalis*, Ibuprofen exposure (TP_up).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	6.2547	13.010	48.075	0.0086
e (Intercept)	152.1113	24.415	623.019	0.0000

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	72.9042	10.7954	42.9315	102.88
1:5	94.6079	8.9224	69.8353	119.38
1:10	106.1472	7.5130	85.2879	127.01
1:15	113.7632	6.4590	95.8302	131.70
1:20	119.6779	5.5879	104.1633	135.19
1:25	124.6388	4.8344	111.2164	138.06
1:30	128.9969	4.1684	117.4235	140.57
1:35	132.9497	3.5781	123.0151	142.88
1:40	136.6220	3.0650	128.1122	145.13
1:45	140.1012	2.6444	132.7591	147.44
1:50	143.4541	2.3482	136.9344	149.97
1:55	146.7365	2.2193	140.5747	152.90
1:60	150.0001	2.2902	143.6415	156.36
1:65	153.2983	2.5587	146.1943	160.40
1:70	156.6933	2.9967	148.3730	165.01
1:75	160.2659	3.5795	150.3276	170.20
1:80	164.1362	4.3040	152.1863	176.09
1:85	168.5090	5.2011	154.0684	182.95
1:90	173.8089	6.3662	156.1335	191.48
1:95	181.2776	8.1129	158.7526	203.80
1:99	194.1782	11.3444	162.6812	225.68

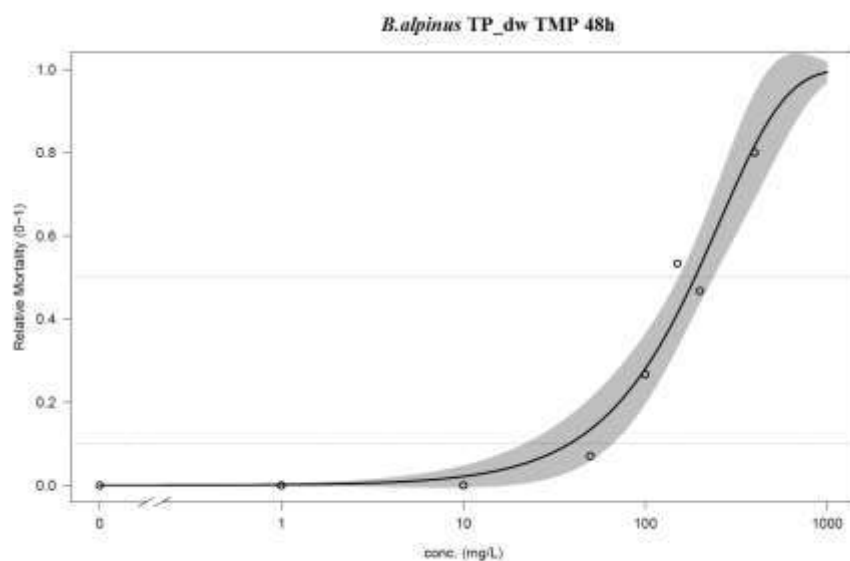
Tabella A1-5 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *B. alpinus*, Trimethoprim exposure (TP_up).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	0.55813	0.11819	4.72217	0.0052
c (Intercept)	162.48305	53.03038	3.06396	0.0280

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	4.2788e-02	6.3484e-02	-1.2040e-01	0.2060
1:5	7.9365e-01	6.9287e-01	-9.8743e-01	2.5747
1:10	2.8823e+00	1.7534e+00	-1.6250e+00	7.3896
1:15	6.2659e+00	2.8435e+00	-1.0436e+00	13.5755
1:20	1.1058e+01	3.8328e+00	1.2054e+00	20.9102
1:25	1.7432e+01	4.6862e+00	5.3857e+00	29.4780
1:30	2.5622e+01	5.5117e+00	1.1454e+01	39.7904
1:35	3.5934e+01	6.6666e+00	1.8797e+01	53.0715
1:40	4.8766e+01	8.7955e+00	2.6157e+01	71.3759
1:45	6.4642e+01	1.2635e+01	3.2162e+01	97.1211
1:50	8.4259e+01	1.8849e+01	3.5805e+01	132.7124
1:55	1.0857e+02	2.8159e+01	3.6188e+01	180.9579
1:60	1.3893e+02	4.1571e+01	3.2066e+01	245.7863
1:65	1.7727e+02	6.0615e+01	2.1456e+01	333.0889
1:70	2.2659e+02	8.7724e+01	1.0924e+00	452.0960
1:75	2.9172e+02	1.2697e+02	-3.4672e+01	618.1176
1:80	3.8116e+02	1.8578e+02	-9.6398e+01	858.7157
1:85	5.1176e+02	2.7937e+02	-2.0638e+02	1229.9110
1:90	7.2408e+02	4.4588e+02	-4.2208e+02	1870.2452
1:95	1.1603e+03	8.2598e+02	-9.6298e+02	3283.5074
1:99	2.5069e+03	2.1829e+03	-3.1043e+03	8118.2180

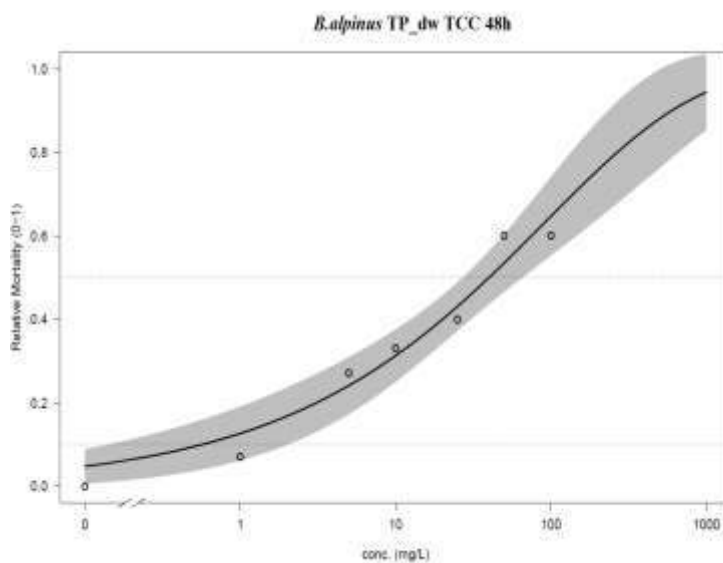
Tabella A1-6 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *B. alpinus*, Triclocarban exposure (TP_up).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	1.18621	0.17474	6.78827	5e-04
e (Intercept)	255.83877	25.02277	10.22424	1e-04

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	5.2937	2.8024	-1.5635	12.151
1:5	20.9179	6.9273	3.9675	37.868
1:10	38.3762	9.4336	15.2930	61.459
1:15	55.3020	10.8491	28.7552	81.849
1:20	72.2451	11.6730	43.6822	100.808
1:25	89.4989	12.1481	59.7736	119.224
1:30	107.2808	12.4546	76.8056	137.756
1:35	125.7877	12.7719	94.5360	157.039
1:40	145.2224	13.3047	112.6671	177.778
1:45	165.8138	14.2832	130.8640	200.763
1:50	187.8359	15.9396	148.8332	226.839
1:55	211.6340	18.4779	166.4203	256.848
1:60	237.6619	22.0728	183.6517	291.672
1:65	266.5431	26.9079	200.7017	332.384
1:70	299.1769	33.2406	217.8401	380.514
1:75	336.9409	41.4940	235.4086	438.473
1:80	382.1179	52.4210	253.8484	510.387
1:85	438.9414	67.4910	273.7969	604.086
1:90	516.7998	90.0936	296.3486	737.251
1:95	645.1625	131.2943	323.8970	966.428
1:99	927.0376	234.5675	353.0716	1501.004

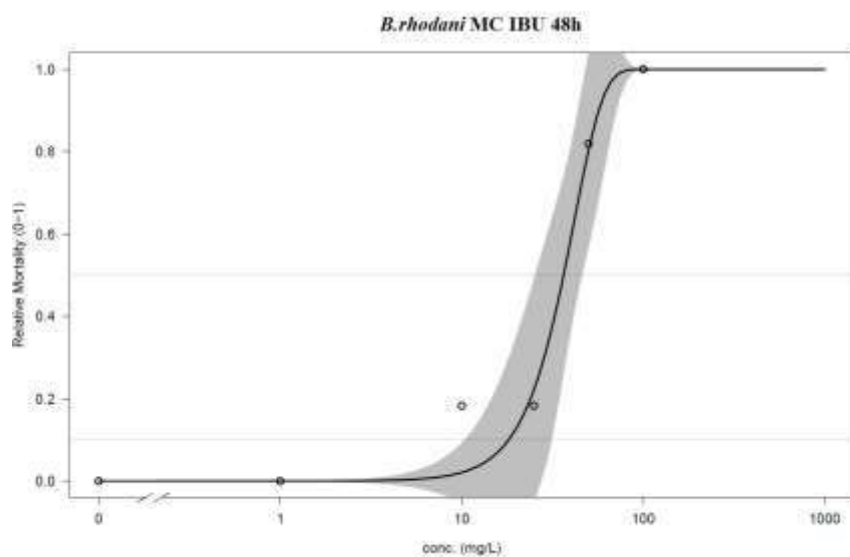
Tabella A1-7 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *B. alpinus*, Trimethoprim exposure (TP_dw).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	0.443444	0.059332	7.473947	0.0007
e (Intercept)	91.207296	19.718164	4.625547	0.0057

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	2.8497e-03	3.5576e-03	-6.2954e-03	0.0120
1:5	1.1249e-01	8.5828e-02	-1.0814e-01	0.3331
1:10	5.7029e-01	3.1491e-01	-2.3920e-01	1.3798
1:15	1.5155e+00	6.4919e-01	-1.5330e-01	3.1843
1:20	3.0977e+00	1.0566e+00	3.8158e-01	5.8138
1:25	5.4933e+00	1.5118e+00	1.6070e+00	9.3797
1:30	8.9201e+00	2.0058e+00	3.7640e+00	14.0762
1:35	1.3654e+01	2.5686e+00	7.0511e+00	20.2565
1:40	2.0052e+01	3.3110e+00	1.1541e+01	28.5634
1:45	2.8590e+01	4.4711e+00	1.7096e+01	40.0829
1:50	3.9910e+01	6.4264e+00	2.3390e+01	56.4294
1:55	5.4911e+01	9.6781e+00	3.0033e+01	79.7897
1:60	7.4888e+01	1.4894e+01	3.6602e+01	113.1736
1:65	1.0178e+02	2.3060e+01	4.2499e+01	161.0542
1:70	1.3862e+02	3.5776e+01	4.6655e+01	230.5851
1:75	1.9051e+02	5.5835e+01	4.6984e+01	334.0423
1:80	2.6674e+02	8.8571e+01	3.9065e+01	494.4241
1:85	3.8650e+02	1.4554e+02	1.2387e+01	760.6221
1:90	5.9821e+02	2.5747e+02	-6.3644e+01	1260.0646
1:95	1.0829e+03	5.4708e+02	-3.2344e+02	2489.1990
1:99	2.8556e+03	1.7987e+03	-1.7680e+03	7479.1985

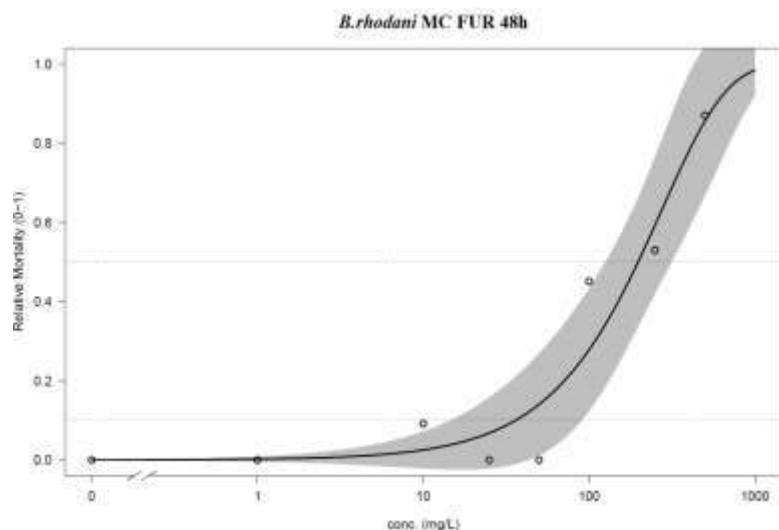
Tabella A1-8 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *B. alpinus*, Triclocarban exposure (TP_dw).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	2.70675	0.87056	3.10921	0.0359
c (Intercept)	41.72323	3.36359	12.40436	0.0002

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	7.62587	4.22315	-4.09948	19.351
1:5	13.92559	5.05881	-0.11992	27.971
1:10	18.16808	5.09645	4.01806	32.318
1:15	21.32302	4.93976	7.60805	35.038
1:20	23.97255	4.71743	10.87488	37.070
1:25	26.33145	4.46840	13.92519	38.738
1:30	28.50797	4.21118	16.81585	40.200
1:35	30.56721	3.95851	19.57663	41.558
1:40	32.55368	3.72249	22.21840	42.889
1:45	34.50143	3.51734	24.73573	44.267
1:50	36.43941	3.36114	27.10738	45.771
1:55	38.39505	3.27663	29.29767	47.492
1:60	40.39720	3.29027	31.26194	49.532
1:65	42.47947	3.42942	32.95787	52.001
1:70	44.68498	3.71951	34.35795	55.012
1:75	47.07453	4.18547	35.45379	58.695
1:80	49.74313	4.86127	36.24609	63.240
1:85	52.85904	5.81257	36.72077	68.997
1:90	56.78027	7.19670	36.79903	76.761
1:95	62.57785	9.52324	36.13710	89.019
1:99	73.35203	14.47848	33.15333	113.551

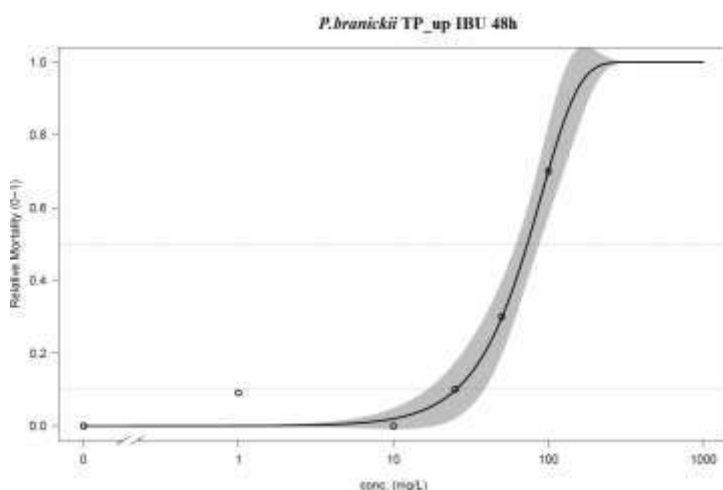
Tabella A1-9 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *B. rhodani*, Ibuprofen exposure (ML).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	1.10825	0.24249	4.57037	0.0038
e (Intercept)	274.97113	49.23531	5.58484	0.0014

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	4.3313	3.7918	-4.9470	13.610
1:5	18.8516	10.6226	-7.1411	44.844
1:10	36.0935	15.5327	-1.9137	74.101
1:15	53.3666	18.8688	7.1964	99.537
1:20	71.0397	21.3425	18.8164	123.263
1:25	89.3414	23.3085	32.3075	146.375
1:30	108.4659	25.0213	47.2411	169.691
1:35	128.6089	26.7137	63.2429	193.975
1:40	149.9877	28.6313	79.9294	220.046
1:45	172.8595	31.0475	96.8888	248.830
1:50	197.5425	34.2665	113.6953	281.390
1:55	224.4458	38.6215	129.9423	318.949
1:60	254.1142	44.4808	145.2736	362.955
1:65	287.3031	52.2776	159.3843	415.222
1:70	325.1092	62.5820	171.9765	478.242
1:75	369.2208	76.2446	182.6570	555.785
1:80	422.4483	94.6948	190.7385	654.158
1:85	490.0245	120.6647	194.7685	785.280
1:90	583.6088	160.4398	191.0267	976.191
1:95	740.0237	234.6696	165.8078	1314.239
1:99	1090.8057	426.6706	46.7804	2134.831

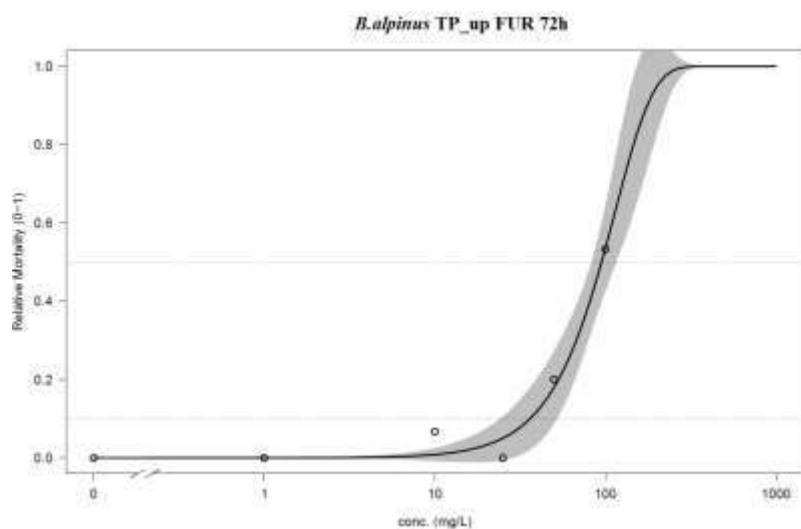
Tabella A1-10 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *B. rhodani*, Furosemide exposure (ML).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	1.77734	0.25343	7.01317	0.0022
e (Intercept)	89.87457	5.68348	15.81331	0.0001

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	6.75438	2.36125	0.19851	13.310
1:5	16.89921	3.74713	6.49551	27.303
1:10	25.33712	4.22408	13.60920	37.065
1:15	32.33408	4.35524	20.24201	44.426
1:20	38.64781	4.34069	26.59612	50.700
1:25	44.58615	4.25749	32.76547	56.407
1:30	50.31852	4.15197	38.79081	61.846
1:35	55.95725	4.06252	44.67789	67.237
1:40	61.58850	4.02764	50.40597	72.771
1:45	67.28737	4.08786	55.93765	78.637
1:50	73.12721	4.28310	61.23541	85.019
1:55	79.18725	4.64788	66.28267	92.092
1:60	85.56089	5.20896	71.09850	100.023
1:65	92.36711	5.98918	75.73850	108.996
1:70	99.76884	7.01697	80.28662	119.251
1:75	108.00659	8.34024	84.85038	131.163
1:80	117.46807	10.04842	89.56920	145.367
1:85	128.85577	12.32030	94.64912	163.062
1:90	143.69232	15.56745	100.47015	186.915
1:95	166.62343	21.10089	108.03797	225.209
1:99	212.22904	33.54396	119.09608	305.362

