



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea magistrale in Scienze Ambientali
Valutazione e Gestione dei Sistemi Ambientali

Tesi di Laurea Magistrale

**Valutazione degli effetti tossici dei pesticidi Nitenpyram,
Dinotefuran e Flupyradifurone sullo sviluppo larvale del
copepode *Acartia tonsa* e confronto con i maggiori
neonicotinoidi di interesse comunitario**

Relatore

Dott. Marco Picone

Laureanda

Sonia Accordi

Matricola 974667

Anno Accademico

2019-2020

ABSTRACT

A livello mondiale, l'impiego di pesticidi per il controllo degli infestanti e dei parassiti, sia in ambito agricolo sia in ambito sanitario, ha registrato una crescita esponenziale a partire dalla Seconda Guerra Mondiale. Sempre nuovi principi sono stati sintetizzati per sostituire i prodotti precedentemente utilizzati, per i quali sono sorte nel tempo problematiche legate alla persistenza nelle diverse matrici ambientali e all'impatto su specie non-target. La necessità di trovare alternative a organofosforici e carbammati ha portato a partire dagli anni '90 all'immissione sul mercato di due importanti categorie di pesticidi: i neonicotinoidi e i butenolidi. Seppur nel corso del tempo i neonicotinoidi siano stati a loro volta oggetto di numerosi studi ecotossicologici, conseguenti la scoperta degli effetti negativi su insetti impollinatori, tali studi sono tutt'oggi limitati ai principi maggiormente presenti sul mercato, quali Imidacloprid, Thiamethoxam e Clothianidin, e si concentrano in particolar modo sull'ambiente dulciacquicolo, mentre per le sostanze minori mancano spesso dati esaustivi per un'adeguata valutazione dell'ecotossicità o essi si limitano a una o poche specie test di acqua dolce. Scopo di questo progetto di tesi è valutare la tossicità relativa di composti non presenti nella Watch List Europea (Nitenpyram, Dinotefuran, Flupyradifurone) rispetto ai neonicotinoidi di interesse comunitario sopracitati, per cui sono già presenti studi e il cui impiego è soggetto a restrizione. Lo studio è stato condotto utilizzando gli stadi larvali sul copepode planctonico *Acartia tonsa* (ISO 16778/2015), specie di particolare importanza perché cosmopolita e abbondante in ambiente estuarino e lagunare. Il test prevede l'esposizione di un numero noto di uova a concentrazioni crescenti di pesticida e la valutazione a 5 giorni della percentuale di schiusa, dello sviluppo larvale o larval development ratio (LDR) e della mortalità degli stadi larvali. I dati raccolti hanno permesso di calcolare alcuni parametri di interesse quali l'EC₅₀ (Effective Concentration in 50% del campione) e la NOEC (No Observed Effect Concentration). I neonicotinoidi indagati mostrano EC₅₀ rispettivamente pari a 9.38 µg L⁻¹ e 6.92 mg L⁻¹ per Nitenpyram e Dinotefuran, mentre il butenolide Flupyradifurone ha EC₅₀ pari a 0.018 µg L⁻¹ per *A. tonsa*, dimostrando un effetto tossico significativo a concentrazioni notevolmente minori. In accordo con studi riguardanti altri neonicotinoidi, anche Nitenpyram e Dinotefuran mostrano una discreta tossicità verso organismi acquatici non-target, mentre il Flupyradifurone, chimicamente differente dai pesticidi di altre categorie, sembra avere tossicità più marcata.

Indice

1. Introduzione	4
1.1 I neonicotinoidi.....	5
1.2 I butenolidi: Flupyradifurone.....	13
1.3 La specie test	15
1.4 Biologia della specie test	16
1.5 <i>A. tonsa</i> come specie indicatrice	18
2. Materiali e metodi	19
2.1 Coltura ed allevamento	19
2.2 Preparazione delle soluzioni e allestimento del test.....	21
2.3 Analisi statistica	24
2.4 Quality Assurance/Quality control (QA/QC).....	25
3. Risultati	26
3.1 Verifica dell'accettabilità (QA/QC)	26
3.2 Test LDR con <i>A. tonsa</i>	26
4. Discussione e conclusioni	34
Bibliografia.....	42
Appendice.....	52

1. Introduzione

I pesticidi vengono definiti come qualsiasi sostanza o miscela di sostanze volta a prevenire, distruggere o controllare gli infestanti, inclusi vettori di malattie umane o animali e specie vegetali o animali indesiderate che possono danneggiare o interferire con la produzione, lo stoccaggio o la conservazione delle derrate, del legname o dei mangimi (FAO, 1991). Da tale definizione si evince come vengano ricompresi non solo prodotti impiegati in agricoltura per controllare le erbe infestanti, migliorare la produzione e proteggere le derrate durante la conservazione, ma anche composti volti a proteggere la salute umana, a contrastare parassitosi e patologie veterinarie e trattamenti per la preservazione dei materiali. Si tratta dunque di un gruppo eterogeneo di composti e di principi attivi, in cui ricadono i prodotti fitosanitari, i biocidi e gli antiparassitari, che dalla Seconda Guerra Mondiale ha registrato un impiego sempre più importante a livello globale. In Europa, il mercato dei pesticidi si attesta piuttosto stabile (European Environment Agency, 2018), seppur, nell'ultimo decennio, siano stati autorizzati numerosi nuovi principi attivi. Ciò deriva, analogamente a quanto si riscontra a livello mondiale, dalla ricerca di prodotti sempre più efficaci e da un progressivo abbandono di pesticidi, messi al bando, per i quali si sono consolidate conoscenze dal punto di vista tossicologico o ecotossicologico. Alcuni studi mettono in luce, per esempio, come nel corso del tempo vi sia stata una progressiva contrazione del mercato degli insetticidi organofosforici e carbammati e un parallelo aumento di neonicotinoidi ed altri composti (Carisa & Durkin, 2013).

I pesticidi possono essere classificati in base alla loro identità chimica o al meccanismo d'azione e lo scopo a cui sono destinati. Nel primo caso parleremo di organo-clorurati, organofosforici, carbammati, piretrine e piretroidi, neonicotinoidi e butenolidi; nel secondo caso invece possiamo individuare algicidi ed erbicidi, rispettivamente per il controllo di alghe e piante, battericidi o batteriostatici per uccidere o inibire la proliferazione dei batteri, fungicidi o anticrittogamici per il controllo di funghi e muffe, acaricidi, insetticidi, molluschicidi e nematocidi per i trattamenti contro acari, insetti, molluschi e nematodi.

In particolare, in Europa tre categorie (insetticidi, erbicidi e fungicidi) coprono più del 70% del mercato (European Environment Agency, 2018). Nonostante la sempre maggiore attenzione rivolta ai pesticidi e l'imposizione di autorizzazioni per la commercializzazione dei prodotti, l'immissione sul mercato non è sempre accompagnata da conoscenze esaustive sul destino

ambientale dei diversi principi attivi, sulla persistenza e sugli effetti in specie non-target. Effetti avversi degli insetticidi su specie non-target sono noti già dagli anni '50 (Cluzeau, 2002; Decourtye & Devillers, 2010), tuttavia il ricorso a test di esposizione acuta per la valutazione della tossicità, l'analisi degli effetti letali e la sintesi di sempre nuovi principi attivi limitano o ritardano la comprensione degli effettivi impatti derivanti dall'utilizzo di queste sostanze, che possono manifestarsi anche come effetti subletali a lungo termine, per i quali sono necessari studi che vertano su test di esposizione cronica o sub-cronica.

1.1 I neonicotinoidi

I neonicotinoidi sono insetticidi sistemici ad ampio spettro, efficaci sia per parassiti masticatori sia per succhiatori. Si tratta di xenobiotici modellati, sulla base della struttura molecolare della nicotina, a partire dagli anni '90, in alternativa all'impiego di organofosforici e carbammati, di cui iniziavano ad emergere forme di resistenza ed evidenze di effetti tossici anche nell'uomo (Eskenazi et al, 1999). Il primo neonicotinoide ad essere immesso sul mercato fu l'Imidacloprid nel 1991, seguito da Acetamiprid, Nitenpyram, Thiamethoxam, Thiacloprid, Clothianidin e Dinotefuran in poco più di dieci anni (Jeschke & Nauen, 2008).

Si tratta della classe di insetticidi in più rapida crescita nella protezione delle colture, grazie all'elevata idrosolubilità e all'azione sistemica che ne consentono l'applicazione sia sui semi sia sulla pianta come trattamento fogliare. A questo si aggiunge l'uso veterinario, autorizzato in più di 120 paesi a livello mondiale (Gonzales-Mariño et al, 2018). Proprio le proprietà chimico-fisiche, quali la solubilità in acqua, la resistenza all'idrolisi o la scarsa affinità col suolo che li hanno resi composti ideali per diversi trattamenti, conferiscono ai neonicotinoidi persistenza e facilità di trasporto verso gli ecosistemi acquatici attraverso le precipitazioni ed il runoff, destando preoccupazione per il loro destino ambientale e i potenziali effetti tossici sulle specie non-target. Si stima infatti che approssimativamente il 5% di quanto applicato venga effettivamente assunto dalla pianta con differenze significative tra colture, passando da 1,6% per le coltivazioni a melanzane a 20% per il mais considerando i trattamenti su suolo o semi e un uptake non superiore al 30% per le piante da frutto sottoposte a trattamento fogliare (Sur & Stork, 2003), mentre il resto si disperde velocemente nell'ambiente circostante, raggiungendo in ultimo il comparto acquatico

(Armbrust & Peeler, 2002). Le acque dolci rappresentano i primi corpi idrici riceventi e nel tempo hanno avuto grande attenzione per quanto riguarda gli studi ecotossicologici. Si sono sviluppati e standardizzati protocolli di analisi oggi largamente impiegati nei test, come quelli che prevedono l'utilizzo del crostaceo cladocero planctonico *Daphnia magna*. Questa specie è ampiamente utilizzata in ecotossicologia acquatica per il controllo delle sostanze di nuova immissione sul mercato e per le acque di scarico, anche grazie alla facilità di mantenimento e riproduzione, alla presenza di kit e ai costi contenuti. Minore attenzione, invece, hanno ricevuto gli ambienti di transizione e costieri, seppur di notevole importanza quali ambienti deposizionali per eccellenza e recettori finali degli apporti superficiali di fiumi e runoff.

I neonicotinoidi esercitano un'azione neurotossica, interferendo con la trasmissione dell'impulso a livello di sistema nervoso centrale. Essi sono in grado di legare, in modo permanente negli invertebrati, i recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChR), presenti sulla membrana del neurone post-sinaptico: in questo modo agiscono da agonisti ed entrano in competizione con il neurotrasmettitore acetilcolina (ACh), che normalmente si legherebbe a questi recettori consentendo la trasmissione dell'impulso. Tuttavia, il legame neonicotinoide-recettore si dimostra essere duraturo negli artropodi (Tennekes, 2010), in quanto la molecola non viene riconosciuta e conseguentemente idrolizzata dall'enzima acetilcolinesterasi (AChE), causando sovrastimolazione fino a condurre alla morte o all'insorgenza di effetti subletali (Morrissey et al 2015). Negli invertebrati, l'affinità della molecola per il recettore è particolarmente elevata, generando effetti persistenti, cumulativi e irreversibili (Tennekes, 2010), mentre nei vertebrati la diversa configurazione delle subunità del recettore nAChR, conferita da piccoli cambiamenti strutturali, si traduce in un legame più debole e/o meno duraturo (Yamamoto et al, 1995; Tomizawa & Casida 2009). Tra gli invertebrati, inoltre, la sensibilità ai neonicotinoidi è notevolmente diversificata: si dimostrano estremamente sensibili anche specie acquatiche non-target tra cui oligocheti come *Lumbriculus variegatus*, crostacei come *Daphnia magna* o *Gammarus pulex* e odonati come *Simpetrum striolatum* (Alexander et al, 2007; Beketov & Liess, 2008) ed imenotteri impollinatori quali api e bombi (Decourtye & Devillers, 2010). Sono quindi da considerare anche eventuali effetti indiretti, per esempio derivanti dalle relazioni trofiche. Diversi studi sottolineano come, seppur i vertebrati siano target di solo il 2% dei pesticidi commercializzati, impatti non intenzionali siano ben documentati e tipicamente associati a modificazione dell'habitat o perdita/diminuzione delle prede (Gibbons et al, 2014; Sánchez-Bayo, 2011; Sotherton & Holland, 2002).

Non bisogna inoltre trascurare il fatto che, seppur appartenenti alla stessa classe di insetticidi, i neonicotinoidi presentano diversa struttura molecolare, in grado di conferire caratteristiche leggermente diverse in termini di uptake, detossificazione o attività insetticida. A titolo esemplificativo, uno studio condotto in laboratorio su organismi non-target (*Apis mellifera*) ha messo in luce come i composti contenenti un gruppo nitrico risultino essere più tossici rispetto a quelli con gruppo cianidrico, con differenze significative tra principi attivi: passando da una LD₅₀ compresa tra 18 e 138 ng ind⁻¹ per la prima categoria a una compresa tra 7,1 e 14,6 mg ind⁻¹ per i neonicotinoidi con un gruppo cianidrico (Iwasa et al, 2004).

Tra i neonicotinoidi di più ampio impiego troviamo Imidacloprid, Acetamiprid, Clothianidin, Thiacloprid e Thiamethoxam. Per questi principi attivi esiste già una ricca bibliografia sia per quanto riguarda lo studio della molecola in sé e delle sue proprietà, sia per quanto riguarda gli impatti sugli ambienti acquatici, in particolare dulciacquicoli. L'Imidacloprid (C₉H₁₀ClN₅O₂) è un insetticida cloronicotinico: è stato il primo neonicotinoide sintetizzato, per far fronte all'insorgenza di forme di resistenza legate all'utilizzo di organofosforici e carbammati. Immesso per la prima volta sul mercato nel 1991, è prodotto dalla Bayer CropScience e commercializzato come principio attivo in svariati prodotti ad uso agricolo e non, tra i quali Kohinor[®], Admire[®], Advantage[®], Gaucho[®], Merit[®], Confidor[®], Hachikusan[®], Premise[®], Prothor[®] e Winner[®]. La percentuale di principio attivo nei diversi prodotti è diversificata, passando da 0,5% nel Merit[®] al 17,1% nel Confidor[®] al 70% nel Gaucho[®]¹. L'Imidacloprid è un insetticida ad ampio spettro, largamente utilizzato per il controllo degli infestanti, il trattamento dei semi e il controllo di pulci e zecche. È molto diffuso per l'eccellente azione sistemica. Causa effetti acuti da contatto e da ingestione, legandosi con elevata affinità ai recettori nicotinici dell'acetilcolina negli insetti e solitamente provocando la morte entro 24-48h. La tossicità è meno accentuata nei vertebrati, grazie a una ridotta affinità per gli nAChR specifici e una minore capacità di penetrazione della barriera emencefalica (Sheets, 2014). La persistenza in ambiente è strettamente correlata alle condizioni locali, come il pH, la temperatura, ma anche la copertura del suolo e l'uso di fertilizzanti. L'Imidacloprid, come gli altri neonicotinoidi, è soggetto a fotolisi in condizioni favorevoli, quali l'accumulo in specchi d'acqua poco profondi, mentre l'idrolisi è trascurabile (Morrissey et al, 2015): l'emivita del principio sottoposto a idrolisi si attesta in un range tra 33-44 giorni a 25°C e pH 7. Intuitivamente, la fotolisi interessa solo la superficie del suolo, dove l'emivita dell'Imidacloprid è

¹ <https://www.sudan.cropscience.bayer.com/>

analoga ai valori di idrolisi precedentemente riportati: in profondità invece l'emivita può superare i 200 giorni a seconda delle condizioni della matrice (Fossen, 2006). La modesta pressione di vapore (1.0×10^{-7} mmHg) indica che si tratta di un insetticida non volatile, che difficilmente si disperde in atmosfera se non attraverso la formazione di polveri (Wood & Goulson, 2017), conseguenti anche alla lavorazione sul campo di colture precedentemente trattate (Fossen, 2006). L'elevata persistenza nel suolo aumenta la disponibilità nel tempo all'uptake del principio attraverso le radici delle piante; inoltre, come accade per gli altri neonicotinoidi, l'idrosolubilità (610 mg L^{-1} a 20°C)² e l'impossibilità di degradazione in assenza di luce determinano il rischio di trasporto dell'Imidacloprid verso le acque sotterranee (Morrisey et al, 2015). Come precedentemente accennato per i neonicotinoidi, la maggior parte degli studi si è concentrato in passato sulle acque dolci, primo comparto ricevente dal suolo. Numerosi studi hanno messo in luce una significativa correlazione negativa tra la concentrazione di Imidacloprid nella matrice e il declino numerico o in termini di biomassa di una determinata specie. A titolo esemplificativo, Van Dijk et al, 2013 effettuarono analisi approfondite sugli effetti del principio in ambienti di acqua dolce e riscontrarono un importante calo dell'abbondanza in quasi tutti i macro-invertebrati presi in considerazione, seppur appartenenti a ordini differenti, quali Amphipoda, Basommatophora, Diptera, Ephemeroptera, Tricotera, Odonata e Isopoda. Nel medesimo studio si mise in luce come le specie appartenenti all'ordine Actinedida, invece, mostravano una significativa correlazione positiva coi i trattamenti in questione, in accordo anche con altri studi (Szczepaniec et al, 2011). Inoltre, è necessario sottolineare come effetti avversi non si manifestino solo nei macro-invertebrati, ma come vi siano evidenze di effetti tossici anche su fito e zooplancton in condizioni sperimentali in microcosmo (Sumon et al, 2018).