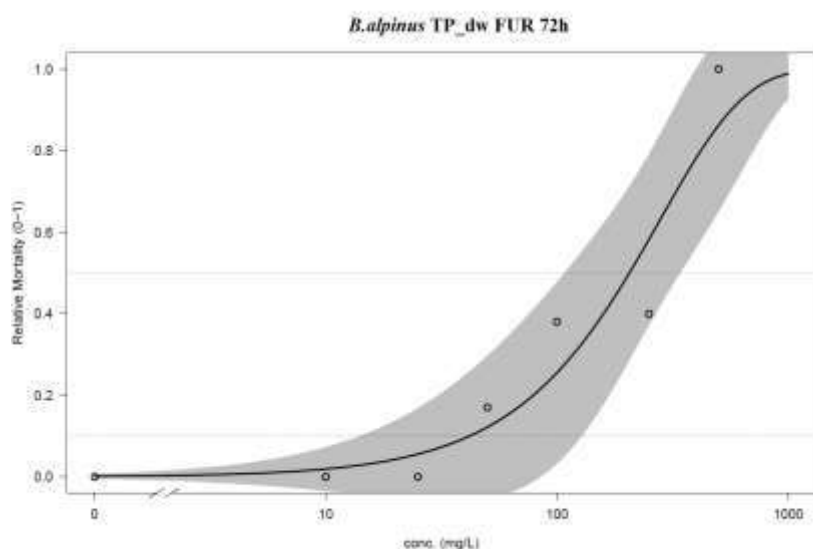
Tabella A1-1183 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *P. branickii*, Ibuprofen exposure (TP_up).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	1.95288	0.32319	6.04246	0.0038
c (Intercept)	114.38303	7.89330	14.49115	0.0001

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	10.84803	3.77408	0.36951	21.326
1:5	24.99370	5.30608	10.26165	39.726
1:10	36.13353	5.55893	20.69947	51.568
1:15	45.11222	5.40810	30.09694	60.127
1:20	53.06343	5.11171	38.87104	67.256
1:25	60.43527	4.77464	47.17875	73.692
1:30	67.46782	4.47266	55.04971	79.886
1:35	74.31537	4.28221	62.42604	86.205
1:40	81.09212	4.28327	69.19984	92.984
1:45	87.89370	4.54217	75.28261	100.505
1:50	94.80999	5.09037	80.67685	108.943
1:55	101.93476	5.92589	85.48184	118.388
1:60	109.37555	7.03630	89.83965	128.911
1:65	117.26657	8.42062	93.88717	140.646
1:70	125.78895	10.10232	97.74041	153.838
1:75	135.20746	12.14079	101.49923	168.916
1:80	145.94593	14.65379	105.26048	186.631
1:85	158.76833	17.87517	109.13891	208.398
1:90	175.32309	22.33543	113.31000	237.336
1:95	200.61412	29.70278	118.14597	283.082
1:99	250.02628	45.66822	123.23098	376.822

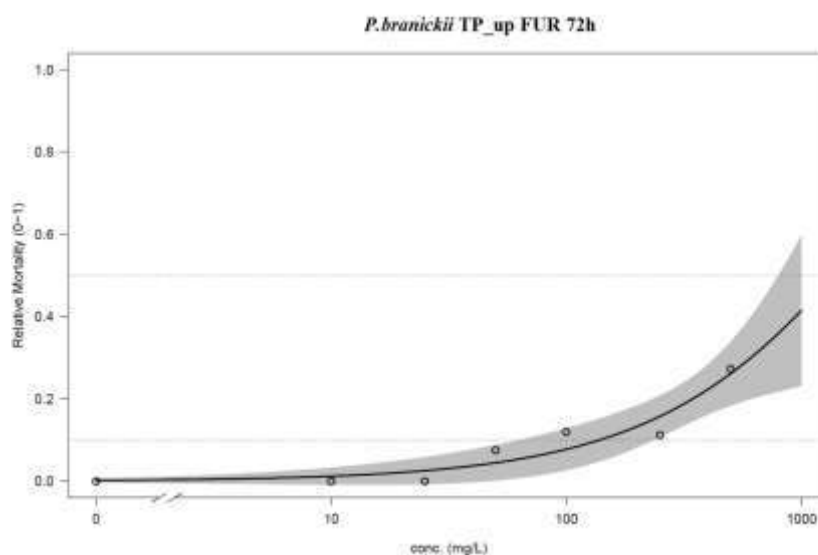
Tabella A1-12 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *B. alpinus*, Furosemide exposure (TP_up).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	1.18501	0.32959	3.59537	0.0156
e (Intercept)	279.92968	52.71051	5.31070	0.0032

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	5.769451	6.259352	-10.320725	21.860
1:5	22.829604	16.236941	-18.908782	64.568
1:10	41.909165	23.053930	-17.352849	101.171
1:15	60.415547	27.538434	-10.374252	131.205
1:20	78.946715	30.729276	-0.045404	157.939
1:25	97.822271	33.088879	12.764599	182.880
1:30	117.279461	34.905908	27.550968	207.008
1:35	137.533335	36.413121	43.930428	231.136
1:40	158.805989	37.841286	61.531867	256.080
1:45	181.347775	39.452864	79.930959	282.765
1:50	205.458997	41.566125	98.609871	312.308
1:55	231.517859	44.570670	116.945305	346.090
1:60	260.021764	48.935024	134.230280	385.813
1:65	291.654054	55.216337	149.715941	433.592
1:70	327.400639	64.099777	162.626918	492.174
1:75	368.771660	76.516726	172.079154	565.464
1:80	418.269913	93.934971	176.802383	659.737
1:85	480.536991	119.085753	174.417317	786.657
1:90	565.867214	158.205481	159.187080	972.547
1:95	706.576186	231.717261	110.928004	1302.224
1:99	1015.656628	421.192328	-67.052720	2098.366

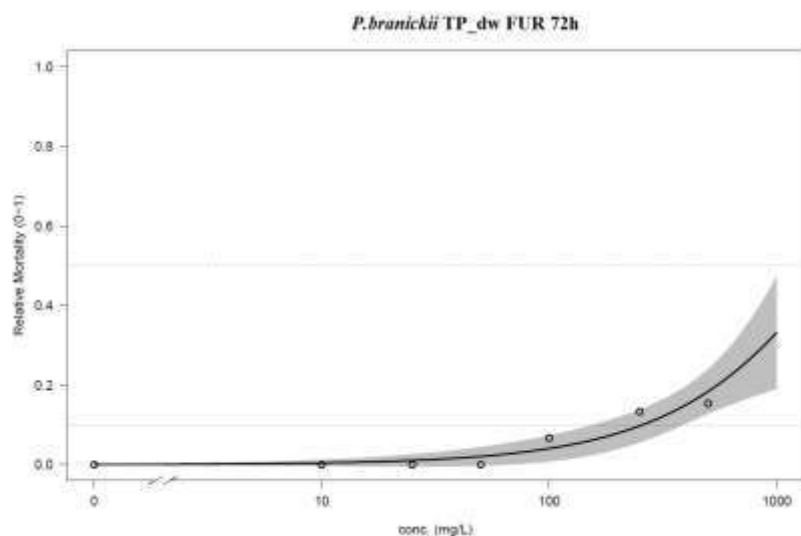
Tabella A1-13 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *B. alpinus*, Furosemide exposure (TP_dw).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	0.82263	0.18743	4.38900	0.0071
c (Intercept)	2132.85608	924.09029	2.30806	0.0691

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	7.9502	6.9812	-9.9955	25.896
1:5	57.6620	25.3316	-7.4551	122.779
1:10	138.3288	35.9263	45.9773	230.680
1:15	234.2736	40.7163	129.6089	338.938
1:20	344.4212	50.1614	215.4772	473.365
1:25	469.0368	74.3564	277.8977	660.176
1:30	609.1113	115.8654	311.2697	906.953
1:35	766.2316	174.2842	318.2198	1214.243
1:40	942.6120	250.2324	299.3690	1585.855
1:45	1141.2266	345.6229	252.7747	2029.678
1:50	1366.0492	463.5807	174.3771	2557.721
1:55	1622.4466	608.6514	57.8584	3187.035
1:60	1917.8233	787.3373	-106.0918	3941.738
1:65	2262.7167	1009.1084	-331.2790	4856.712
1:70	2672.7635	1288.2782	-638.8612	5984.388
1:75	3172.5130	1647.7082	-1063.0558	7408.082
1:80	3803.6293	2126.8886	-1663.7119	9270.970
1:85	4645.3476	2802.3985	-2558.4470	11849.142
1:90	5878.6414	3853.2288	-4026.3986	15783.682
1:95	8094.8075	5882.5882	-7026.8668	23216.482
1:99	13652.5585	11519.1044	-15958.2422	43263.359

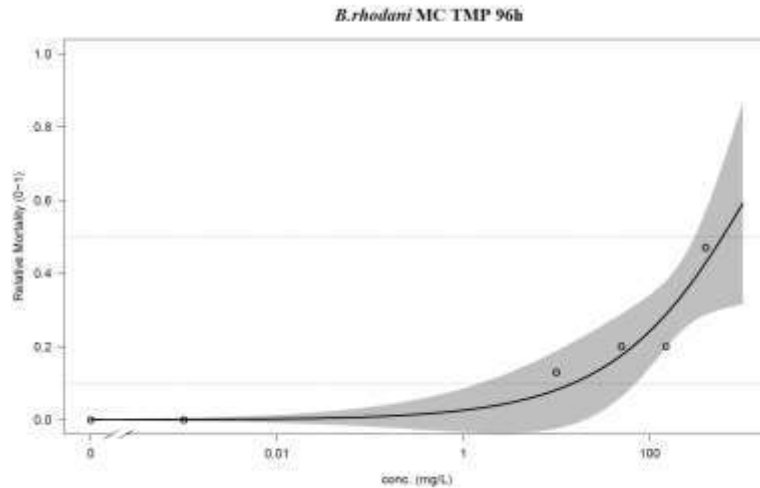
Tabella A1-14 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *P. branickii*, Furosemide exposure (TP_up).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	0.98869	0.19623	5.03853	0.0040
e (Intercept)	2501.99346	914.95075	2.73457	0.0411

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	23.857	14.254	-12.783	60.496
1:5	124.047	35.690	32.303	215.792
1:10	256.911	44.387	142.810	371.011
1:15	398.255	53.614	260.436	536.075
1:20	548.804	75.910	353.672	743.937
1:25	709.591	113.947	416.680	1002.502
1:30	881.934	166.123	454.901	1308.967
1:35	1067.481	231.583	472.177	1662.784
1:40	1268.297	310.641	469.770	2066.824
1:45	1487.006	404.496	447.215	2526.797
1:50	1726.992	515.172	402.700	3051.284
1:55	1992.724	645.646	333.038	3652.411
1:60	2290.261	800.194	233.298	4347.225
1:65	2628.110	985.022	96.030	5160.190
1:70	3018.737	1209.450	-90.253	6127.727
1:75	3481.486	1488.209	-344.078	7307.050
1:80	4048.788	1846.425	-697.598	8795.175
1:85	4781.485	2332.058	-1213.261	10776.231
1:90	5816.292	3055.028	-2036.907	13669.491
1:95	7589.988	4375.824	-3658.426	18838.403
1:99	11725.205	7748.373	-8192.621	31643.031

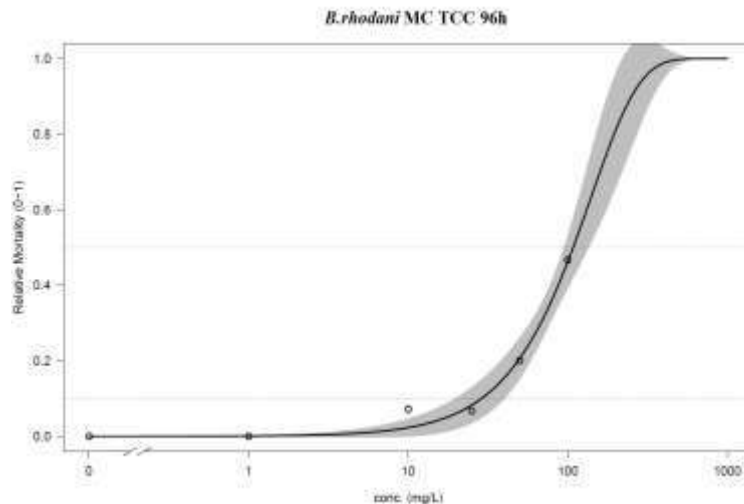
Tabella A1-15 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *P. branickii*, Furosemide exposure (TP_dw).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	0.50948	0.15359	3.31707	0.0295
c (Intercept)	1245.86994	733.28374	1.69903	0.1645

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	1.4934e-01	3.2870e-01	-7.6328e-01	1.062
1:5	3.6609e+00	4.5662e+00	-9.0169e+00	16.339
1:10	1.5038e+01	1.2541e+01	-1.9781e+01	49.857
1:15	3.5208e+01	2.0904e+01	-2.2831e+01	93.246
1:20	6.5596e+01	2.8210e+01	-1.2728e+01	143.921
1:25	1.0800e+02	3.4405e+01	1.2479e+01	203.524
1:30	1.6469e+02	4.2356e+01	4.7093e+01	282.294
1:35	2.3856e+02	5.9305e+01	7.3902e+01	403.218
1:40	3.3333e+02	9.3875e+01	7.2691e+01	593.966
1:45	4.5389e+02	1.5293e+02	2.9282e+01	878.499
1:50	6.0680e+02	2.4386e+02	-7.0271e+01	1283.873
1:55	8.0106e+02	3.7722e+02	-2.4628e+02	1848.403
1:60	1.0494e+03	5.6879e+02	-5.2980e+02	2628.652
1:65	1.3706e+03	8.4270e+02	-9.6908e+02	3710.329
1:70	1.7935e+03	1.2373e+03	-1.6419e+03	5228.920
1:75	2.3654e+03	1.8176e+03	-2.6812e+03	7411.975
1:80	3.1705e+03	2.7031e+03	-4.3344e+03	10675.476
1:85	4.3784e+03	4.1426e+03	-7.1234e+03	15880.220
1:90	6.4036e+03	6.7703e+03	-1.2394e+04	25200.878
1:95	1.0734e+04	1.2980e+04	-2.5303e+04	46770.830
1:99	2.4962e+04	3.6427e+04	-7.6175e+04	126100.03

Tabella A1-16 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *B. rhodani*, Trimethoprim exposure (ML).



	Estimate	Std.Error	t-value	p-value
b (Intercept)	1.42646	0.17878	7.97869	0.0013
e (Intercept)	139.60882	11.58154	12.05442	0.0003

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	5.55102	1.87890	0.33435	10.768
1:5	17.40287	3.43844	7.85623	26.950
1:10	28.82547	3.94595	17.86977	39.781
1:15	39.05974	3.97876	28.01293	50.107
1:20	48.78070	3.80851	38.20660	59.355
1:25	58.28974	3.58626	48.33268	68.247
1:30	67.77048	3.46141	58.16007	77.381
1:35	77.35982	3.59857	67.36858	87.351
1:40	87.17701	4.12124	75.73461	98.619
1:45	97.33963	5.05635	83.30094	111.378
1:50	107.97570	6.37217	90.28373	125.668
1:55	119.23593	8.04226	96.90703	141.565
1:60	131.30972	10.07134	103.34720	159.272
1:65	144.44938	12.50019	109.74329	179.155
1:70	159.01127	15.41234	116.21976	201.803
1:75	175.53285	18.95349	122.90952	228.156
1:80	194.89405	23.37930	129.98271	259.805
1:85	218.70910	29.17760	137.69911	299.719
1:90	250.51775	37.44955	146.54111	354.494
1:95	301.27135	51.70592	157.71269	444.830
1:99	407.25917	84.81509	171.77472	642.744

Tabella A1-16 - Estimated effective doses and Weibull distribution of *B. rhodani*, Triclocarban exposure (ML).

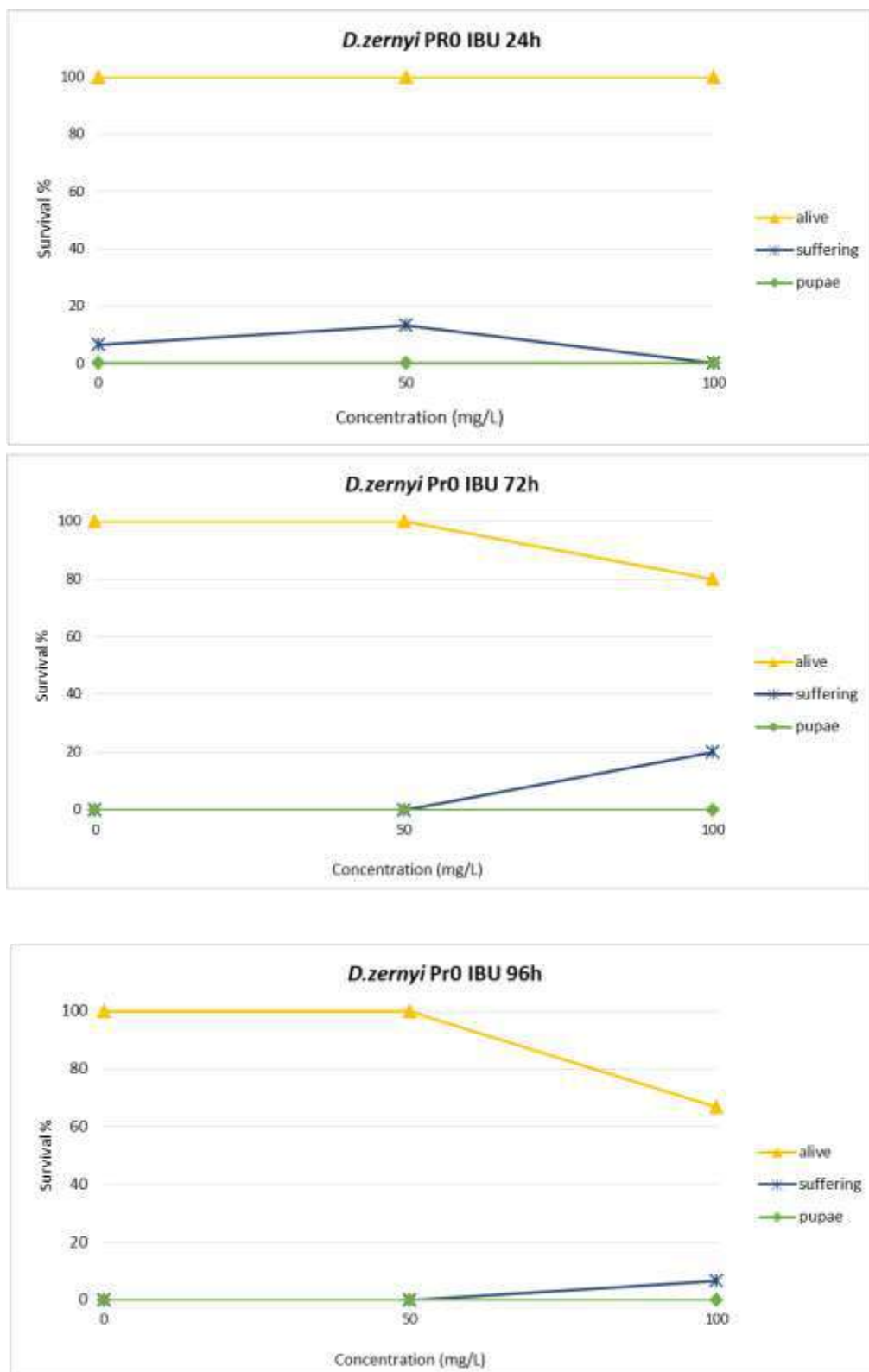


Figura A1-14 - Andamento di sopravvivenza di larve di *Diamesa* gr. *zernyi* (PR0) a diverse concentrazioni di Ibuprofene. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, di sofferenti e di pupae. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato con 5 animali per replica.