L'Acetamiprid ($\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClN}_4$) è un insetticida-afidicida sistemico, particolarmente indicato per la difesa di alberi da frutto, colture orticole e piante ornamentali. È noto con diversi nomi commerciali quali Epik[®], Kestrel[®] e Assail[®]. Adatto sia a fitofagi succhiatori sia masticatori, agisce prevalentemente per ingestione e data l'elevata sistemica è in grado di fornire protezione anche ai tessuti sviluppatasi dopo il trattamento. L'assorbimento è per lo più per via fogliare. Seppur non persistente sul suolo, è solubile in acqua (2950 mg L^{-1} a 20°C) e resistente a biodegradazione, fotolisi e idrolisi. La degradazione avviene agevolmente a condizioni di pH e temperatura elevati,

² www.sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en

per cui si passa da un'emivita di 420 giorni a pH9 e 25°C a una di 13 giorni a 45°C³. Si è proposto di classificare l'Acetamiprid come sostanza cancerogena di categoria 2 (sostanze che dovrebbero considerarsi cancerogene per l'uomo: esistono elementi sufficienti per ritenere che l'esposizione dell'uomo provochi l'insorgenza di tumori) in accordo con il Regolamento Europeo 1272/2008, ma non tossica per la riproduzione e probabilmente non in grado di agire come endocrine disruptor (EFSA Scientific Committee, 2013).

Il Clothianidin (C₆H₈ClN₅O₂S) è un insetticida sintetizzato dalla Takeda Chemical Industries e dalla Bayer. È stato sviluppato come alternativa a organofosforici, carbammati e piretroidi, comportando rischi minori per l'uomo e contrastando l'insorgenza di forme di resistenza. Come i principi fino ad ora trattati però, mostra ancora spiccata sensibilità nei confronti di specie non-target, prime tra tutte le api. In questi casi i rischi derivano dai trattamenti effettuati anche direttamente sul seme, dalla generazione di polveri durante le lavorazioni in campo e dalla persistenza di residui nel nettare e nel polline. Il Clothianidin, una volta applicato ai semi o sul suolo, forma una pellicola uniforme che funge da prima barriera all'attacco di insetti quali afidi, cicaline, nottue ed elateridi. All'emersione della radichetta, il principio attivo è rapidamente assorbito e veicolato alle parti in accrescimento e all'intero organismo, fornendo una protezione diffusa. Questa doppia barriera al suolo e a livello di tessuti protegge la pianta da attacchi alle radici e alle porzioni aeree, quali fusto e foglie⁴. Il Clothianidin agisce sia per contatto sia per ingestione. A differenza degli altri neonicotinoidi, alcuni studi rimarcano l'insorgenza di effetti subletali all'esposizione a Clothianidin: in particolare, anche se non si registra un significativo aumento della mortalità nei gasteropodi d'acqua dolce o nei girini degli anfibii anche alla massima concentrazione che la solubilità della sostanza (327 mg L⁻¹ a 20 °C) permette, sono state osservate modificazioni comportamentali importanti. Ad esempio, *Belostoma flumineum*, un insetto acquatico predatore comune in stagni e zone umide nordamericane, mostra riduzione dose-dipendente del tasso di alimentazione a seguito di esposizione a Clothianidin, ed analogamente *Orconectes propinquus*, un gambero nativo del nord-est degli Stati Uniti, mostra riduzione della reattività agli stimoli al crescere della concentrazione di contaminante (Miles et al, 2018). Questo e ulteriori esperimenti in mesocosmo effettuati dai medesimi autori suggeriscono possibili ripercussioni a livelli di organizzazione biologica superiore, attraverso la rete trofica: la riduzione

³ <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports>

⁴ <https://fitogest.imaginenetwork.com/it/sostanze-attive/clothianidin/724>

della predazione o l'aumento della mortalità dei predatori invertebrati conseguenti alla scarsa reattività si traducono in una sopravvivenza maggiore delle prede (fino al 50% in più alle massime concentrazioni di Clothianidin), facendo venir meno il tipico controllo top-down sulla comunità esercitato dai predatori (Miles et al, 2018).

Il Thiacloprid ($C_{10}H_9ClN_4S$) è un insetticida largamente diffuso per il trattamento delle piante da frutto e delle orticole. Trova impiego anche nella protezione di piante floreali ed ornamentali e nella concia delle sementi, in particolare il mais. Seppur adatto alla lotta di molti insetti, quali afidi, aleurodidi ed elateridi, mostra una spiccata tossicità nei confronti dei lepidotteri e, come i principi già precedentemente illustrati, degli imenotteri. Il meccanismo d'azione è identico a quello di tutti gli altri neonicotinoidi, e prevede il legame con i recettori nAChR, ed agisce sia per ingestione sia per contatto. Per le api, è noto un secondo meccanismo di azione oltre a quello neurotossico, comune solo a Thiacloprid ed Imidacloprid, che vedrebbe i due principi come responsabili di disbiosi (alterazione della flora batterica intestinale), seppur in maniera temporanea per il Thiacloprid (Alberoni et al, 2021). Tale alterazione conduce a una significativa riduzione nella diversità del microbiota, con conseguenze sull'efficienza nello svolgimento delle attività dello sciame. La struttura chimica tipica di questa classe di pesticidi gli conferisce la capacità di muoversi agevolmente per via translaminare nelle foglie e mostra sistemica acropeta. Su alcune specie, come ad esempio *Cydia pomonella*, risulta attivo già a bassi dosaggi con effetti che insorgono a meno di un'ora dall'esposizione e presenta azione larvicida ed ovicida, volta ad evitare danni ai frutti⁵. Seppur non persistente ($DT_{50}<1g$), l'Unione Europa ne sollecita la sostituzione con altri principi a causa dell'azione come endocrine disruptor⁶.

Il Thiamethoxam ($C_8H_{10}ClN_5O_3S$) è un neonicotinoide tra i più solubili (4100 mg L^{-1} in acqua a 20°C) e grazie a questo si muove rapidamente all'interno dei tessuti vegetali e ha elevata azione sistemica: può essere assorbito dalla lamina fogliare o, se depositato al suolo, essere assorbito dalle radici. La sua persistenza nei tessuti è elevata e si dimostra quindi idoneo anche al trattamento dei semi. La persistenza nel suolo è invece moderata ($DT_{50}=50gg$) ed è resistente a idrolisi e biodegradazione. La fotolisi invece è piuttosto accentuata, con tempi di dimezzamento

⁵ <https://info.agrimag.it/principi-attivi/5378/thiacloprid#tab-caratteristiche>

⁶ <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/630.htm>

inferiori ai 3gg a pH neutri⁷. Tuttavia queste proprietà causano la presenza di residui di pesticida nei frutti, come noto anche per l'Imidacloprid (Xu et al, 2021).

Il Nitenpyram ($C_{11}H_{15}ClN_4O_2$) è un neonicotinoide cloronicotinico, impiegato in agricoltura ma soprattutto in veterinaria per la sua capacità di controllo di ectoparassiti. Si lega in modo irreversibile al sistema nervoso degli invertebrati causando la morte entro poche ore. Solitamente somministrato per via orale sia nei test sia in animali domestici, alcuni studi condotti utilizzando Nitenpyram marcato con C^{14} hanno sottolineato come l'escrezione del principio attivo attraverso l'urina avvenga entro due giorni dall'assunzione con un'efficienza del 95-98% e senza che si osservi accumulo negli organi interni (Jeschke & Nauen, 2005). Questo potrebbe comportare la dispersione in ambiente. È noto con vari nomi commerciali quali BestGuard® e CapStar® ed è attualmente prodotto dalla Sumitomo Chemical Company. Sebbene diffuso, il mercato del Nitenpyram risulta essere minore rispetto a quello di altri insetticidi o neonicotinoidi e forse proprio per questo motivo gli studi su questo principio attivo sono ancora limitati. Tuttavia, l'elevata solubilità in acqua ($590g L^{-1}$ a $20^{\circ}C$)² e la resistenza all'idrolisi a pH basici e neutri hanno posto importanti dubbi su possibili effetti tossici sulle specie non target, mentre per gli organismi superiori si ipotizzano effetti contenuti legati alla velocità di eliminazione (Akayama & Minamida, 1999).

Il Dinotefuran ($C_7H_{14}N_4O_3$) è un neonicotinoide di terza generazione, commercializzato dalla Mitsui Chemicals Agro a partire dal 2002, che ha trovato un crescente utilizzo in più di venti nazioni. Dal punto di vista molecolare, differisce in modo sostanziale dagli altri neonicotinoidi in quanto è l'unico a presentare un etere ciclico noto come tetraidrofurano al posto dell'anello aromatico clorinato (Wakita, 2011). Il Dinotefuran ha una buona solubilità in acqua ($39,83g L^{-1}$ a $20^{\circ}C$)², che ne favorisce il trasporto dall'area di applicazione al comparto acquatico. La persistenza del Dinotefuran in ambiente è elevata. È stabile all'idrolisi, mentre la fotolisi è limitata alla superficie del suolo, dove l'emivita si attesta tra i 50 e i 100 giorni (Morrissey et al, 2015). Il Dinotefuran agisce per contatto e ingestione, causando la cessazione dei processi di feeding e infine la morte dell'individuo. Analogamente agli altri neonicotinoidi, questo principio agisce sui recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChR), tuttavia si ipotizza un legame diverso rispetto a quello degli altri insetticidi di questa classe, ipotesi avvalorata anche dal fatto che il suo utilizzo permette di

⁷ <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/631.htm>

superare problematiche legate alla resistenza a Imidacloprid ⁸. Il Dinotefuran è impiegato in particolare per il controllo di coleotteri, aleurodidi e afidi (Hem et al, 2012, Rahman et al, 2015). Sono noti effetti tossici su api e bombi.

Le problematiche evidenziate dal punto di vista tossicologico, il largo uso che ne viene fatto in Europa e le proprietà chimico-fisiche che ne facilitano l'accumulo nel comparto acquatico hanno quindi sollevato dubbi sul rischio associato all'uso nei neonicotinoidi e gli impatti sull'ambiente acquatico. Le evidenze emerse hanno spinto nel 2015 l'Unione Europea a inserire i neonicotinoidi di maggiore utilizzo (Imidacloprid, Thiamethoxam, Clothianidin, Acetamiprid e Thiacloprid) in Watch List, cioè nella lista di sostanze da monitorare sul territorio europeo al fine di implementare i dati a disposizione per valutarne l'ecotossicità e quindi eventuali provvedimenti o restrizioni. Negli ultimi anni, la determinazione delle concentrazioni ambientali dei neonicotinoidi è andata crescendo. Ciononostante i dati non sono uniformi né per i vari principi né per i diversi stati. Dalle informazioni fino ad ora raccolte si evince come i neonicotinoidi siano solitamente determinati nelle acque superficiali e sotterranee. La Direttiva 2006/118 CEE fissa il limite per i pesticidi nelle acque sotterranee a 100 ng L⁻¹ per singolo principio e 500 ng L⁻¹ se considerati come somma. Tuttavia la legislazione europea successiva (Direttiva 2008/105 CEE) prende in considerazione solo pochi pesticidi per quanto riguarda la qualità delle acque superficiali e ulteriori restrizioni vengono demandate agli stati membri: l'Italia a questo proposito, data la complessità del panorama dei pesticidi in uso e dei rispettivi metaboliti, ha regolamentato la presenza di altri pesticidi non previsti dalla direttiva fissando un limite di 100 ng L⁻¹ (1000 ng L⁻¹ se considerati come somma dei pesticidi presenti).

I monitoraggi volti alla determinazione delle concentrazioni ambientali dei neonicotinoidi di maggior impiego hanno evidenziato situazioni molto diversificate sul territorio europeo. Innanzitutto è necessario sottolineare come la presenza dei diversi principi nelle acque rispecchi le percentuali di impiego dei diversi prodotti, facendo sì per esempio che l'Imidacloprid, largamente utilizzato e primo ad essere sintetizzato e commercializzato, raramente si attesti sotto al limite di rilevabilità strumentale. Imidacloprid, Thiamethoxam e Clothianidin sono i principi riscontrati alle concentrazioni maggiori, soprattutto in acque superficiali, ma la loro presenza è strettamente legata anche alla frequenza di utilizzo, rendendo la degradazione o lo spostamento verso la falda

⁸ <https://us.mitsuichemicals.com/service/product/dinotefuran.htm>

più o meno veloce. Per l'Imidacloprid le concentrazioni più elevate si sono registrate in Portogallo con 480 ng L⁻¹ (Sousa et al, 2019), in Italia con 480 ng L⁻¹ (ARPAV, 2017) e in Spagna con 285 ng L⁻¹ (Rubirola et al, 2017), tutti in acque superficiali. In tutti e tre i casi i valori non sono generalizzabili a tutti i corpi idrici, ma il range varia da valori di non rilevabilità a quelli riportati. Valori minori si registrano per il Clothianidin ad esempio per il Portogallo 159 ng L⁻¹ in acque superficiali (Sousa et al, 2019), ma spesso mancano studi negli altri stati per confrontare in maniera esaustiva la situazione europea.

1.2 I butenolidi: Flupyradifurone

Il Flupyradifurone (C₁₂H₁₁ClF₂N₂O₂) è attualmente l'unico rappresentante della famiglia dei Butenolidi. Sintetizzato per la prima volta nel 2012 dalla Bayer CropScience e commercializzato col nome Sivanto[®], questo composto è modellizzato sulla molecola di stemofolina, un alcaloide naturale con forti proprietà insetticide, prodotto dalle foglie e dagli steli delle piante di *Stemona japonica*⁹. Nonostante il meccanismo d'azione sia analogo a quello precedentemente illustrato per i neonicotinoidi, si ritiene che il Flupyradifurone possa essere maggiormente specifico, legandosi in modo selettivo ai recettori nicotinici per l'acetilcolina degli insetti (nAChR) grazie a una struttura molecolare differente dalle altre classi di insetticidi (Fig.1).

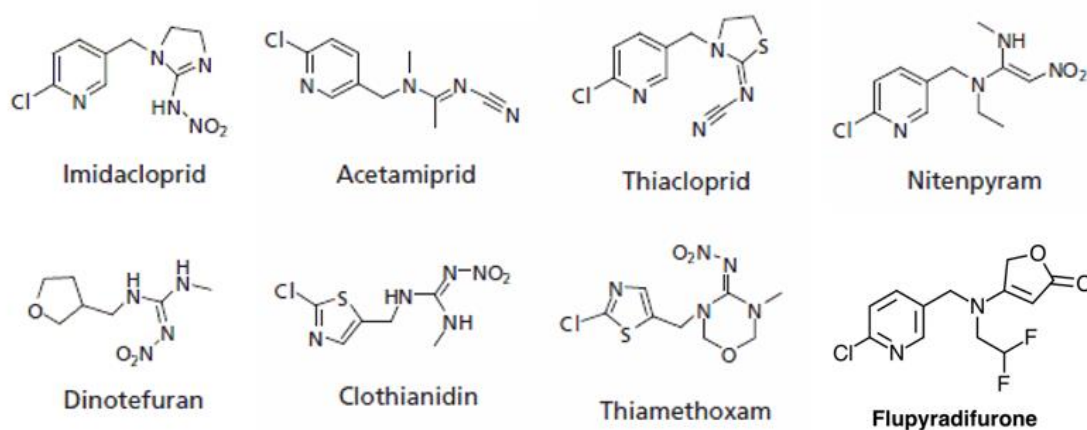


Figura 1: Struttura molecolare dei neonicotinoidi e butenolidi

⁹ https://www.cropscience.bayer.it/-/media/prodotti/sivanto-prime/brochure_sivantoprime_multicrop_2019.pdf

Il legame col recettore post-sinaptico si dimostra reversibile in alcune specie (Nauen et al, 2014). Si ipotizzano quindi ridotti effetti su specie non target, per i quali tuttavia mancano studi approfonditi. Test di laboratorio condotti dalla Bayer sull'afide verde (*Myzus persicae*) mostrano una velocità di azione 3 volte maggiore rispetto ad altri composti, con cessazione dei comportamenti di feeding già dopo 10 minuti. Altri studi indicano invece tempi di risposta più lunghi, non superiori comunque alle 2h, e la morte di tutti gli individui entro 2 giorni. Si sottolinea inoltre come gli effetti tossici non si manifestino solo negli individui venuti a diretto contatto col trattamento, ad esempio con lo spray, ma anche negli afidi presenti sul lato abassiale della foglia, prova del trasporto translaminare. L'unicità del composto è alla base anche della sua efficacia contro infestanti resistenti, in quanto non viene metabolizzato dal CYP6CM1, un citocromo P450 mutato che conferisce resistenza a neonicotinoidi e pimetozine (Nauen et al, 2014).