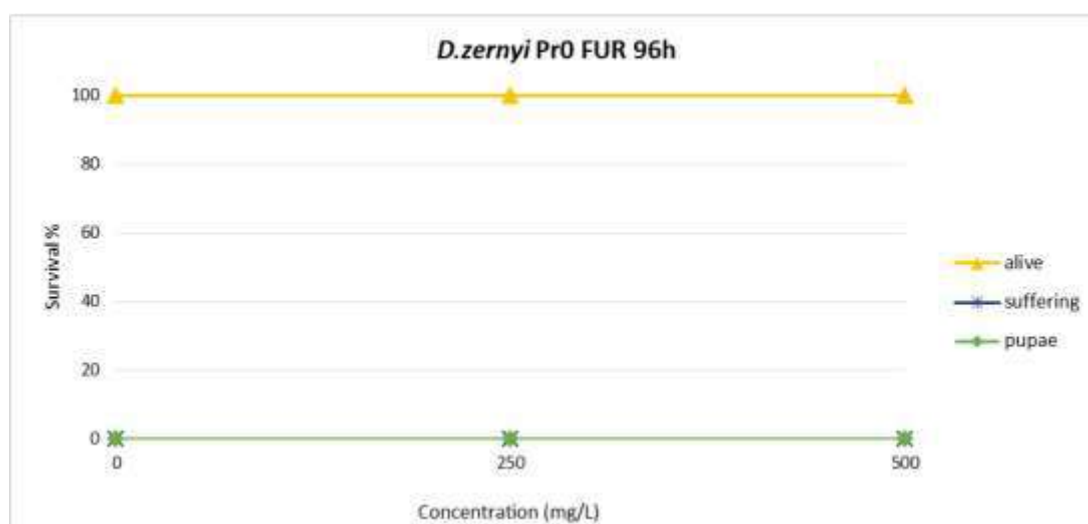
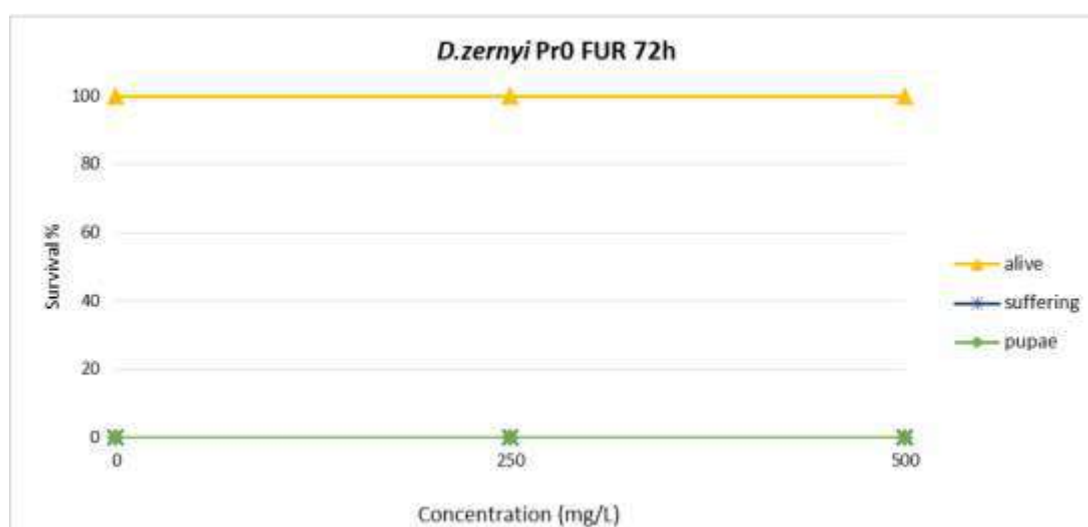
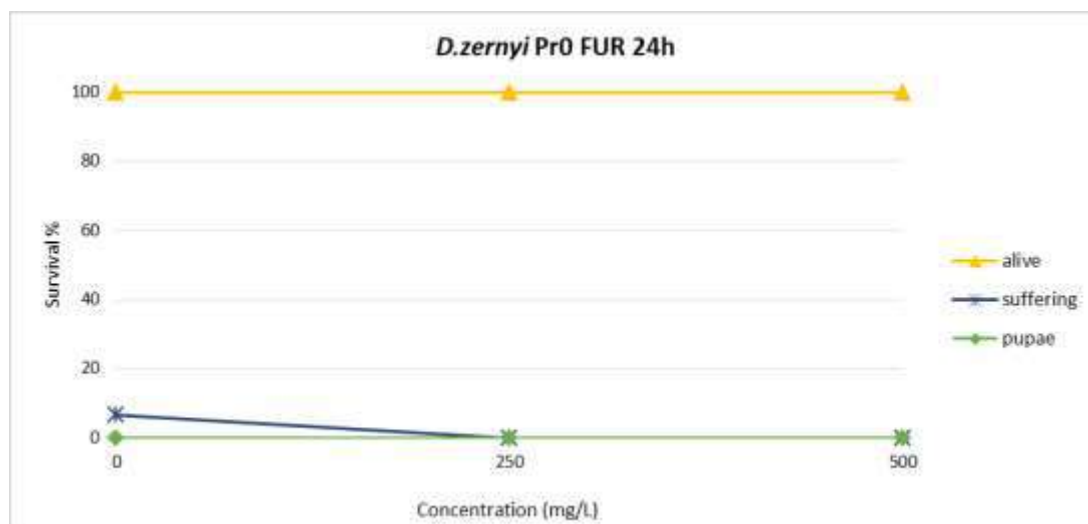


Figura A1-15 - Andamento di sopravvivenza di larve di *Diamesa* gr. *zernyi* (PR0) a diverse concentrazioni di Furosemide. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, di sofferenti e di pupe. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato con 5 animali per replica.

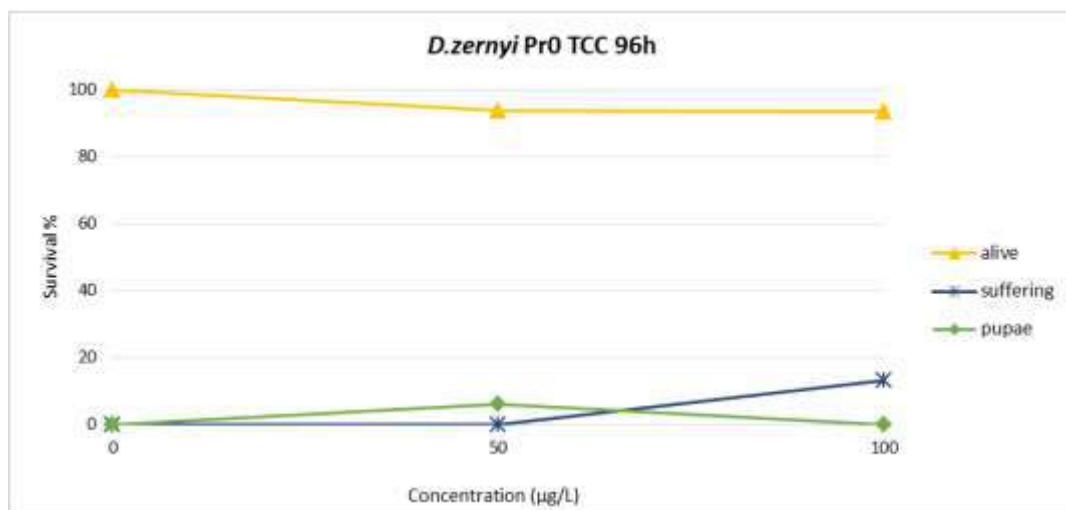
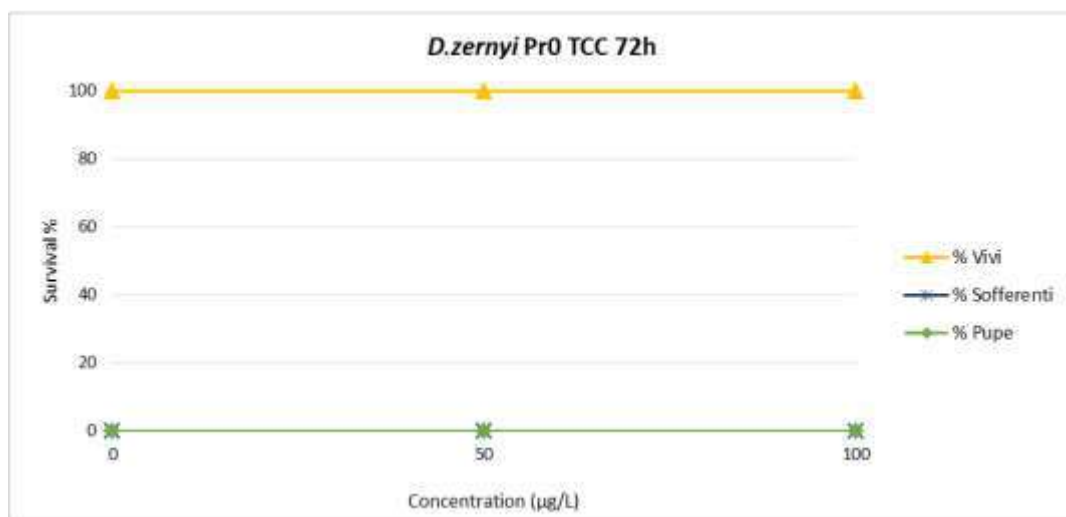
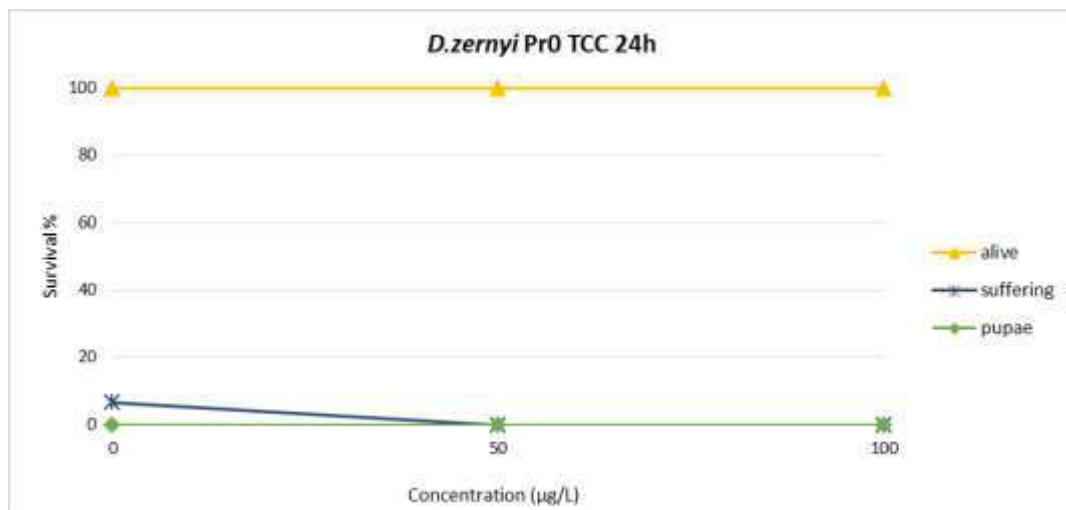


Figura A1-16 - Andamento di sopravvivenza di larve di *Diamesa* gr. *zernyi* (PR0) a diverse concentrazioni di Triclocarban. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, di sofferenti e di pupe. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato con 5 animali per replica.

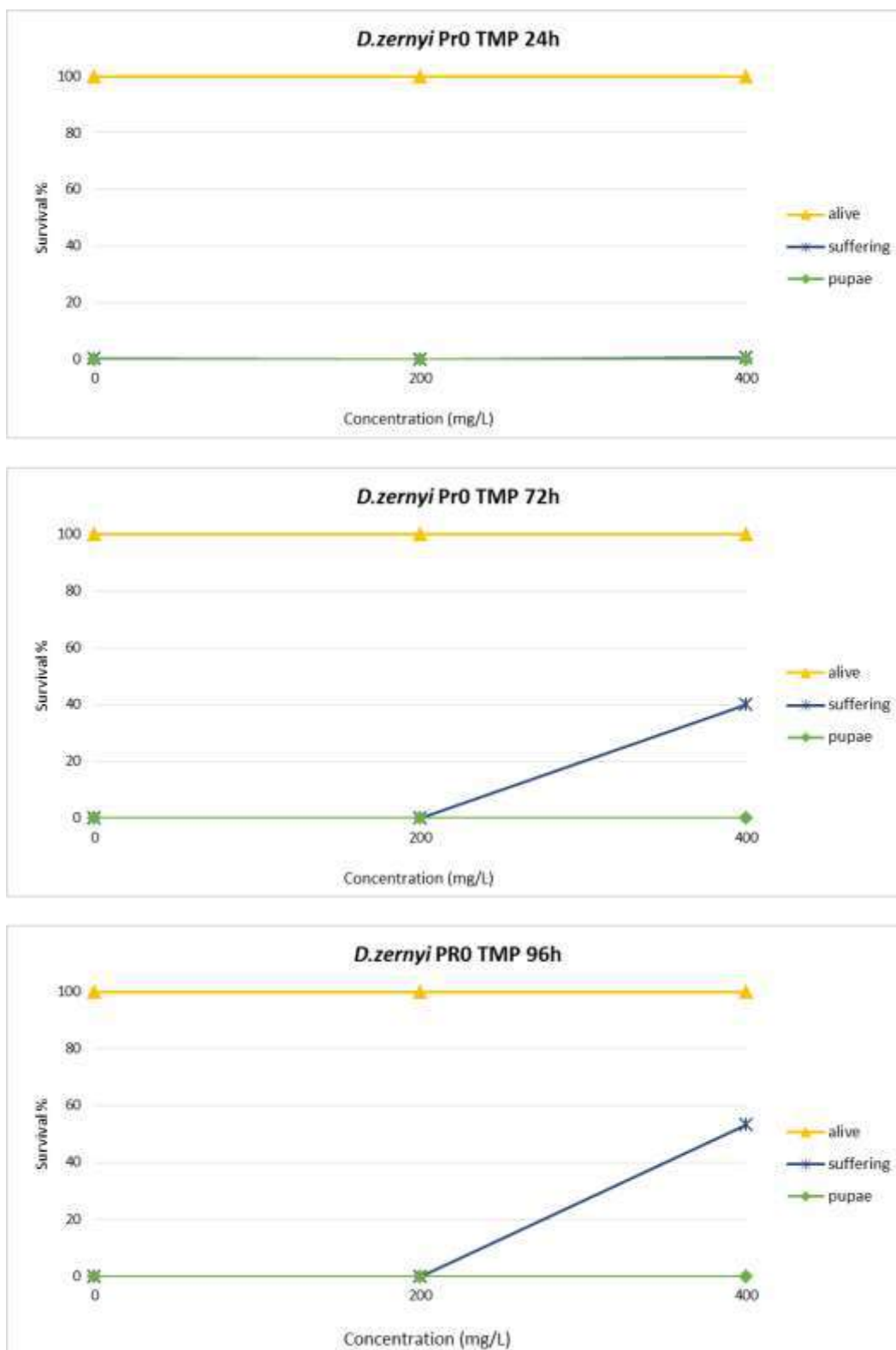


Figura A1-16 - Andamento di sopravvivenza di larve di *Diamesa* gr. *zernyi* (PR0) a diverse concentrazioni di Trimethoprim. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, di sofferenti e di pupe. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato con 5 animali per replica.