Il Flupyradifurone è indicato per il controllo di emitteri con apparato boccale pungitore o succhiatore, quali afidi, aleurodidi e cicaline, dannosi per le colture e può essere applicato tramite trattamento fogliare, successivamente traslocato nella pianta per via translaminare (Raupach et al, 2012), trattamento su suolo o semi (Nauen et al, 2014). Analogamente ai neonicotinoidi presenta azione sistemica e sistemica acropeta e si muove dalle radici agli apici per via xilematica (Velten et al, 2013). Tale traslocazione è molto rapida e a 24h dall'applicazione il principio attivo si ritrova già uniformemente distribuito in tutto l'individuo. La concentrazione nei tessuti vegetali raggiunge il massimo tra il settimo e il quattordicesimo giorno dopo l'applicazione e l'accumulo è più pronunciato lungo i margini fogliari: dal ventiquattresimo giorno si assiste a una marcata diminuzione della concentrazione (Nauen et al, 2014). La solubilità in acqua si attesta a 3,2g L⁻¹ a 20°C. Nonostante venga presentato come un composto a ridotta tossicità per gli impollinatori sia in fase adulta sia in fase giovanile, i dati pubblicati dall'azienda produttrice indicano per le api (*Apis mellifera*) una LD₅₀ a 48h di 1,2 µg ind⁻¹ e una LC₅₀ di 123 µg ind⁻¹, rispettivamente per assunzione orale e per contatto (Roffeni et al, 2014). Ciò si dimostra in accordo anche con quanto riportato in altri studi. Nauen et al, 2014 evidenziano inoltre come una LC₅₀ >100 µg ind⁻¹ si riscontri per contatto anche nei bombi, mentre non si osservano effetti a lungo termine. L'attenzione rivolta a questo principio attivo deriva dal fatto che, nonostante la possibilità di degradazione per fotolisi, la sua persistenza nel suolo è elevata, con un'emivita che varia da 2 a più di 1500 giorni (University of Herfordshire, 2007). Attualmente in Europa non vi sono linee guida per la regolamentazione del Flupyradifurone nelle acque, al contrario è ritenuto un'insetticida alternativo per superare le restrizioni su altri prodotti (Maloney et al, 2020).

1.3 La specie test

I copepodi rappresentano una sottoclasse di crostacei particolarmente diffusa sia in ambiente marino sia in ambiente dulciacquicolo, caratterizzata da elevata ricchezza in specie e abbondanza. Si stima che circa il 25% di tutte le specie di crostacei appartenga ai copepodi e che la loro numerosità superi quella di tutti gli altri metazoi (Boxshall & Halsey, 2004). I copepodi costituiscono quindi la componente maggioritaria dello zooplancton e fungono da collegamento nella rete trofica tra i produttori primari e i livelli superiori (McKinnon et al, 2003; Castonguay et al, 2008). Questo ruolo fondamentale non è esclusivamente ricoperto dagli organismi adulti, ma è associato anche agli stadi naupliari, che con le loro piccole dimensioni e l'alto tenore in acidi grassi sono una componente essenziale della dieta di altri stadi larvali marini come ad esempio gli



Figura 2: *Acartia tonsa*

avannotti (Payne & Rippingale, 2000). Una specie di grande interesse sia in acquacoltura sia a livello ambientale per la sua ampia diffusione è il copepode *Acartia tonsa*.

Il copepode planctonico *Acartia tonsa* (Dana, 1848) (Fig.2)¹⁰ è una specie cosmopolita delle regioni temperate e subtropicali, tipica di ambienti ad alto trofismo e comune in aree costiere ed estuarine. Tipica delle coste atlantiche del continente americano e introdotta in Mediterraneo a metà degli anni '80 (Farabegoli et al, 1989) probabilmente attraverso le acque di zavorra (Camatti et al, 2019), è diventata nel tempo una specie dominante nelle zone lagunari dell'Alto Adriatico, soppiantando anche specie autoctone cogeneriche (Comaschi et al, 2000) ed arrivando ad assumere un ruolo fondamentale come anello di congiunzione tra fitoplancton, di cui si nutre, e i consumatori secondari degli ambienti marini-costieri. A tal proposito, *Acartia tonsa* si dimostra particolarmente abbondante nelle lagune, diminuendo gradualmente verso il largo e nei tratti aperti di costa soppiantata da specie locali quali *Acartia clausii*. Negli ambienti estuarini raggiunge le abbondanze maggiori, soprattutto in estate, sostenendo tutta la rete trofica. Le fluttuazioni della popolazione seguono la quantità di cibo disponibile e la temperatura, mentre il range di salinità vede una maggiore tolleranza (Paffenöfer & Stearn, 1988). Questa specie è ampiamente utilizzata in Europa e negli

¹⁰ <https://line.17qq.com/articles/ijjidpegfz.html>

Stati Uniti per condurre studi di ecotossicità in ambienti marini o salmastri, grazie alla facilità di reperimento e mantenimento degli esemplari, alle piccole dimensioni, alla durata del ciclo vitale e all'elevata produttività, fornendo dati significativi visto il ruolo ecologico ricoperto. Per suddetti motivi, questa specie è stata impiegata anche per i test oggetto di questo studio.

1.4 Biologia della specie test

Acartia tonsa è un crostaceo appartenente all'ordine Calanoida, sottoclasse Copepoda. Come tutti i copepodi, è caratterizzata da un corpo metamero a undici segmenti, facilmente distinguibili in capo, torace e addome, anche detto urosoma. Quest'ultima porzione, unita alla conformazione delle antenne, costituisce un carattere diagnostico per la determinazione del sesso degli esemplari in fase adulta. Il capo presenta un unico occhio primitivo, rostro e antenne piumate, costituite da un numero variabile di segmenti con funzioni natatorie e sensoriali. I segmenti toracici presentano ognuno un paio di appendici, mentre l'ultimo segmento addominale è munito tipicamente di sete. Il dimorfismo sessuale è tipico della fase adulta, in cui possiamo agevolmente distinguere i maschi dalle femmine osservando le antenne e l'urosoma (Fig.3): le prime si presentano più arcuate nei maschi, mentre l'urosoma è formato da cinque segmenti nelle femmine e solo quattro nei maschi.

Anche la forma dei segmenti, in particolare del secondo, è differente. Inoltre gli individui femminili sono generalmente più grandi dei maschi (1-1,5mm e 0,8-0,9mm rispettivamente) (Buttino et al, 2019). Per quanto riguarda l'alimentazione, sia le fasi adulte sia quelle larvali si nutrono di fitoplancton: si tratta di organismi planctofagi opportunisti non legati in modo particolare a una o poche specie di alghe unicellulari per la dieta. Tuttavia, la qualità delle alghe somministrate agli adulti può incidere sulla vitalità delle uova deposte (Ivanova et al, 2004; Zhang et al, 2013). Gli organismi non accumulano riserve energetiche e di conseguenza l'investimento nella produzione di gameti avviene solo in condizioni favorevoli in termini di disponibilità alimentare: al decrescere di quest'ultima si assiste a un rapido calo del tasso produttivo (Kiørboe et al, 1985).

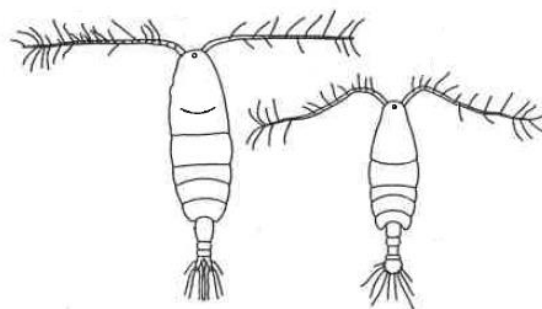


Figura 3: Adulti di *A. tonsa*: a sinistra una femmina, a destra un maschio.