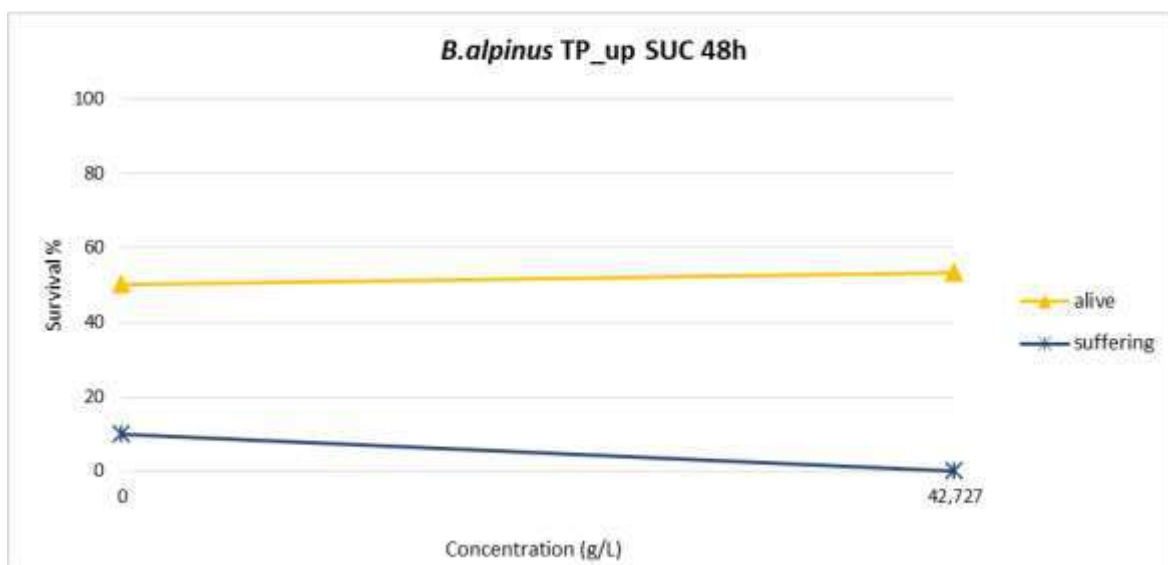
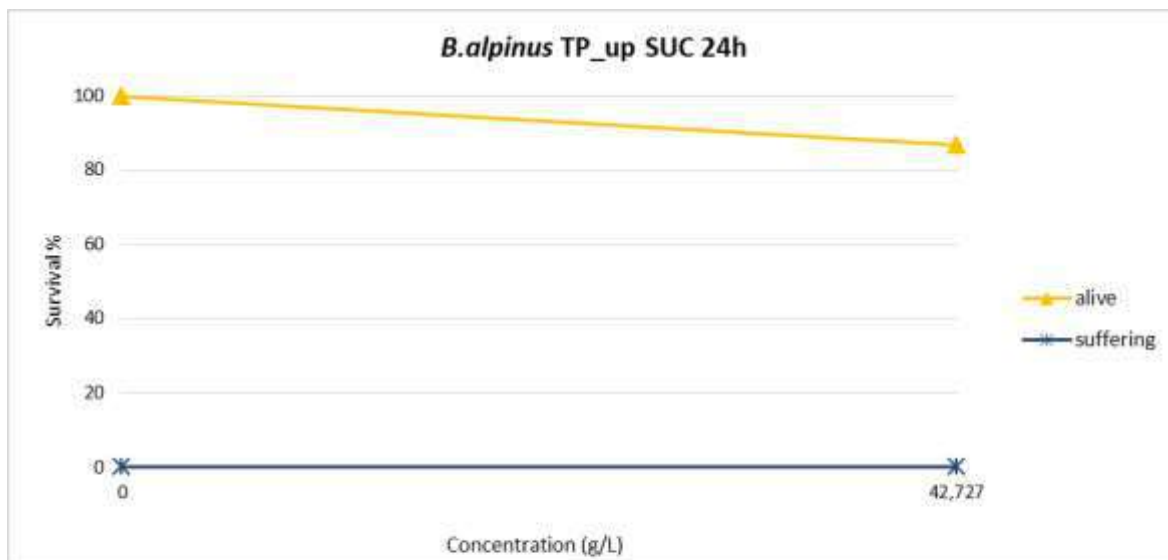


Figura A1-17 - Andamento di sopravvivenza di larve di *Baetis alpinus* (PTm) esposte a Sucralosio. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi e di sofferenti. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato con 5 animali per replica.

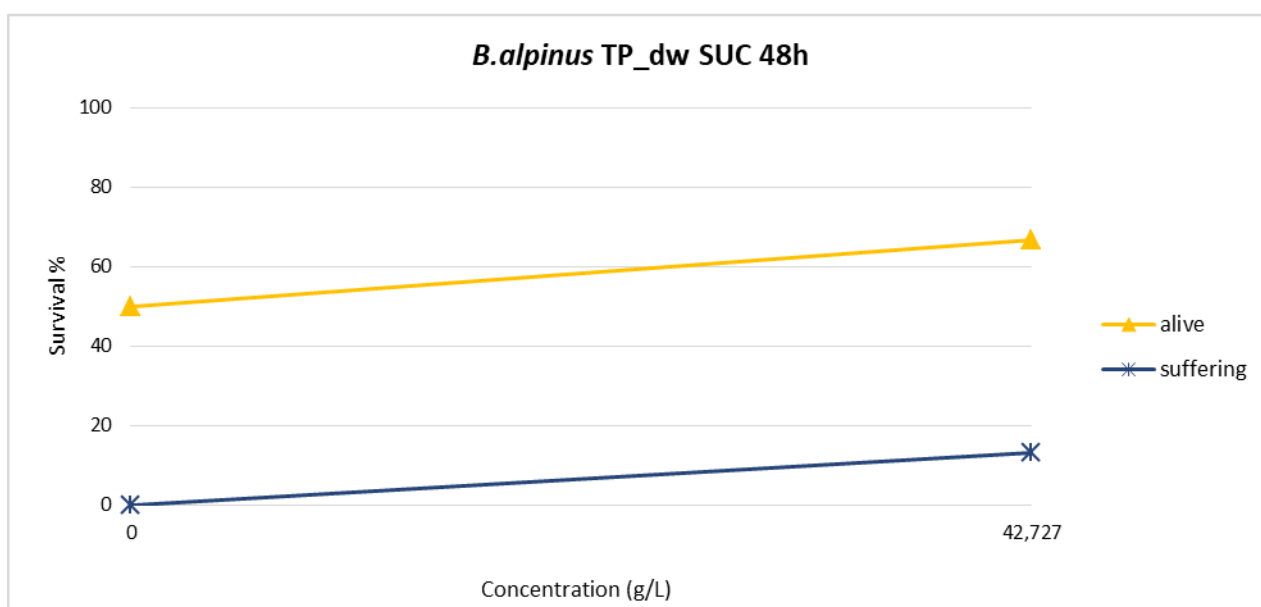
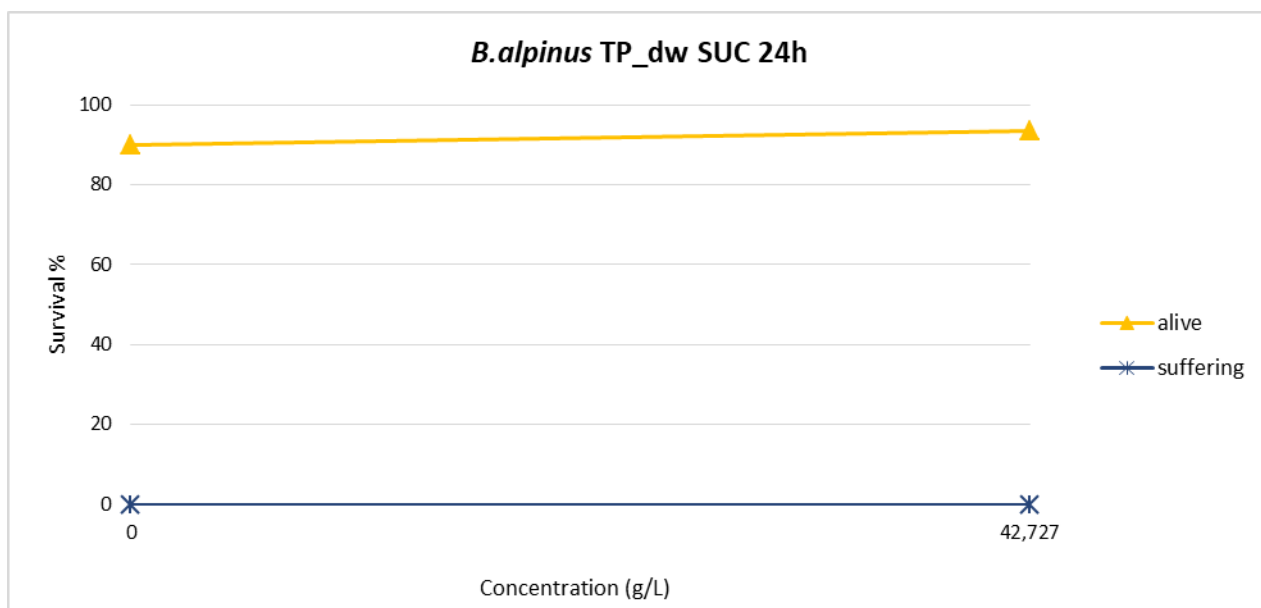


Figura A1-18 - Andamento di sopravvivenza di larve di *Baetis alpinus* (PTv) esposte a Sucralosio. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi e di sofferenti. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato con 5 animali per replica.

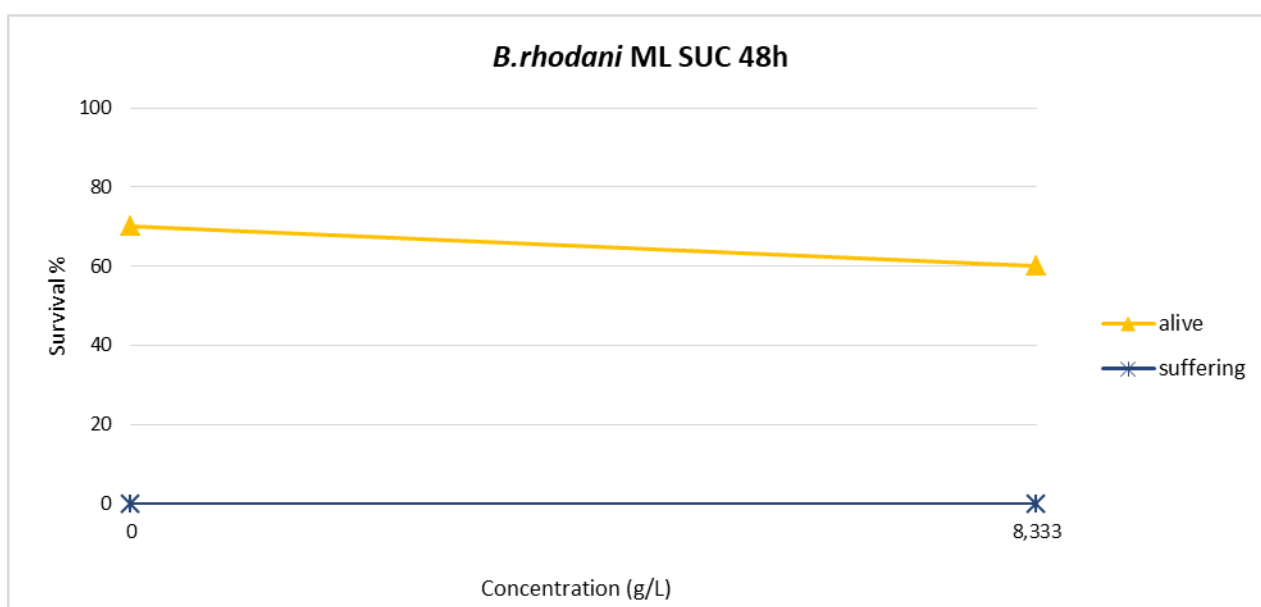
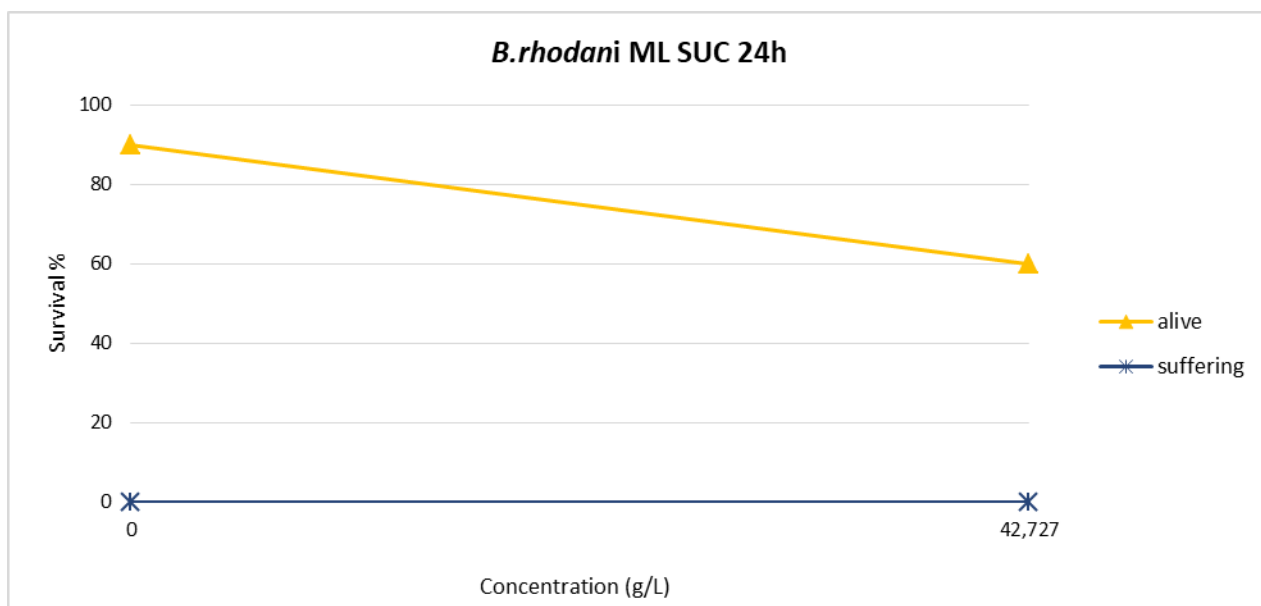
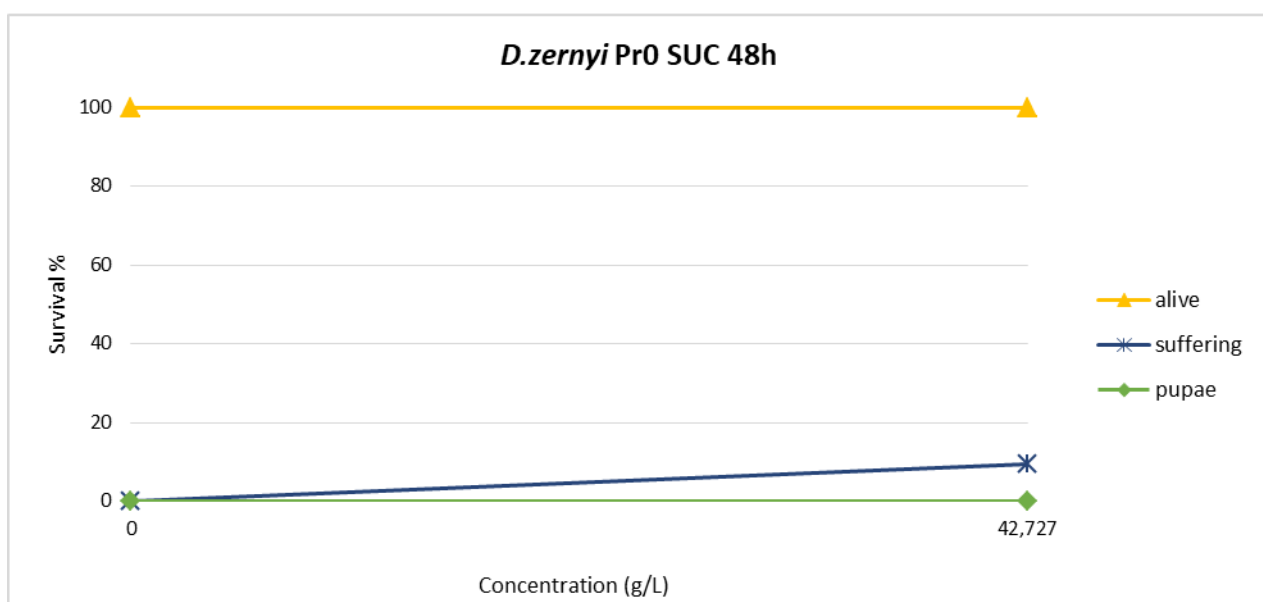
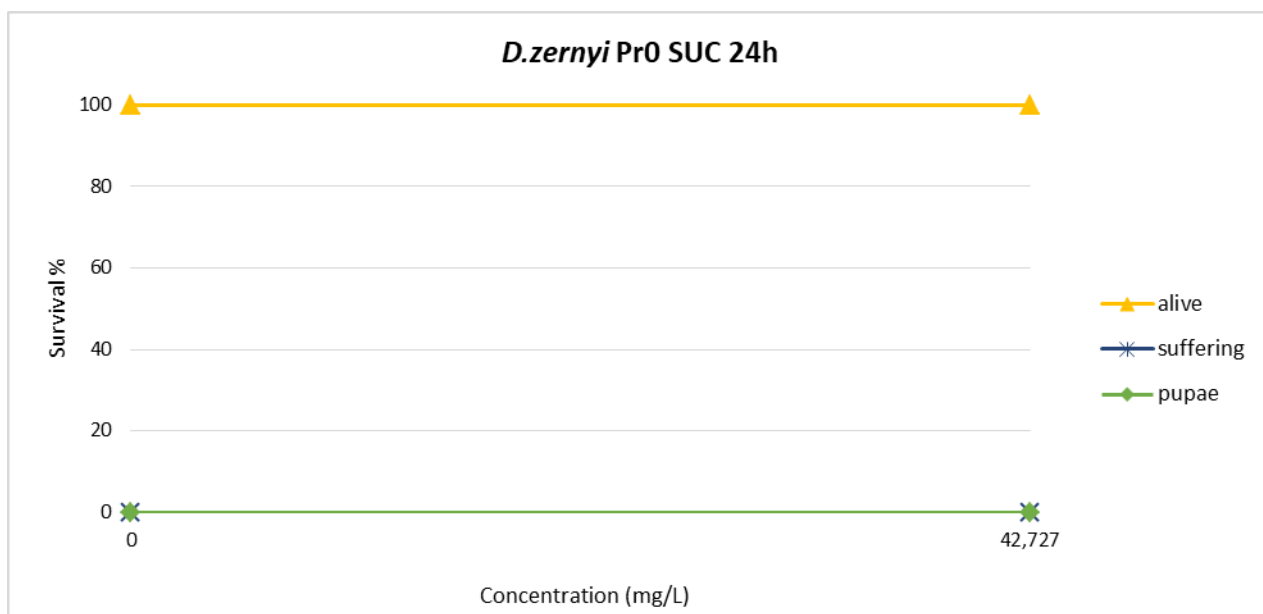


Figura A1-19 - Andamento di sopravvivenza di larve di *Baetis rhodani* (ML) esposte a Sucralosio. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi e di sofferenti. Ogni concentrazione è stata testata in duplicato con 5 animali per replica.