Il ciclo vitale di *A. tonsa* si articola da uovo attraverso 6 successivi stadi naupliari (NI – NVI) e 5 stadi di copepodite (CI – CV) fino ad arrivare all'individuo adulto (Fig.4). La durata è funzione della temperatura: tra i 15 e i 20°C lo sviluppo da nauplio a copepodite richiede mediamente 5-6 giorni, mentre il raggiungimento dello stadio adulto avviene dopo 12-20 giorni dalla schiusa. Ulteriore variabilità può essere introdotta al variare della dieta o della densità della popolazione (Zhang et al, 2015). Durante l'accoppiamento il maschio non feconda direttamente la femmina, ma le passa una spermatofores che permetterà la fecondazione delle uova in un secondo momento, appena prima del rilascio in mare. La schiusa è subitanea, cioè avviene entro le 48h a 25°C, tuttavia sono note forme di quiescenza in relazione alle condizioni ambientali (Zillioux & Gonzalez, 1972). Questo può essere sfruttato per esigenze di laboratorio per la conservazione delle uova e il successivo utilizzo nei test: il ritardo nella schiusa viene indotto dallo stoccaggio a 4°C. Dalla schiusa dell'uovo, di forma sferica e di diametro di circa 70 µm, si ha il primo stadio naupliare. Tutti i naupli sono molto diversi dall'adulto, in quanto manca completamente la segmentazione e hanno forma tipicamente triangolare. Con l'avanzare dello sviluppo, si differenziano le diverse parti dell'apparato boccale e le appendici natatorie, fino alla metamorfosi che porterà all'inizio degli stadi di copepodite, qui l'organismo assume una forma allungata che ricorda maggiormente l'adulto, con segmenti distinti, appendici e antenne. Il sesto stadio di copepodite rappresenta l'adulto. Ad occhio nudo, naupli e copepoditi possono essere distinti grazie al diverso movimento assunto durante il nuoto. I naupli si muovono tramite piccoli spostamenti circolari, mentre i copepoditi sono caratterizzati da un nuoto rapido realizzato sia tramite le appendici toraciche sia attraverso le antenne e osservabile in traiettorie rettilinee. I sistemi circolatorio e respiratorio sono molto semplici, il primo è costituito da un emocele e si realizza tramite contrazioni muscolari ed intestinali, mentre il secondo non prevede branchie, ma seni e scambio gassoso attraverso il tegumento. Di contro il sistema nervoso è piuttosto sviluppato e comprende un cervello trilobato posto anteriormente all'esofago da cui si diparte la corda neurale che corre ventralmente lungo tutto il corpo.

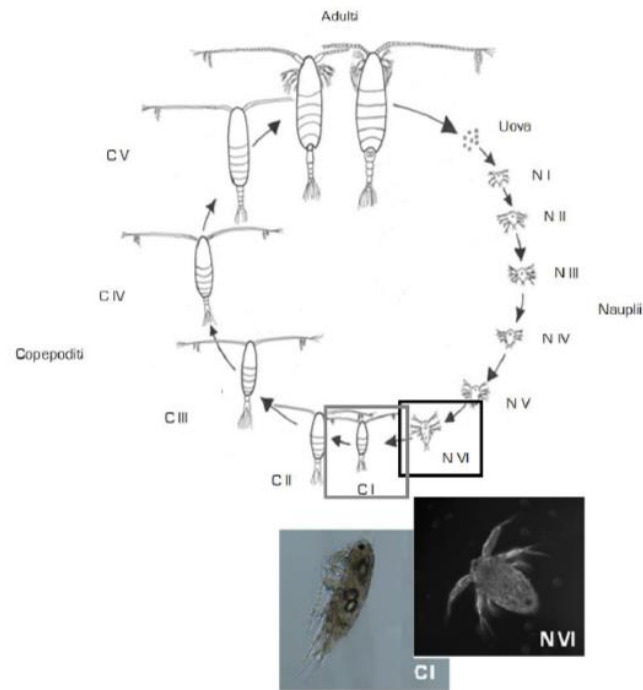


Figura 4: Ciclo vitale di *A. tonsa* (Buttino et al, 2019).

1.5 *A. tonsa* come specie indicatrice

Acartia tonsa può essere impiegata per l'esecuzione di saggi ecotossicologici su acque o sedimento. In questi saggi si fa riferimento allo sviluppo larvale della specie e in particolare al calcolo dell'inibizione o del ritardo di sviluppo dalla fase naupliare a quella di copepodite causata dalla presenza di contaminanti nella matrice. L'interpretazione di tale endpoint viene associato a quello di hatching delle uova e di sopravvivenza degli esemplari. Il protocollo utilizzato in questo studio e di seguito descritto fa riferimento alla ISO 16778 (2015): Water quality – Calanoid copepod early life stage test with *Acartia tonsa*. L'early life stage test prevede l'esposizione a concentrazioni crescenti di una determinata sostanza chimica di un numero noto di individui appartenenti alla specie test, a partire dall'uovo fino allo stadio di sviluppo giovanile. La sopravvivenza e lo sviluppo raggiunto dopo un certo tempo dagli individui esposti consentono di ricavare la percentuale di schiusa delle uova e il larval development ratio (LDR). La durata del test è compresa tra 5 e 6 giorni, lasso di tempo corrispondente dal passaggio in condizioni ottimali dallo stadio di nauplio al primo stadio di copepodite del 60% degli esemplari del controllo. Tale rapporto rappresenta i copepoditi osservati alla fine del test sul totale degli individui sopravvissuti, cioè sulla somma di copepoditi e naupli presenti.

2. Materiali e metodi

2.1 Coltura ed allevamento

Le uova utilizzate per lo svolgimento del test provenivano da una coltura mantenuta in laboratorio, ottenuta per successive generazioni da organismi adulti allevati presso la Guernsey Sea Farms di Vale (Guernsey, UK). Il rinnovo delle colture si rende necessario ogni circa 3-4 settimane, dal momento che le uova vengono rimosse per sifonatura giornaliera dal fondo mentre l'età media degli individui cresce nel tempo: l'avvio quindi di una nuova coltura permette di disporre in maniera continuativa degli organismi test. Gli esemplari sono mantenuti in bottiglie di vetro da 2L, opportunamente areate, in camera climatica a 20°C con fotoperiodo 16L:8D (ISO 16778, 2015). Il medium utilizzato per la coltura e i successivi test (medium al 20‰) fa riferimento a quanto previsto dalla ISO sopra citata ed è ottenuto dalla miscelazione di soluzione ipersalina al 10% e medium M7 di Elenndt in rapporto 1:4. Per ogni ulteriore dettaglio, si rimanda alle Tabelle 1, 2A e 2B.

Tab.1: Formulazione della soluzione ipersalina al 10% come previsto dalla ISO 16778 (2015).

Sali	g L ⁻¹
NaCl	70.100
Na ₂ SO ₄	11.700
KCl	2.030
KBr	0.293
Na ₂ B ₄ O ₇ , 10H ₂ O	0.113
MgCl ₂ , 6H ₂ O	31.700
CaCl ₂ , 6H ₂ O	6.600
SrCl ₂ , 6H ₂ O	0.066

*Una volta disciolti tutti i sali in un volume di 1L di acqua ultra pura, aggiungere 1 mL da una soluzione di NaHCO₃ ottenuta da 2.83 g L⁻¹.

Tab.2: Formulazione del medium M7 di Elenndt secondo la ISO 16778 (2015).

A. Preparazione della trace stock solution per medium M7

Composti di elementi in traccia	g L ⁻¹	ml L ⁻¹
H ₃ BO ₃	14.2975	1.00
MnCl ₂ , 4H ₂ O	1.8025	1.00
LiCl	1.53	1.00
RbCl	0.355	1.00
SrCl ₂ , 6H ₂ O	0.76	1.00
NaBr	0.08	1.00
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.315	1.00
CuCl, 2H ₂ O	0.08375	1.00
ZnCl ₂	0.26	1.00
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.2	1.00
KI	0.065	1.00
Na ₂ SeO ₃	0.0438	1.00
NH ₄ VO ₃	0.0115	1.00
Soluzione Fe-EDTA		
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	0.625	20.00
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0.25	

B. Medium M7 finale

1 - Trace stock solution		50 ml L ⁻¹ di M7
Macronutrienti	g L⁻¹	per ml L⁻¹ di M7
2 - CaCl ₂ , 2H ₂ O	29.38	10.00
3 - MgSO ₄ , 7H ₂ O	24.66	5.00
4 - KCl	5.8	1.00
5 - NaHCO ₃	64.8	1.00
6 - NaSiO ₃ , 9H ₂ O	10	1.00
7 - NaNO ₃	2.74	0.10
8 - KH ₂ PO ₄	1.43	0.10
9 - K ₂ HPO ₄	1.84	0.10
10 - vitamine combinate		
Tiamina cloridrata	0.75	0.10
Cianocobalamina	0.01	
Biotina	0.0075	

L'allevamento e il mantenimento di *A. tonsa* in laboratorio prevede necessariamente anche l'allestimento di colture di alghe fitoplanctoniche da utilizzare come alimento. Per le colture algali, il medium (F/2 di Guillard) (Guillard & Ryther, 1962; Guillard, 1975) differisce da quello impiegato per il mantenimento dei copepodi, rispondendo alle esigenze nutrizionali specifiche (Tab.3).

Tab.3: Formulazione del medium F/2 di Guillard.

Composti	Stock solution (g L ⁻¹)	Quantità	Concentrazione molare nel medium finale	
NaNO ₃	75	1.00 mL	8.82 x 10 ⁻⁴ M	
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5	1.00 mL	3.62 x 10 ⁻⁵ M	
Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	30	1.00 mL	1.06 x 10 ⁻⁴ M	
Soluzione di metalli in traccia		1.00 mL		
Composizione	FeCl ₃ 6H ₂ O	-	3.15 g	1.17 x 10 ⁻⁵ M
	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	-	4.36 g	1.17 x 10 ⁻⁵ M
	CuSO ₄ 5H ₂ O	9.8	1.00 mL	3.93 x 10 ⁻⁸ M
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	6.3	1.00 mL	2.60 x 10 ⁻⁸ M
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	22.0	1.00 mL	7.65 x 10 ⁻⁸ M
	CoCl ₂ 6H ₂ O	10.0	1.00 mL	4.20 x 10 ⁻⁸ M
	MnCl ₂ 4H ₂ O	180.0	1.00 mL	9.10 x 10 ⁻⁷ M
Soluzione di vitamin			0.50 mL	
	Tiamina cloridrata (vit.B1)	-	200 mg	2.96 x 10 ⁻⁷ M
	Cianocobalamina (vit.B12)	1.0	1.00 mL	3.69 x 10 ⁻¹⁰ M
	Biotina (vit.H o B7)	1.0	1.00 mL	2.05 x 10 ⁻⁹ M

Per la coltura di *A. tonsa* oggetto dei test, l'alimentazione è costituita da un mix algale in rapporto 1:1 delle specie *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae) e *Tisochrysis lutea* (Haptophyceae), erogato tramite pompa peristaltica 4 volte al giorno. Le colture algali sono ottenute da stock cultures fornite dalla Guernsey Sea Farms di Vale (Guernsey, UK) e sono mantenute nella medesima camera delle colture di copepodi. Per la loro coltivazione si impiegano beute di capacità 1L, rinnovate ogni 14 giorni con rimozione di circa ¾ del volume e successiva aggiunta di nuovo medium. Il volume prelevato può essere impiegato direttamente come alimento per le colture o

previa centrifugazione (1000-3000 rpm per 10 minuti) come alimento durante i test, laddove previsto dai protocolli. L'aerazione della coltura favorisce non solo lo scambio gassoso con l'atmosfera, ma una uniforme distribuzione del fitoplancton prevenendo l'eccessiva sedimentazione delle cellule algali.

La sifonatura permette la rimozione dal fondo del detrito, delle alghe depositatesi e delle uova deposte dalla precedente operazione di pulizia. La procedura prevede l'utilizzo di una pipetta di vetro di capacità 10 – 20ml, collegata a un tubo flessibile in gomma: la suzione iniziale, effettuata attraverso una siringa, permette il deflusso di acqua dalla coltura verso una beuta di raccolta. Il volume prelevato ad ogni singola sifonatura corrisponde a circa 250ml, volume che verrà successivamente rimpiazzato tramite l'aggiunta di nuovo medium. Il materiale sifonato e confluito nella beuta di raccolta viene filtrato attraverso due setacci a maglia di 170 e 50 μm , al fine di separare rispettivamente la componente algale ed eventuali individui accidentalmente aspirati dalle uova. Il primo filtro, con alghe e copepodi, viene sciacquato con l'aiuto di spruzzette contenenti medium nuovamente nella coltura, mentre il secondo filtro, che avendo una maglia più fina ha trattenuto le uova, viene risciacquato in una nuova beuta al fine di consentire l'utilizzo immediato delle uova o lo stoccaggio a 4°C per test successivi. Tale operazione può essere ripetuta più volte nello stesso giorno, anche in riferimento alle esigenze di allestimento dei test.

2.2 Preparazione delle soluzioni e allestimento del test

Per la preparazione delle soluzioni di pesticidi da sottoporre al test si sono scelti due neonicotinoidi e un butenolide. I neonicotinoidi analizzati (Dinotefuran e Nitenpyram) non sono tra i principi maggiormente studiati, motivo per il quale il range di diluizioni scelto si dimostra molto ampio, andando da concentrazioni potenzialmente compatibili con quelle ambientali a concentrazioni elevate assimilabili a una contaminazione puntuale. Il range indagato è sufficientemente ampio da ricomprendere i dati di tossicità acuta rilevati per altre specie, in particolare alcune d'acqua dolce sensibili al Dinotefuran, appartenenti ai generi *Neocleon*, *Chironomus* e *Hyalella* (Raby et al, 2018). Ciò ha permesso di capire, in assenza di pregresse indicazioni, la collocazione di parametri quali NOEC (No Observed Effect Concentration) ed EC₅₀ (Effective Concentration in 50% del campione) nella specie. Tali parametri identificano la più alta concentrazione a cui non si registrano effetti avversi e la concentrazione che determina l'effetto

indagato nel 50% del campione esposto. Come suggerito dalla ISO 16778 (2015), sono state allestite per ogni pesticida cinque concentrazioni (0,01, 0,1, 1, 10, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) in 6 repliche ciascuno. Ad ogni test è stato associato un controllo negativo allestito in modo analogo, senza aggiunta di pesticidi al fine di verificare l'andamento del test e un controllo positivo effettuato utilizzando Diclorofenolo per saggiare la sensibilità della coltura utilizzata. Le concentrazioni (25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$) sono state scelte attenendosi alla ISO sopra citata e a test pregressi (Picone et al, 2018). L'allestimento degli early life stage test oggetto dello studio è stato fatto impiegando le uova sifonate dalla coltura di laboratorio di *A. tonsa*, precedentemente stoccate in frigorifero a 4°C. Per ogni pesticida testato, si sono allestite in becher di capacità 100 ml cinque concentrazioni per 6 repliche. Ogni becher, opportunamente etichettato per identificare in modo univoco la replica, è stato innanzitutto riempito con 25 ml della soluzione di pesticida. Parallelamente, si è provveduto ad allestire un controllo negativo, sempre in 6 repliche, in becher con 25 ml di medium. È stato innanzitutto necessario stimare il volume dello stock di uova necessario per garantire il numero di uova desiderato (50-80) in ogni replica. A questo scopo, prima dell'inizio di ciascun test, si è proceduto alla conta delle uova presenti in un volume noto di sospensione di uova e a tarare le pescate in base alla numerosità riscontrata. Determinato tale volume, aliquote successive sono state prelevate tramite micropipetta dalla beuta e depositate su filtri con griglia a porosità 0,45 μm : la rimozione dell'acqua dal filtro è stata ottenuta attraverso l'applicazione del vuoto con una pompa. I filtri così ottenuti sono stati osservati allo stereomicroscopio, determinando il numero esatto di uova su ogni supporto al fine di registrarne la numerosità di partenza prima dell'inserimento nei contenitori del test. Eventuali naupli presenti sui filtri sono stati eliminati per evitare interferenze con la prova. Le uova sono state quindi trasferite nei becher, risciacquando i filtri nei contenitori, utilizzando la soluzione ivi presente e partendo dal controllo per procedere a concentrazioni crescenti per evitare contaminazioni. In ultimo, a tutte le repliche sono stati somministrati 100 μl di mix algale. I becher sono stati mantenuti a 20°C in termostato per tutta la durata della prova, avendo cura di chiuderli singolarmente con parafilm per evitare l'evaporazione della soluzione o altri fenomeni che potessero inficiare i risultati. La ISO 16778 (2015) prevede il rinnovo parziale della soluzione e l'aggiunta di cibo tra il secondo e il terzo giorno dopo l'allestimento. A tal proposito, a 48h dall'inizio dei test, a ogni becher è stata aggiunto un volume pari a 25 ml della corrispondente soluzione di pesticida in base alla concentrazione testata o un pari volume di nuovo medium per il controllo e 100 μl di mix algale. La fine del test è stata posta al quinto giorno, giorno in cui, come