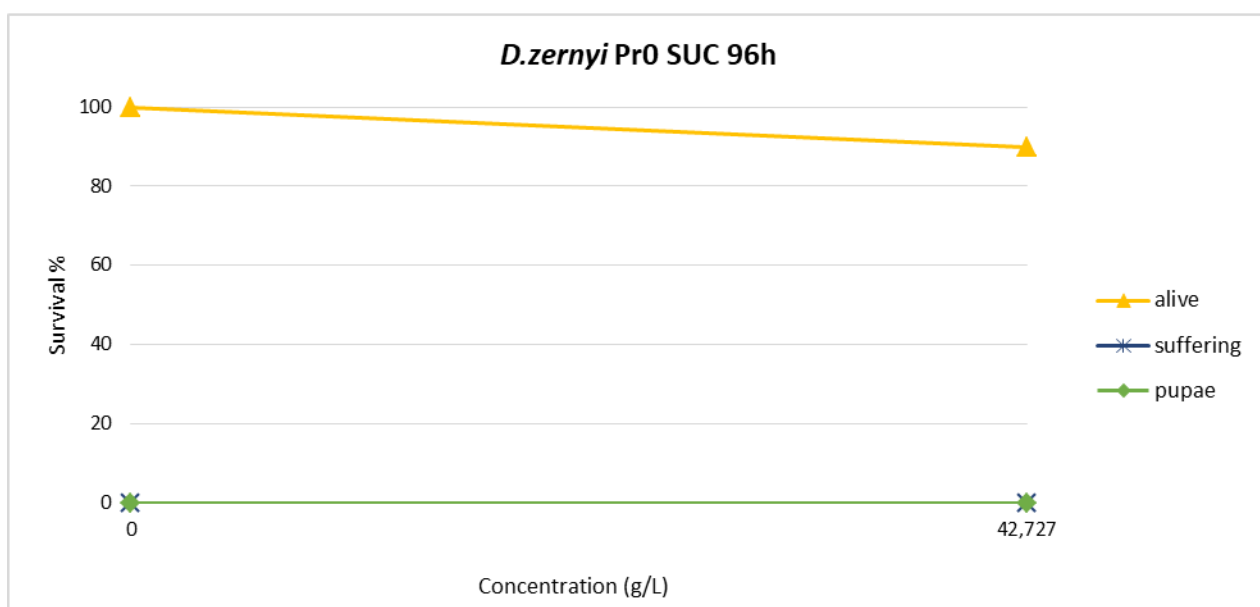
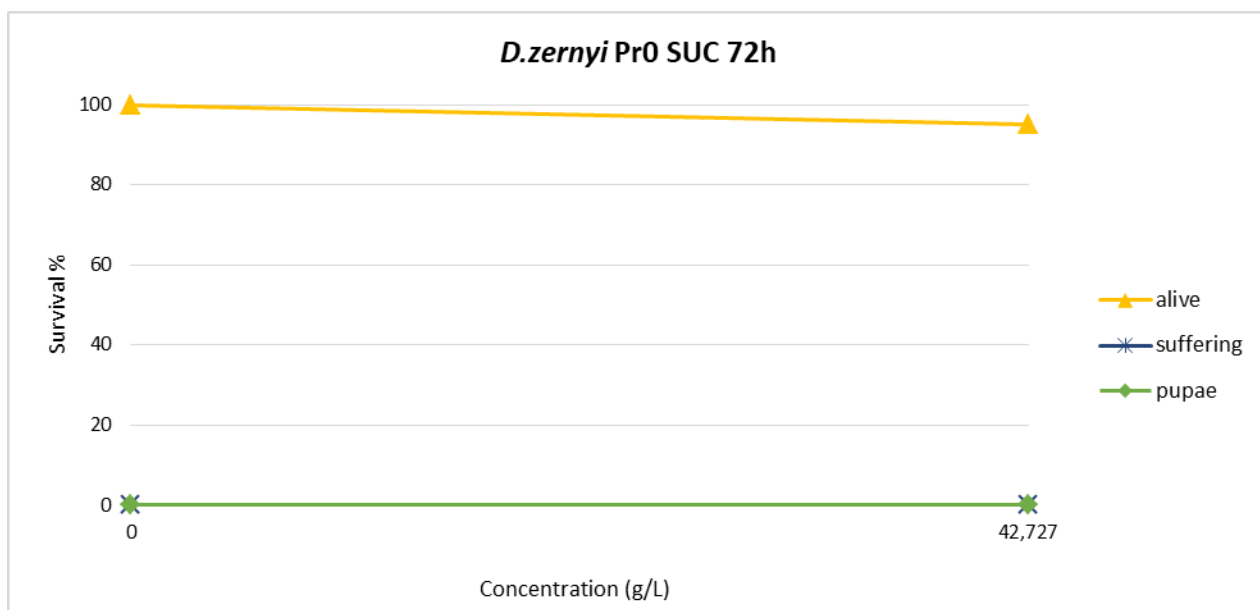


Figura A1-20 – Andamento di sopravvivenza di larve di *Diamesa* gr. *zernyi* (PR0) esposte a Sucralosio. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, di sofferenti e di pupae. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato con 5 animali per replica.

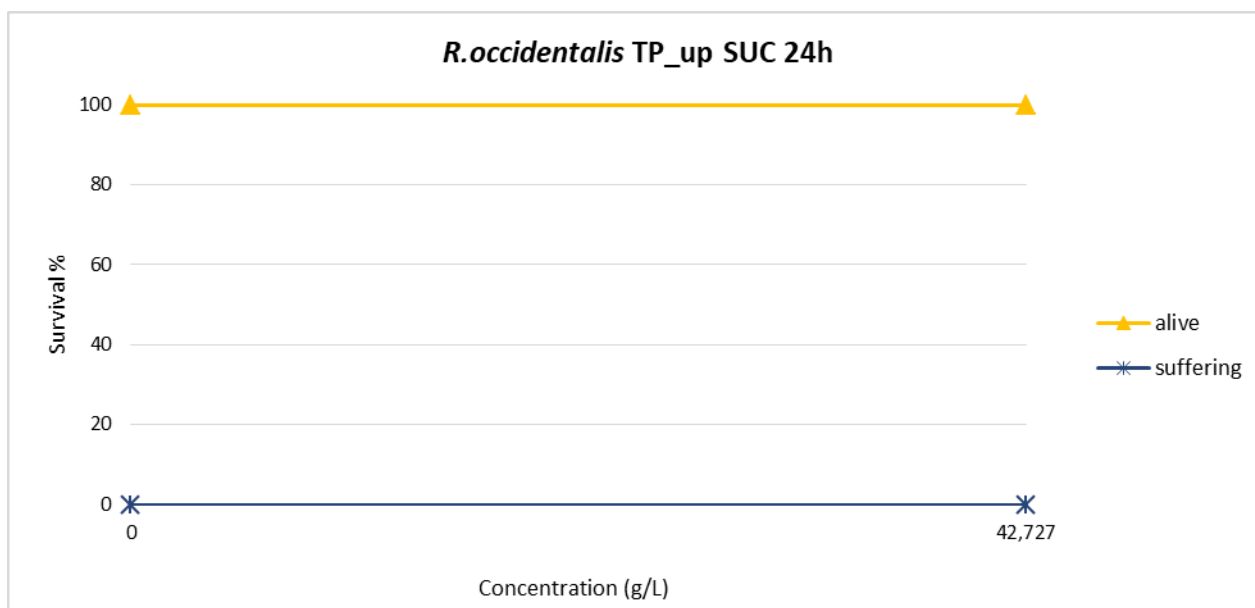


Figura A1-21 – Andamento di sopravvivenza di larve di *Rhyacophila occidentalis* (PTm) esposte a Sucralosio. Nel grafico sono indicate le percentuali di vivi e di sofferenti. È stata effettuata una sola prova per concentrazione ed è stato utilizzato un solo animale per prova.

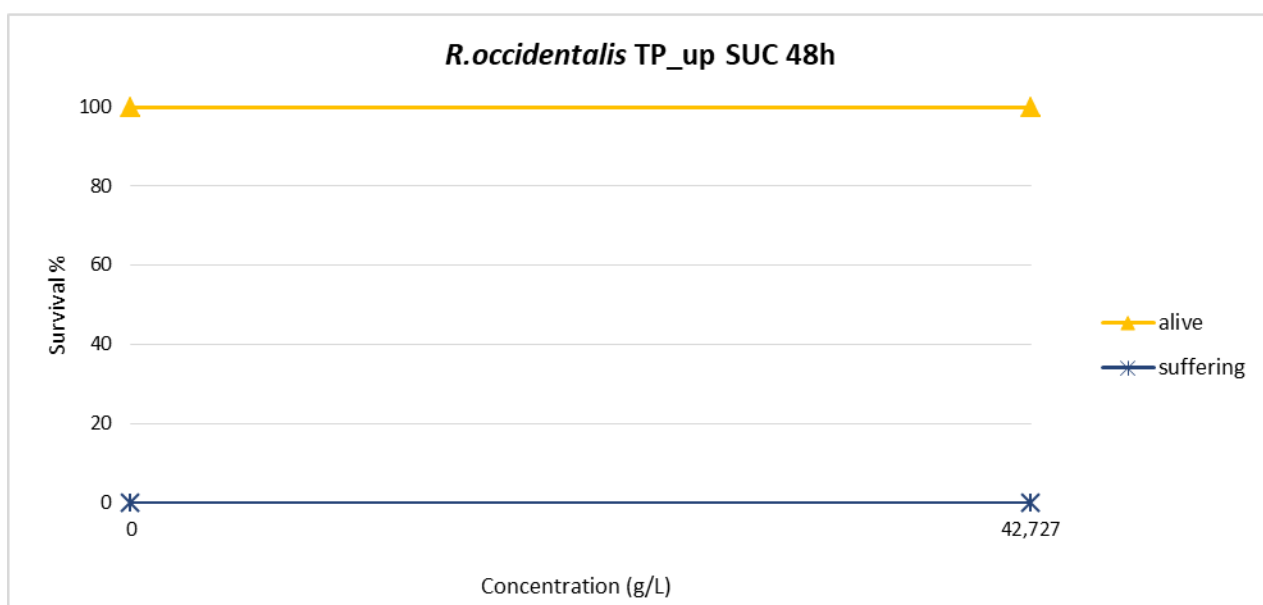
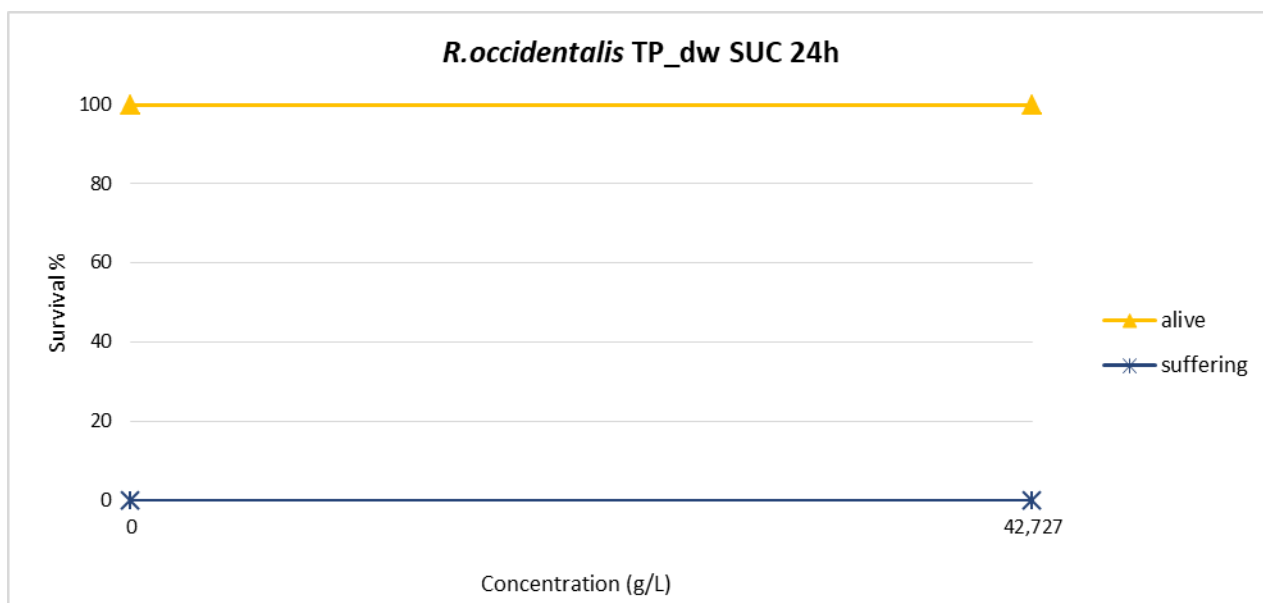


Figura A1-22 – Andamento di sopravvivenza di larve di *Rhyacophila occidentalis* (PTv) esposte a Sucralosio. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi e di sofferenti. È stata effettuata una sola prova per concentrazione ed è stato utilizzato un solo animale per prova.

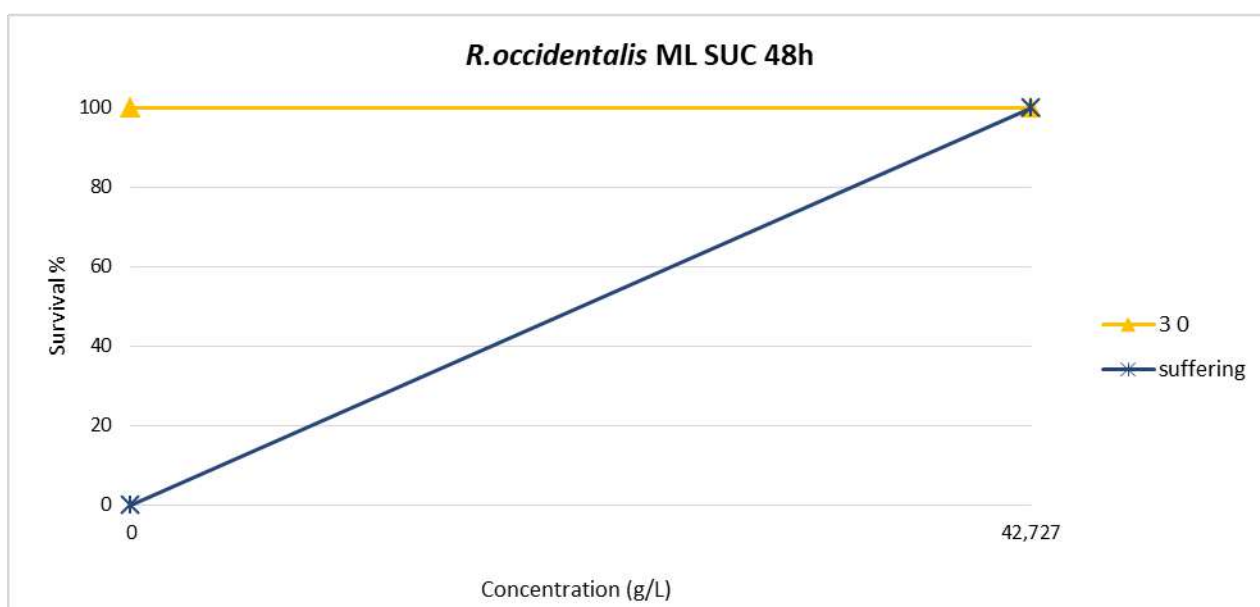
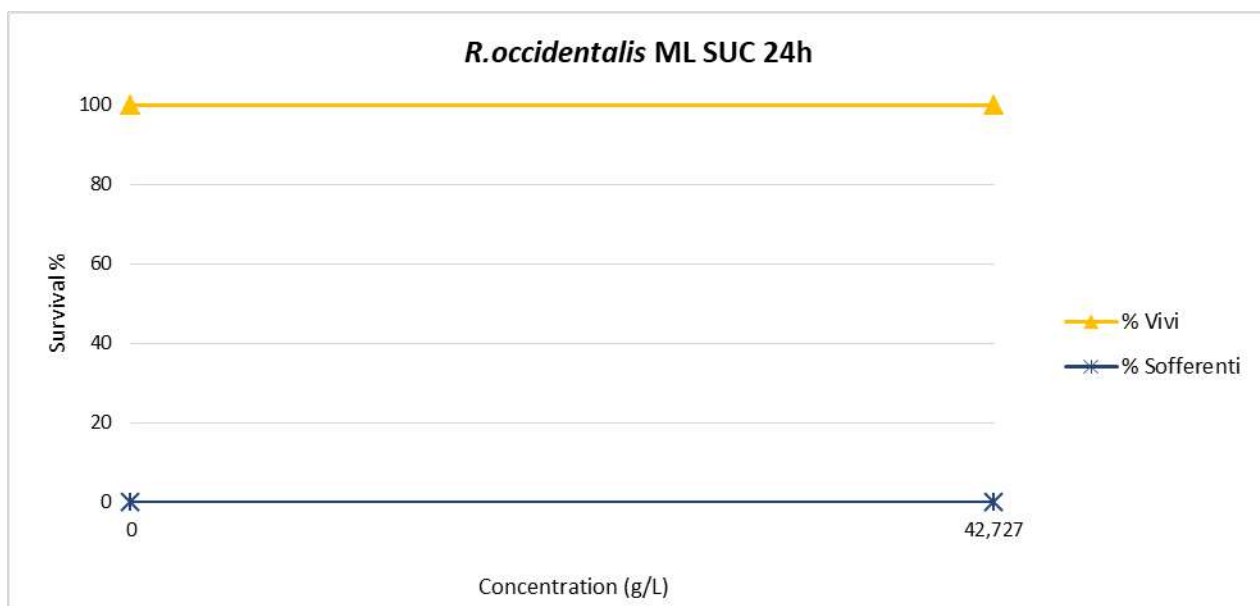
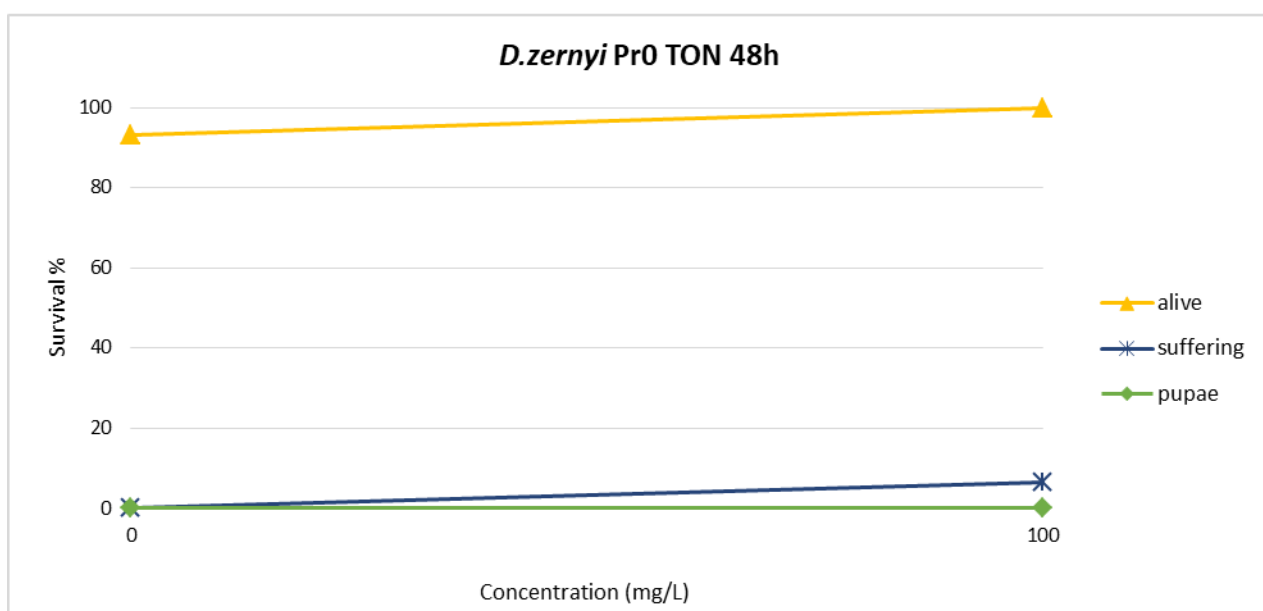
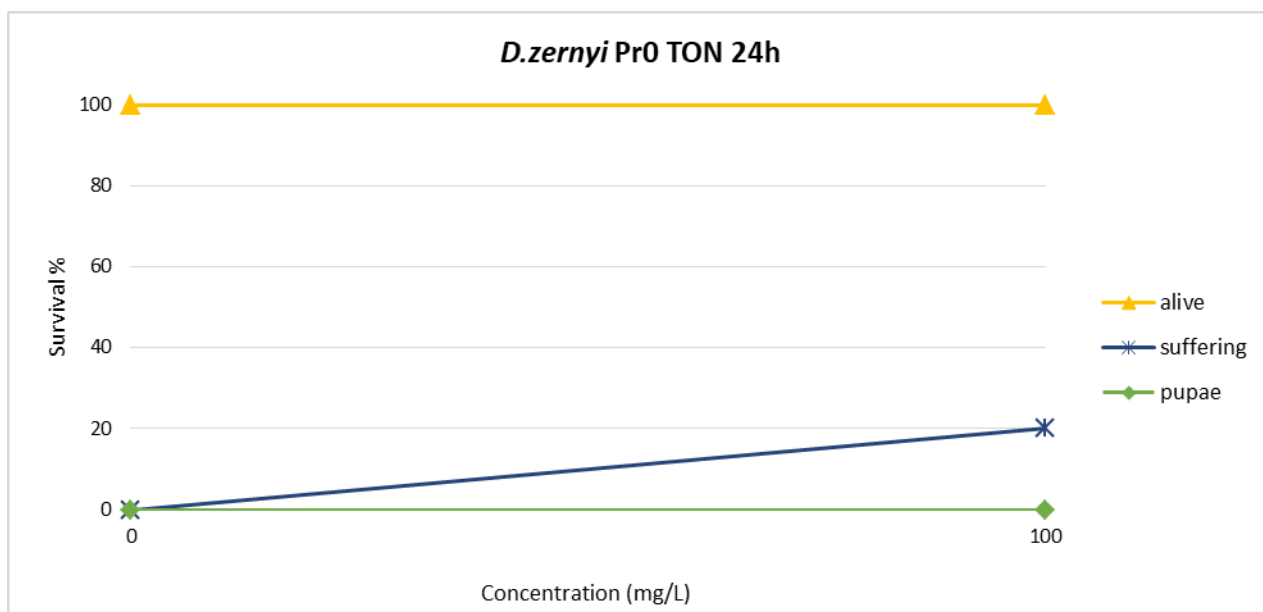


Figura A1-23 – Andamento di sopravvivenza di larve di *Rhyacophila occidentalis* (ML) esposte a Sucralosio. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi e di sofferenti. Le prove sono state svolte in singolo e con un solo animale per prova.



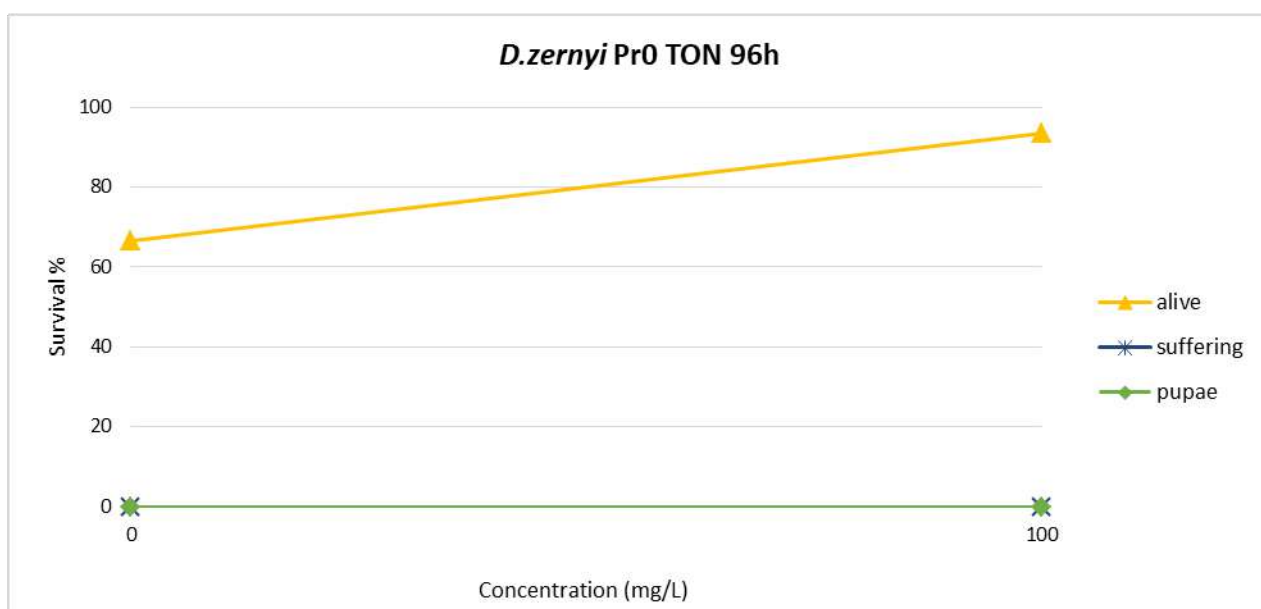
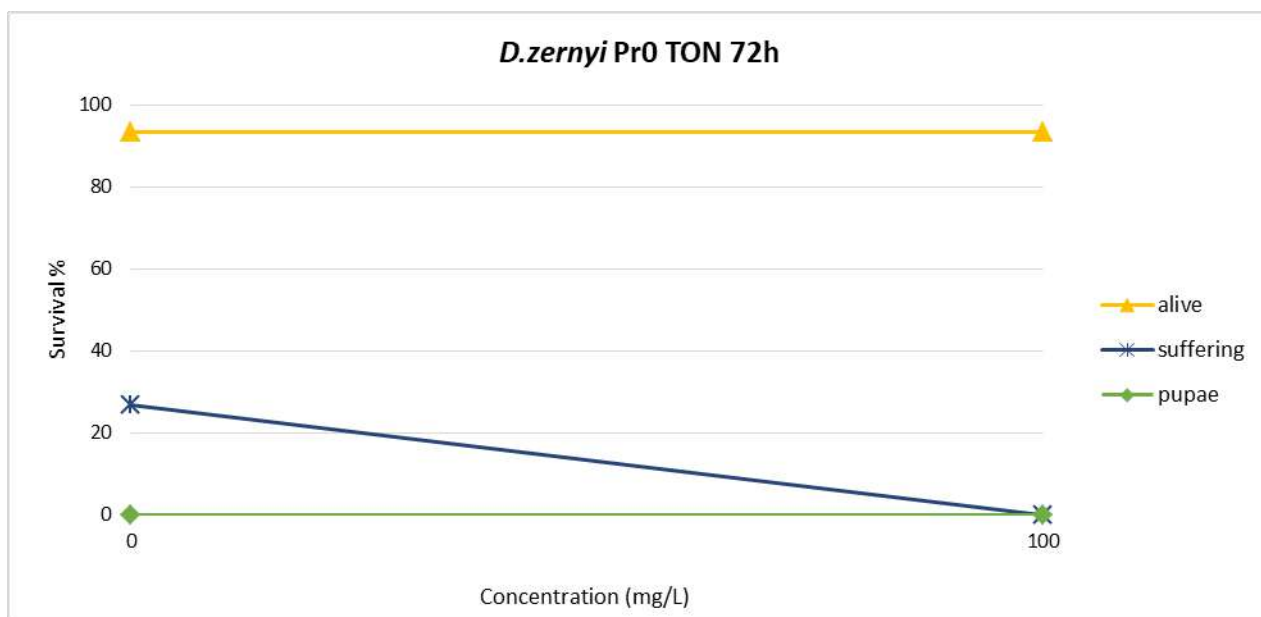
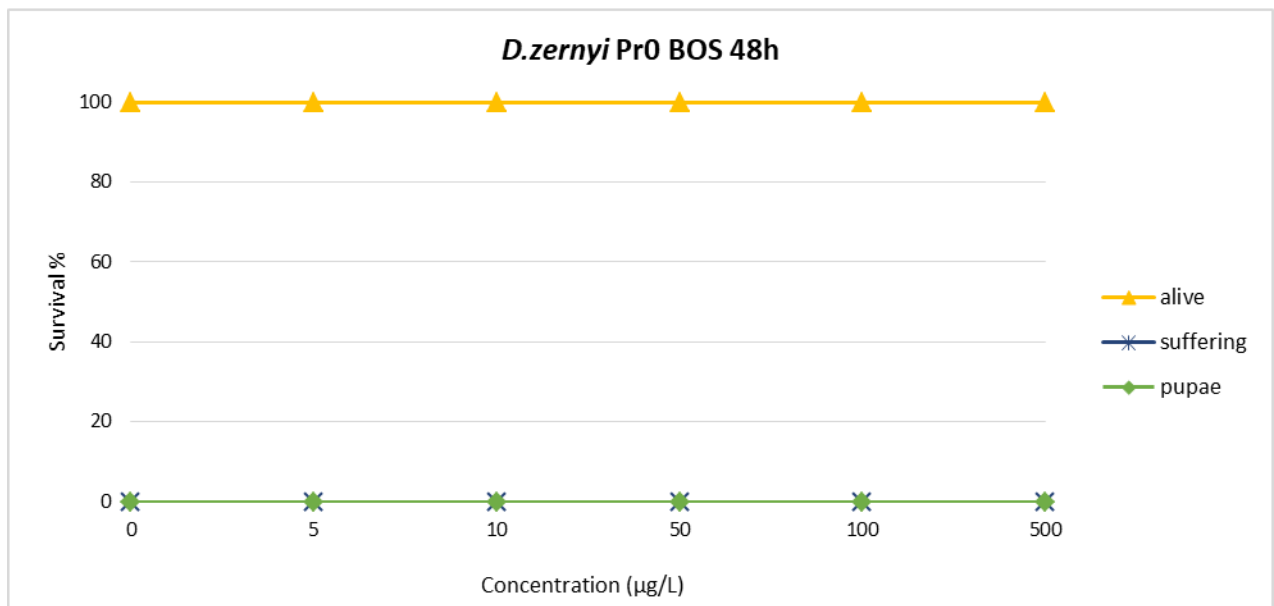
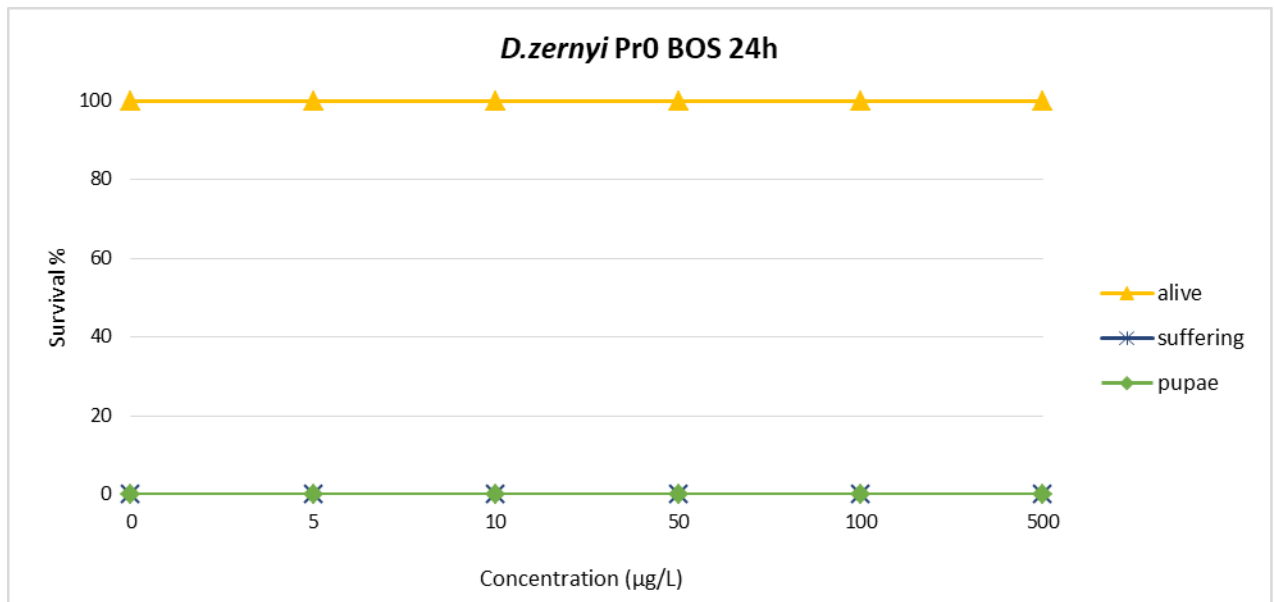


Figura A1-24 – Andamento di sopravvivenza di larve di *Diamesa* gr. *zernyi* (PR0) esposte a Sucralosio. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, di sofferenti e di pupe. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato con 5 animali per replica.



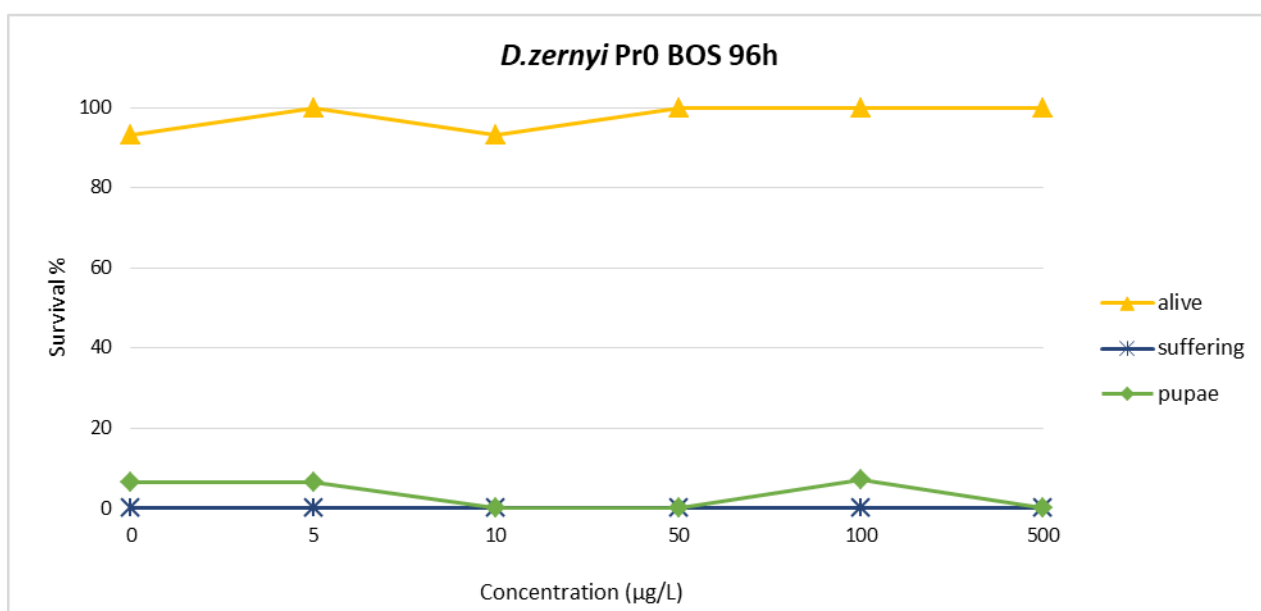
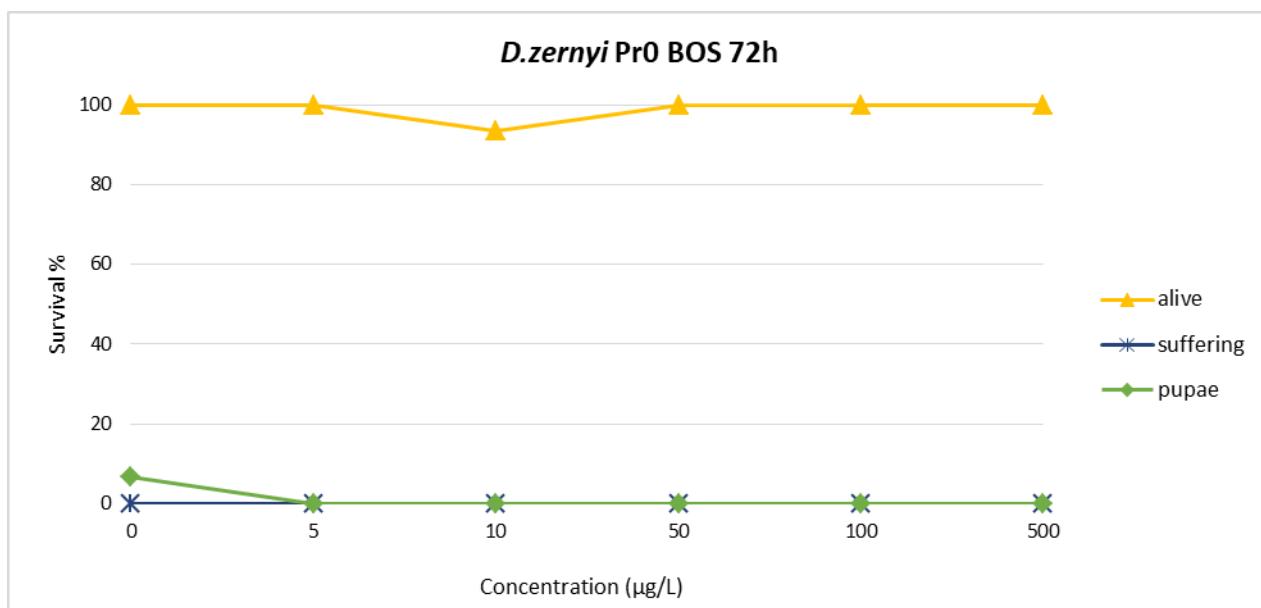


Figura A1-25 – Andamento di sopravvivenza di larve di *Diamesa* gr. *zernyi* (PR0) esposte a differenti concentrazioni di Boscalid. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, di sofferenti e di pupe. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato con 5 animali per replica.

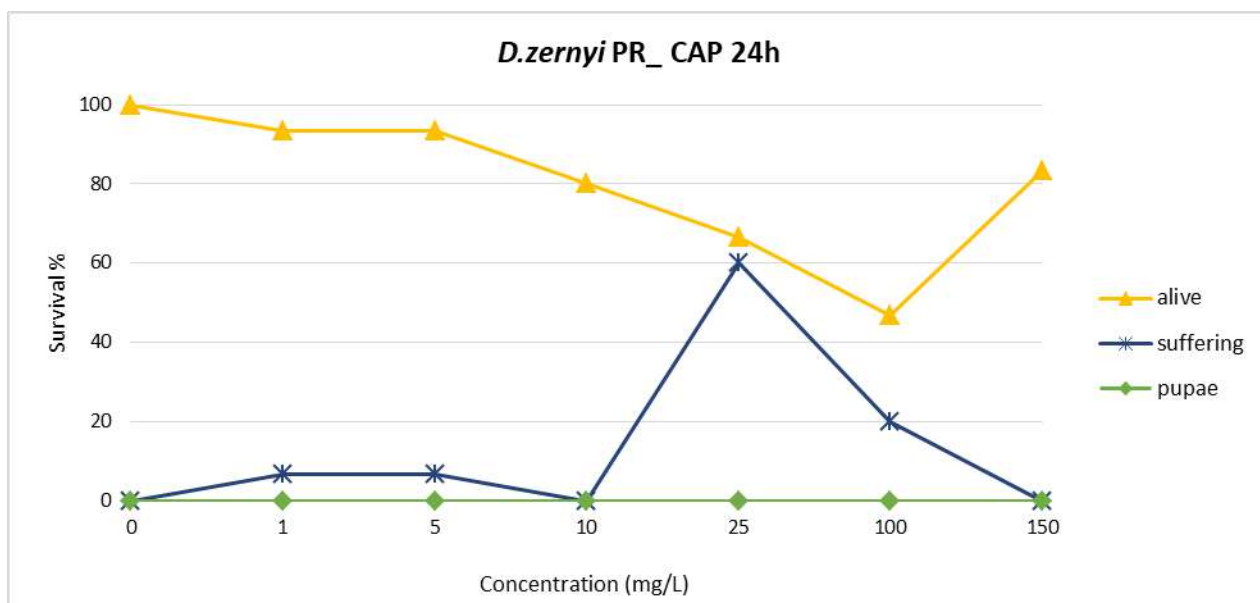


Figura A1-26 – Andamento di sopravvivenza di larve di *Diamesa* gr. *zernyi* (PR0) esposte a differenti concentrazioni di Captan. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, di sofferenti e di pupe. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato con 5 animali per replica.

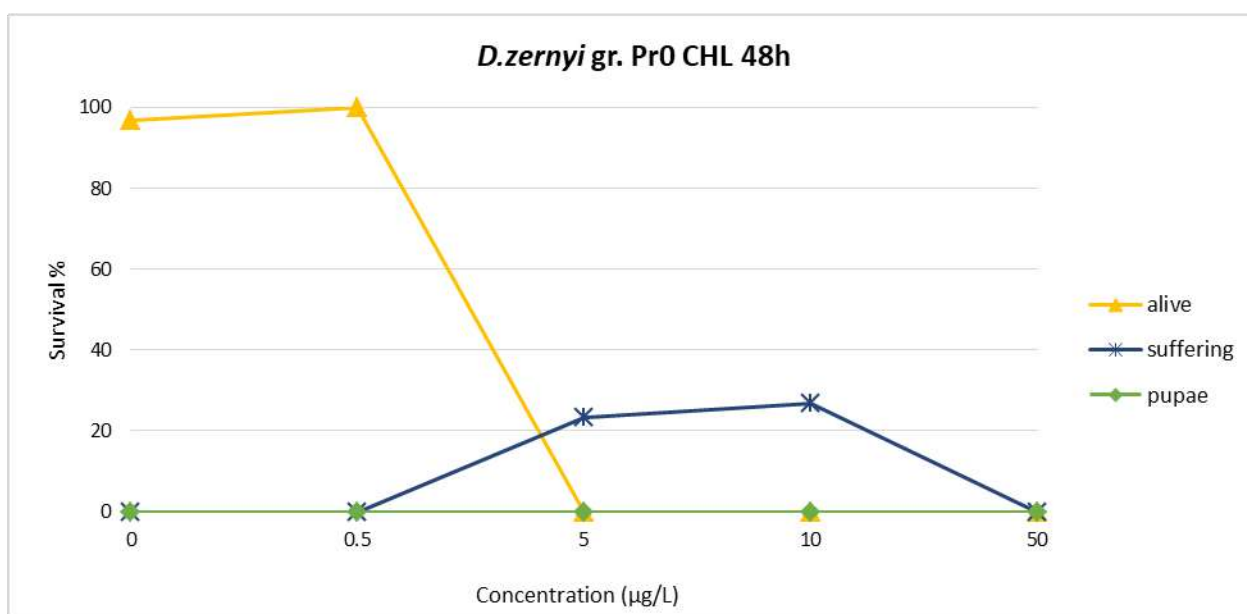
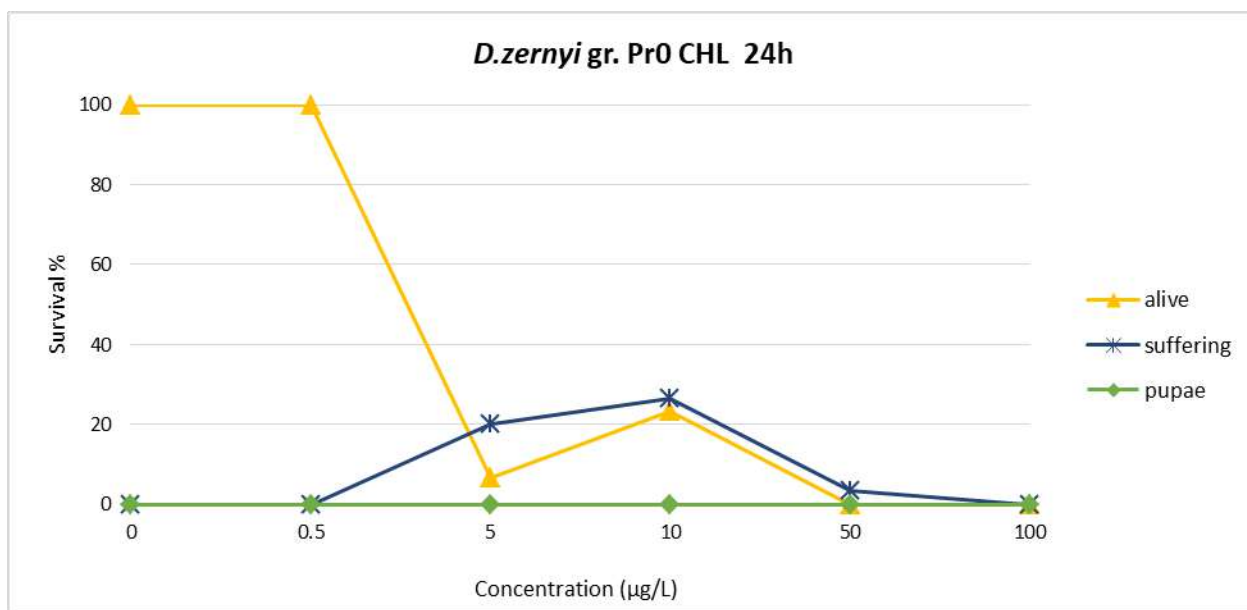


Figura A1-27 – Andamento di sopravvivenza di larve di *Diamesa* gr. *zernyi* (Pr0) esposte a differenti concentrazioni di Chlorpyrifos. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, di sofferenti e di pupe. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato con 10 animali per replica.

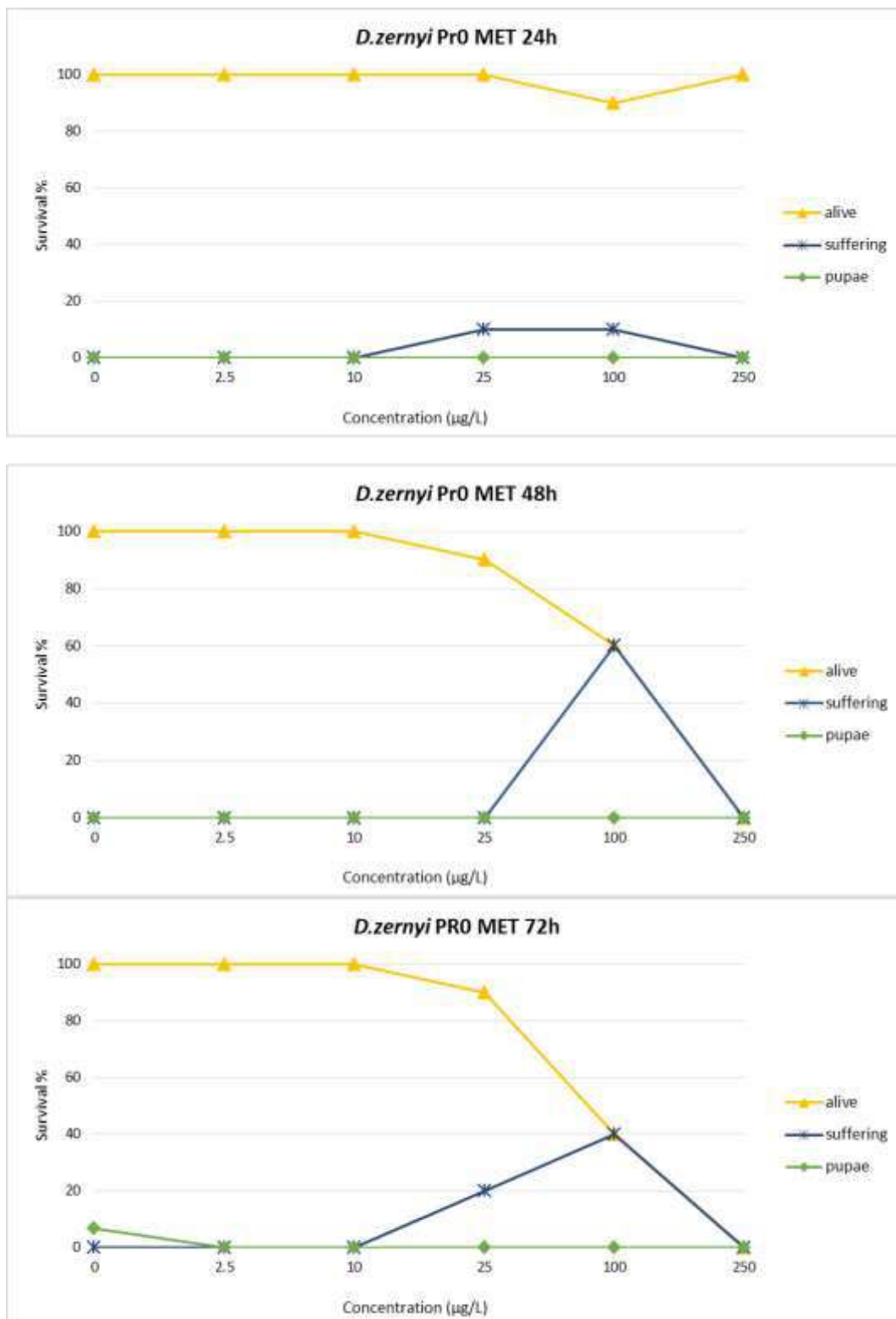
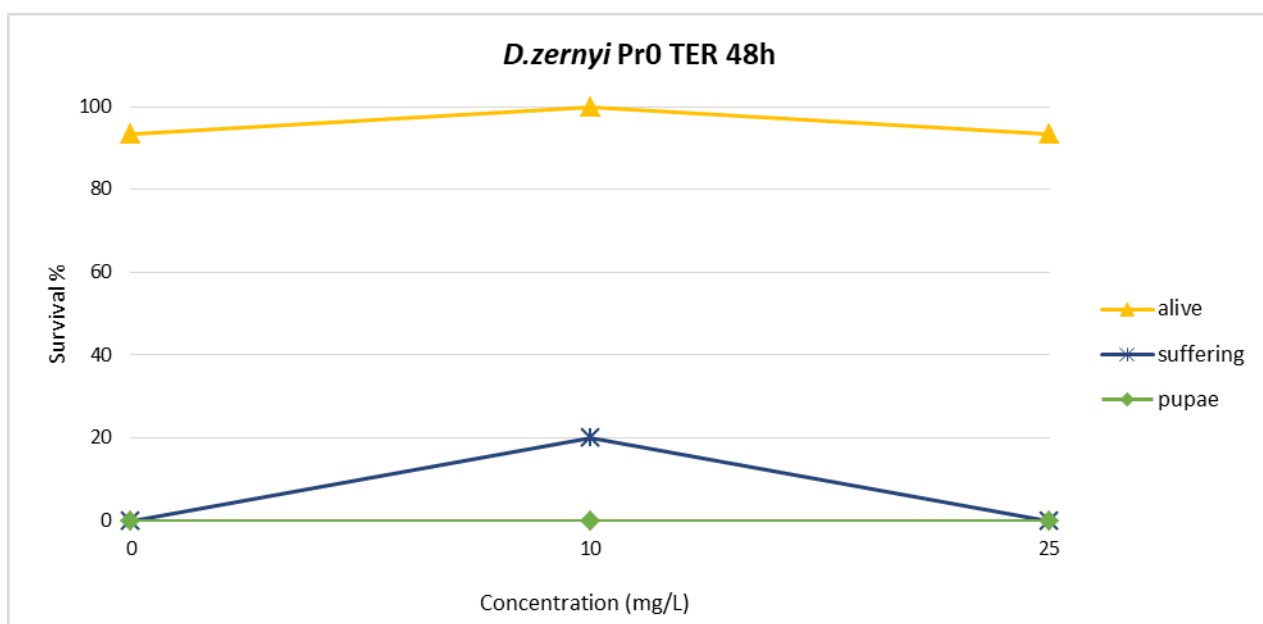
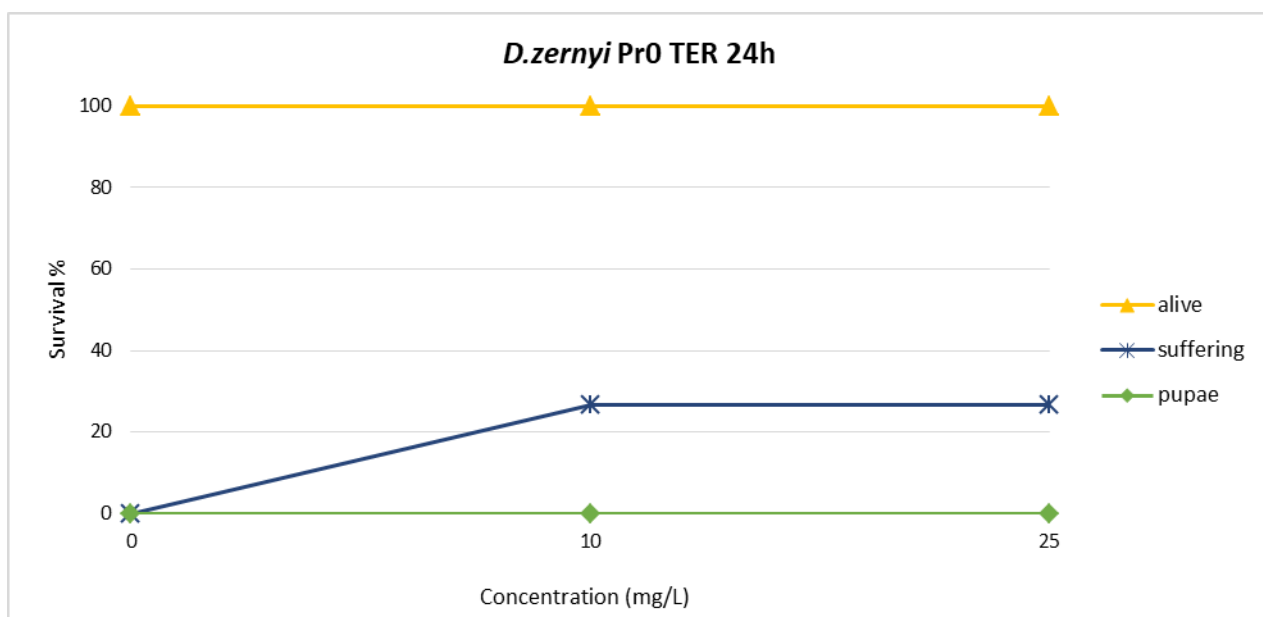


Figura A1-28 – Andamento di sopravvivenza di larve di *Diamesa* gr. *zernyi* (PR0) esposte a differenti concentrazioni di Metolachlor. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, di sofferenti e di pupe. Ogni concentrazione è stata testata in duplicato con 5 animali per replica.



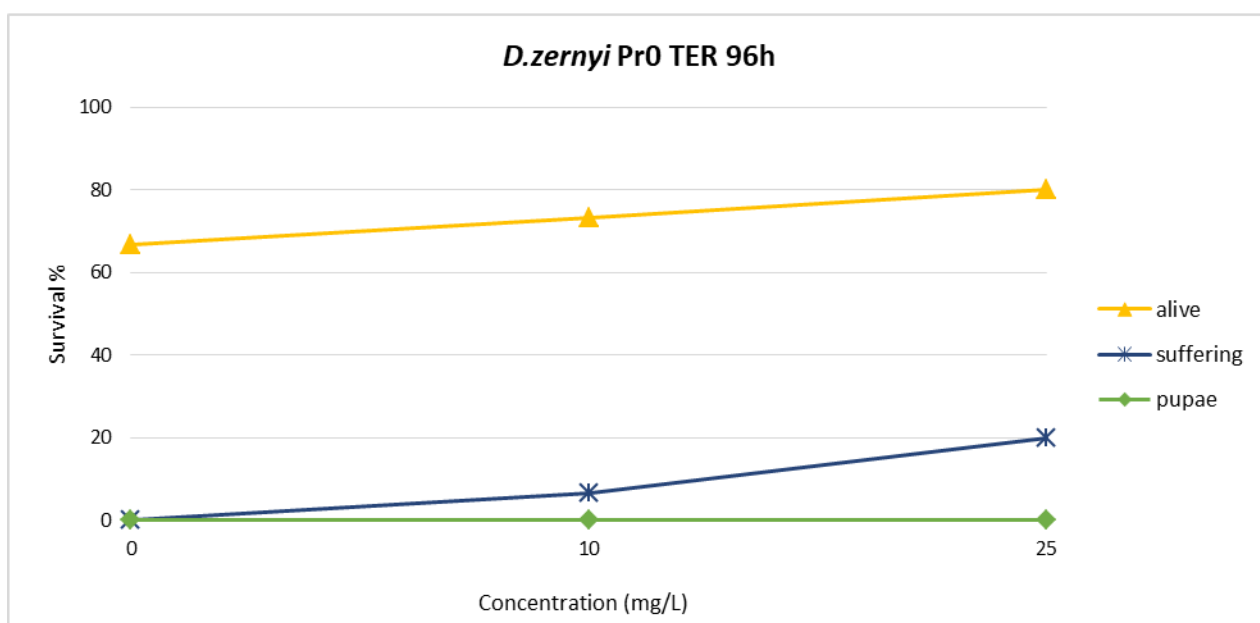
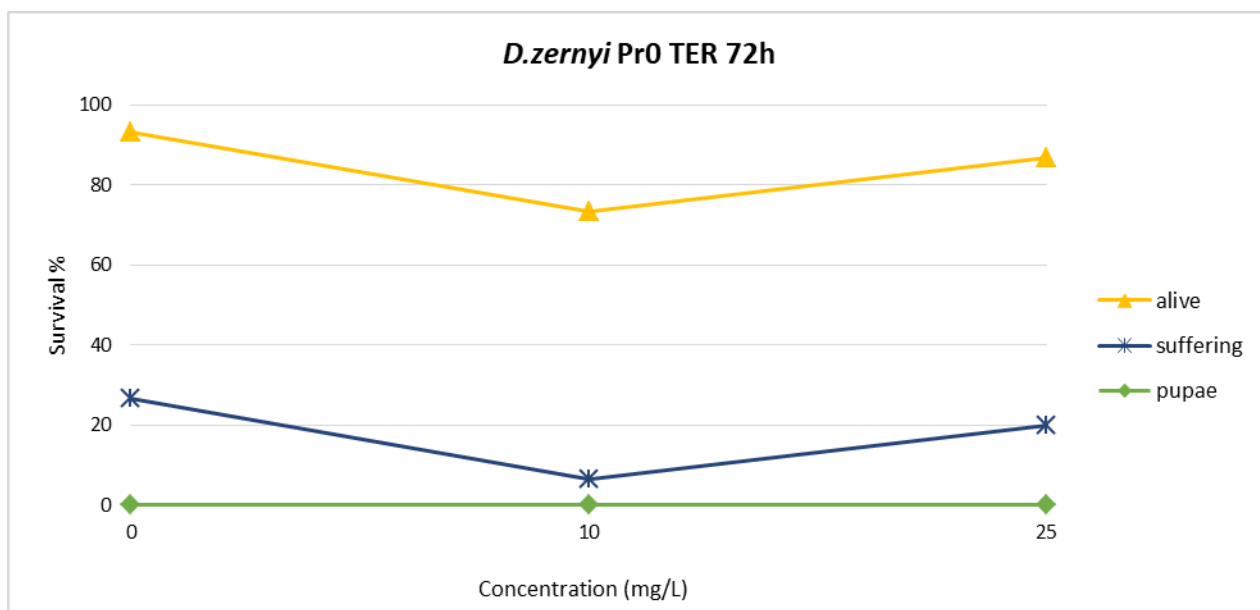


Figura A1-29 – Andamento di sopravvivenza di larve di *Diamesa* gr. *zernyi* (Pr0) esposte a differenti concentrazioni di Terbutilazina. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, di sofferenti e di pupe. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato con 5 animali per replica.

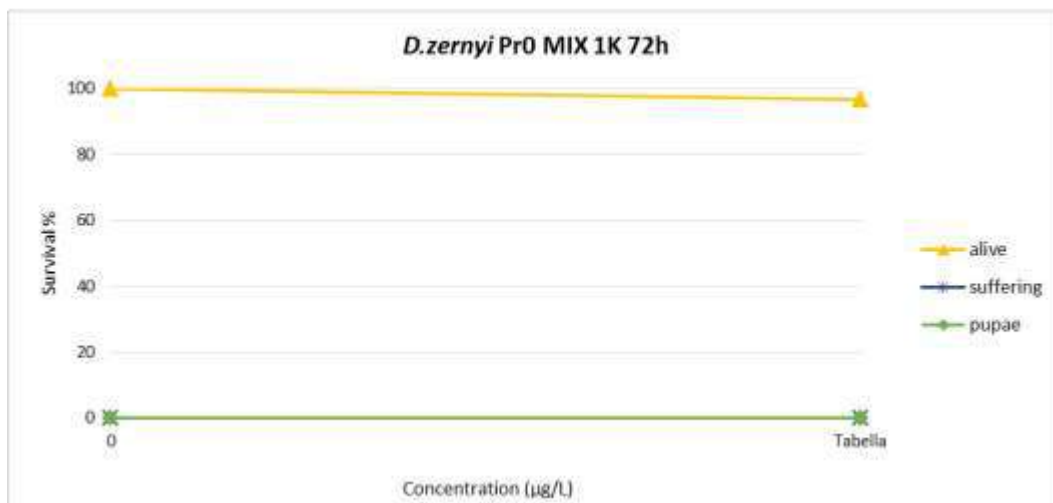
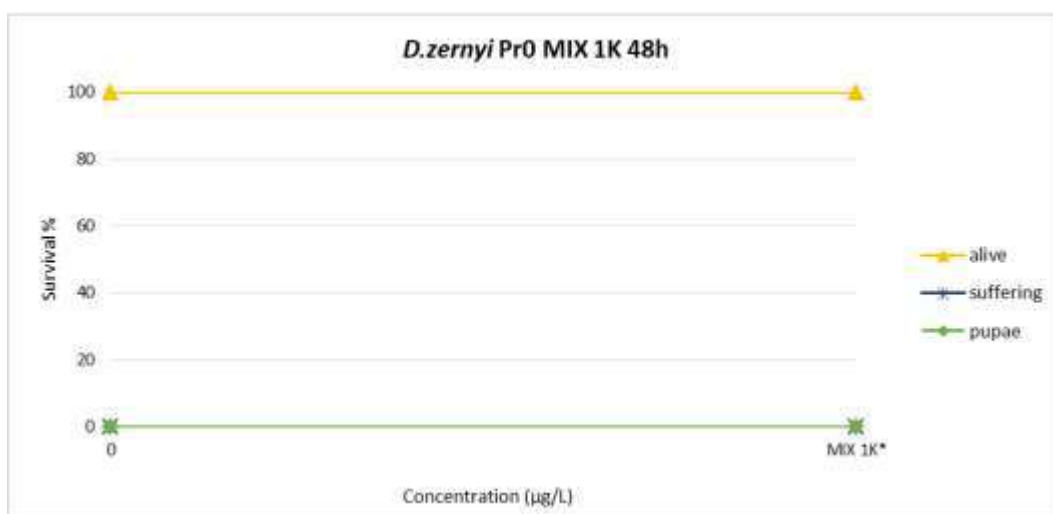


Figura A1-30 – Andamento di sopravvivenza di larve di Diamesa gr. zernyi (PR0) esposte alla miscela 1k. Nei grafici sono indicate le percentuali di vivi, di sofferenti e di pupe. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato con 5 animali per replica.

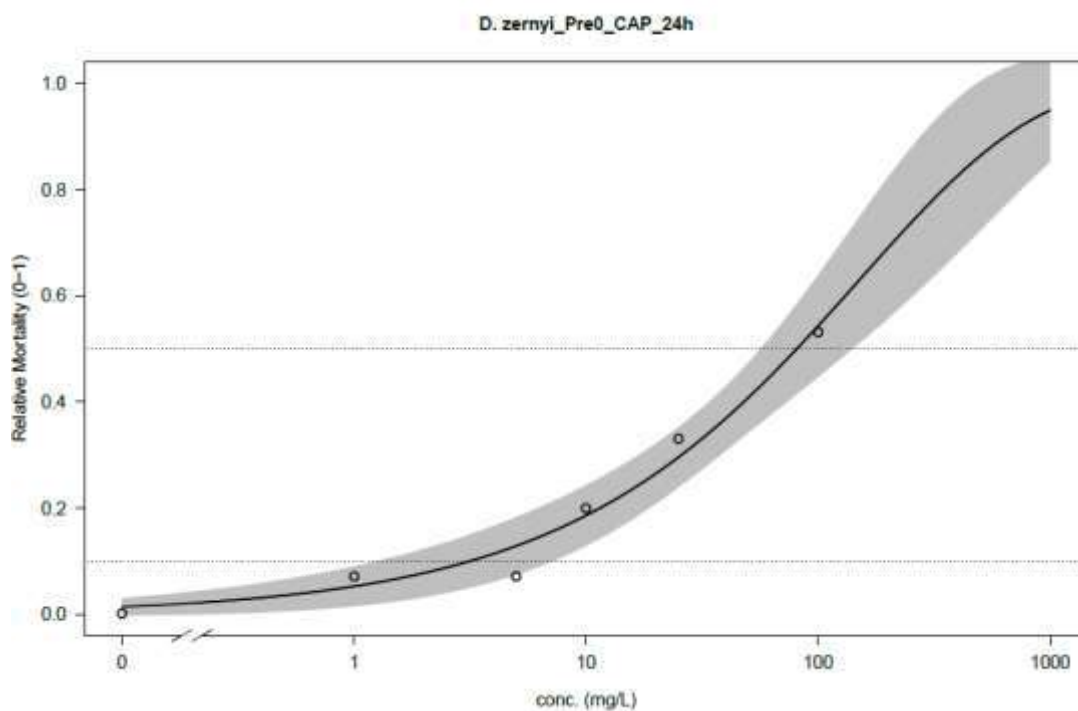


Tabella A1-17 – Curva dose-risposta stimata con una distribuzione di Weibull per larve di *Diamesa* gr. *zernyi* esposte a Captan.

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:(Intercept)	0.579708	0.068211	8.498697	0.0011
e:(Intercept)	152.547142	30.764519	4.958541	0.0077

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	0.054595	0.043142	-0.065185	0.1744
1:5	0.908344	0.424248	-0.269557	2.0862
1:10	3.144251	1.035198	0.270080	6.0184
1:15	6.640616	1.665588	2.016201	11.2650
1:20	11.473817	2.278632	5.147321	17.8003
1:25	17.783826	2.900929	9.729557	25.8381
1:30	25.767451	3.635395	15.673976	35.8609
1:35	35.685979	4.674446	22.707637	48.6643
1:40	47.882033	6.279681	30.446842	65.3172
1:45	62.806988	8.739552	38.542100	87.0719
1:50	81.063805	12.362243	46.740716	115.3869
1:55	103.474876	17.520057	54.831399	152.1184
1:60	131.193182	24.723056	62.550973	199.8354
1:65	165.893294	34.724248	69.483325	262.3033
1:70	210.120467	48.698321	74.912252	345.3287
1:75	267.982012	68.594833	77.532223	458.4318
1:80	346.671736	97.930744	74.772401	618.5711
1:85	460.383104	143.872145	60.929991	859.8362
1:90	643.025872	224.187702	20.581026	1265.4707
1:95	1012.452796	403.673535	-108.324614	2133.2302
1:99	2125.725134	1024.729467	-719.379978	4970.8302

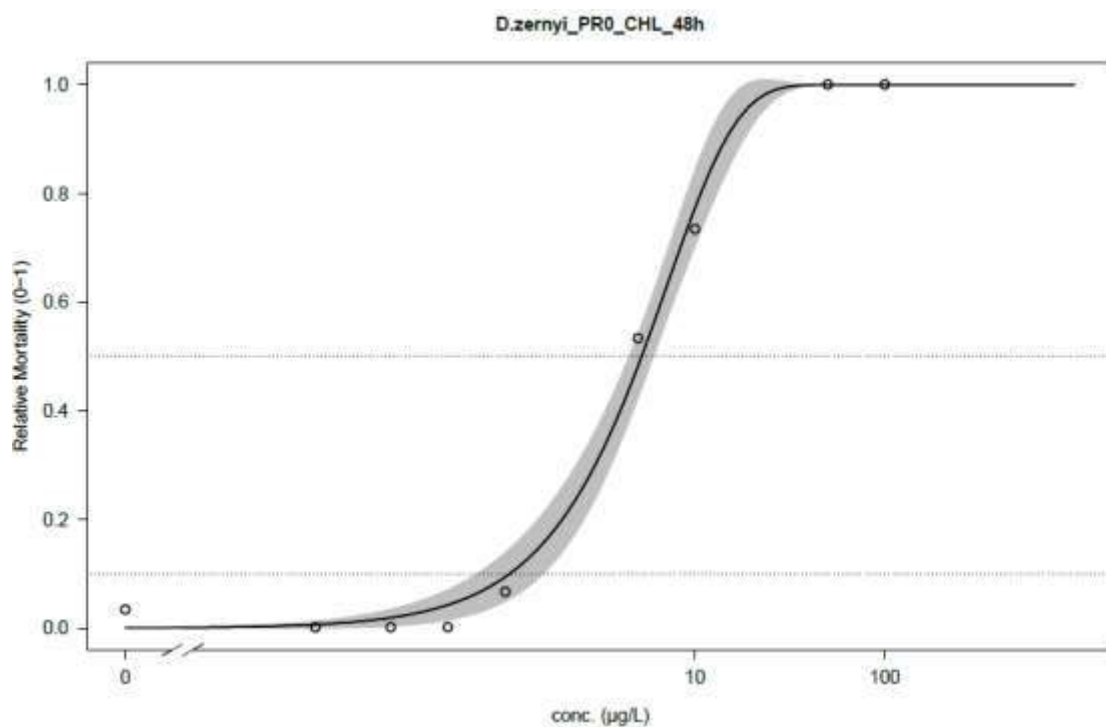


Tabella A1-18 – Curva dose-risposta stimata con una distribuzione di Weibull per larve di *Diamesa* gr. *zernyi* esposte a Chlorpyrifos.

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:(Intercept)	1.17760	0.11312	10.41051	0
e:(Intercept)	7.15907	0.45080	15.88067	0

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	0.143990	0.052649	0.019495	0.268485
1:5	0.574719	0.135414	0.254516	0.894922
1:10	1.059074	0.190174	0.609383	1.508765
1:15	1.530261	0.224684	0.998968	2.061553
1:20	2.003005	0.247958	1.416678	2.589331
1:25	2.485259	0.264126	1.860701	3.109816
1:30	2.982989	0.275915	2.330554	3.635424
1:35	3.501653	0.285705	2.826068	4.177237
1:40	4.046924	0.296026	3.346934	4.746914
1:45	4.625228	0.309851	3.892547	5.357910
1:50	5.244297	0.330716	4.462277	6.026317
1:55	5.913886	0.362656	5.056342	6.771431
1:60	6.646845	0.410042	5.677250	7.616439
1:65	7.460838	0.477606	6.331479	8.590197
1:70	8.381372	0.570994	7.031186	9.731558
1:75	9.447532	0.698174	7.796614	11.098450

1:80	10.724120	0.872380	8.661269	12.786971
1:85	12.331366	1.119007	9.685335	14.977396
1:90	14.536024	1.496644	10.997024	18.075024
1:95	18.175947	2.197400	12.979922	23.371972
1:99	26.186455	3.985092	16.763209	35.609701

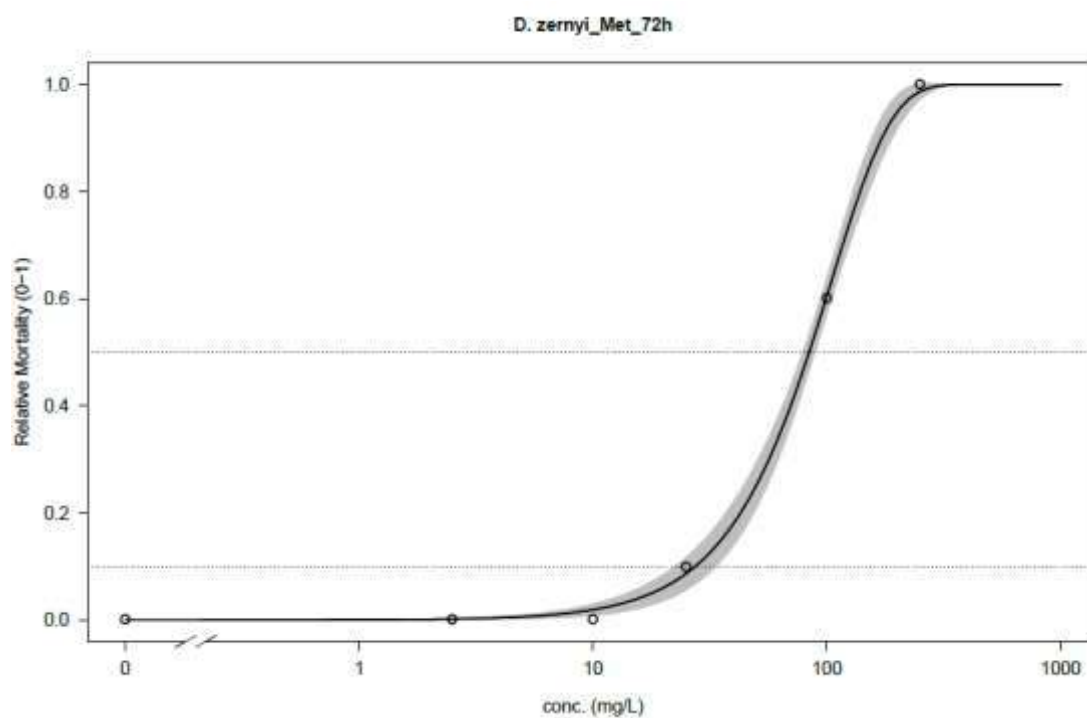


Tabella A1-19– Curva dose-risposta stimata con una distribuzione di Weibull per larve di *Diamesa* gr. *zernyi* esposte a Metolachlor.

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:(Intercept)	1.679330	0.097415	17.238846	1e-04
e:(Intercept)	104.635922	2.274908	45.995663	0e+00

	Estimate	Std. Error	Lower	Upper
1:1	6.7613	1.0549	3.8324	9.6902
1:5	17.8465	1.7943	12.8648	22.8283
1:10	27.3974	2.0938	21.5842	33.2106
1:15	35.4645	2.2054	29.3414	41.5875
1:20	42.8330	2.2287	36.6452	49.0209
1:25	49.8284	2.2010	43.7173	55.9394
1:30	56.6331	2.1428	50.6836	62.5826
1:35	63.3710	2.0694	57.6255	69.1166
1:40	70.1398	1.9958	64.5987	75.6809
1:45	77.0267	1.9398	71.6411	82.4123

1:50	84.1194	1.9238	78.7780	89.4609
1:55	91.5146	1.9747	86.0319	96.9973
1:60	99.3282	2.1201	93.4419	105.2145
1:65	107.7097	2.3845	101.0894	114.3300
1:70	116.8654	2.7888	109.1225	124.6084
1:75	127.1020	3.3578	117.7791	136.4248
1:80	138.9153	4.1340	127.4375	150.3932
1:85	153.2073	5.2044	138.7575	167.6571
1:90	171.9378	6.7753	153.1266	190.7490
1:95	201.1067	9.5141	174.6914	227.5221
1:99	259.7929	15.8314	215.8378	303.7480