precedentemente accennato, ci si aspetta che in condizioni ottimali metà (50-60%) del campione abbia raggiunto ormai lo stadio di copepodite. Tale valutazione è stata effettuata stimando la percentuale di copepoditi presenti nel controllo. Nel caso in cui non fosse stato raggiunto il corretto rapporto tra stadi di sviluppo, si sono mantenute le repliche in termostato per altre due ore, come suggerito dalla ISO di riferimento, al fine di consentire un ulteriore sviluppo degli individui e ovviare ad eventuali oscillazioni delle condizioni di incubazione accidentalmente intervenute. Decorso il tempo necessario, ogni replica e il controllo sono stati fissati utilizzando una soluzione di Lugol (0,5 ml): l'applicazione di questo colorante causa la morte immediata degli esemplari vivi presenti e la colorazione dei loro tessuti con una tipica tinta rosso scuro. Eventuali esemplari già morti al momento della colorazione non vengono colorati, motivo per cui dalla successiva conta dei naupli e dei copepoditi presenti è possibile dedurre la percentuale di schiusa e la mortalità durante l'esposizione. Per procedere al conteggio degli esemplari, in base allo stadio di sviluppo raggiunto, si è provveduto alla filtrazione delle soluzioni test attraverso filtri con griglia a porosità 0,45 μm , tramite l'applicazione del vuoto, e all'osservazione allo stereomicroscopio. A titolo esemplificativo, si riportano alcune immagini dei filtri osservati (Fig.5). A inizio e a fine test, sono stati registrati per ogni concentrazione testata ossigeno e pH. I parametri rilevati sono consultabili in Appendice (Tab.I, tab.II, tab.III, tab.IV).

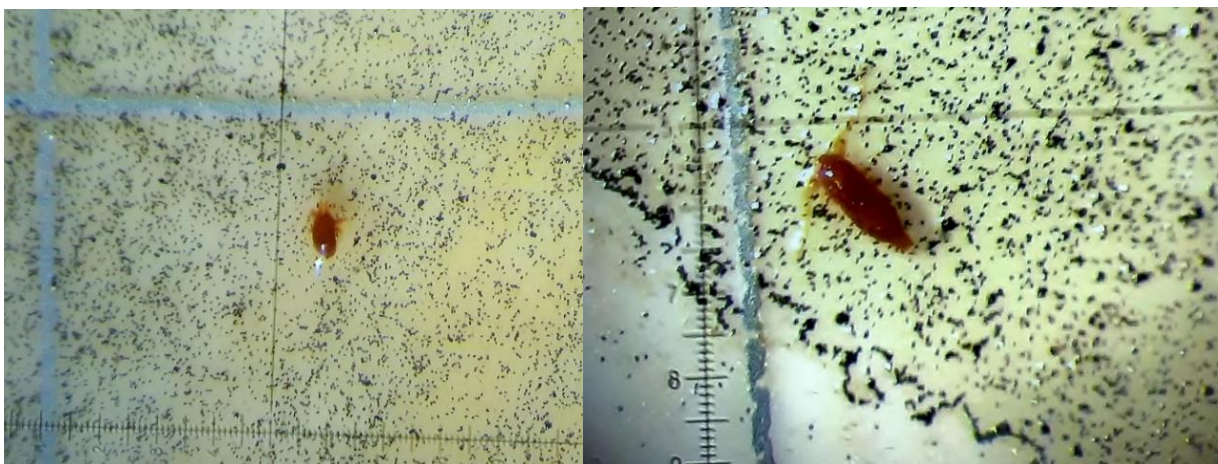


Figura 5: immagini degli esemplari allo stereomicroscopio dopo la fissazione tramite Lugol (a sinistra un nauplio distinguibile per la forma arrotondata e le appendici; a destra un copepodite, di cui si apprezzano la forma allungata e le antenne).

Come precedentemente accennato, dal conteggio di nauplii e copepoditi presenti su ogni singolo filtro è stato possibile calcolare il larval development ratio (LDR), come di seguito riportato:

$$LDR = \frac{n. \text{copepoditi}}{TO}$$

In cui TO rappresenta il totale degli organismi trovati, cioè $TO = n^{\circ} \text{ nauplii} + n^{\circ} \text{ copepoditi}$. Dal conteggio delle uova ancora presenti a fine test è stato possibile invece risalire a successo della schiusa (H) ed early life stage mortality (ELS-mort.), come di seguito riportato:

$$H = \frac{uova_{(t0)} - uova_{(t5)}}{uova_{(t0)}}$$

In cui t0 rappresenta l'inizio test e t5 il test a 5gg.

$$ELS - mort. = \frac{uova_{(t0)} - (uova_{(t5)} + TO)}{uova_{(t0)} - uova_{(t5)}}$$

2.3 Analisi statistica

I dati ottenuti dall'early life stage test sono stati sottoposti ad analisi statistica per verificare eventuali differenze significative tra quanto osservato in termini di schiusa (Hatching=H), larval development ratio (LDR) ed early life stage mortality (ELS-mort.).

Nel caso del parametro LDR, sono stati calcolati parametri tossicologici quali le concentrazioni di non effetto (No-Observed Effect Concentration, NOEC), le più basse concentrazioni di effetto (Lowest-Observed Effect Concentration, LOEC), la concentrazione che genera il 20% di effetto nelle larve esposte (Effective Concentration 20, EC₂₀) e la concentrazione che genera il 50% di effetto nelle larve esposte (Effective Concentration 50, EC₅₀).

Al fine di individuare il test statistico più idoneo per l'elaborazione dei dati e del calcolo di NOEC e LOEC, si è provveduto innanzitutto alla verifica della normalità dei dati (test di Kolmogorov-Smirnov). In caso di distribuzione normale, si è applicato il test ANOVA ad una via seguito dal test *post hoc* di Tukey se si verificava anche omogeneità delle varianze (test di Levene) o l'ANOVA di Welch seguita dal test di Games-Howell in caso contrario. Qualora la distribuzione non fosse risultata normale, l'analisi statistica è stata svolta tramite il test non parametrico di Kruskal-Wallis, seguito da Pairwise Comparison Test. L'analisi statistica è stata svolta attraverso l'uso di due software: PAST4.2 e IBM SPSS v.7.0.

I dati di EC50 sono stati calcolati utilizzando un programma statistico per l'elaborazione delle risposte continue sviluppato presso la Danmarks Tekniske Universitet di Lyngby, Danimarca, assumendo una distribuzione log-normale degli effetti osservati alle concentrazioni testate (Christensen et al, 2009).

2.4 Quality Assurance/Quality control (QA/QC)

Al fine di verificare la sensibilità della coltura di *A. tonsa* impiegata nello studio, si è provveduto ad allestire un controllo positivo in 6 repliche con una sostanza di riferimento. Le concentrazioni (25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$) sono state scelte attenendosi alla ISO 16778/2015 e a test pregressi (Picone et al, 2018). I risultati del controllo sono stati ritenuti accettabili se la media di LDR delle repliche al 5° giorno dall'inizio del test si attestava nel range $0,5 \pm 0,2$ e se la media dell'early life stage mortality (ELS-m) si dimostrava minore del 30%. La sostanza di riferimento, impiegata per saggiare la qualità delle uova prodotte dalla coltura, è il Diclorofenolo (3,5-DCP, la cui formula è $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O}$) e permette di valutare l'accettabilità dei dati ottenuti dai test a partire dagli effetti di una sostanza nota, di riferimento appunto (controllo positivo), in accordo con quanto riportato in letteratura (Andersen et al, 2001). L'intervallo di accettabilità per 3,5-DCP desunto dalla carta di controllo intralaboratorio è di 31-250 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Picone et al. 2018). Questo intervallo è parzialmente sovrapponibile rispetto all'intervallo proposto nella norma ISO, che prevede tuttavia valori più alti di EC50 (200 – 800 $\mu\text{g L}^{-1}$). Le differenze sono probabilmente legate ai differenti ceppi di copepodi utilizzati per i saggi e nei diversi regimi alimentari applicati.

3. Risultati

3.1 Verifica dell'accettabilità (QA/QC)

I criteri di accettabilità del dato, precedentemente dettagliati, sono stati rispettati in tutti i test effettuati. Il valore medio di LDR nei controlli dei test con i tre diversi pesticidi è sempre compreso nell'intervallo $0,5 \pm 0,2$. Anche per quanto riguarda l'ELS-m, il valore medio si attesta minore di 0,3 in tutti i test eseguiti. L'EC₅₀ per 3,5-DCP ricade dentro l'intervallo di accettabilità riportato in Picone et al, 2018.

3.2 Test LDR con *A. tonsa*

I dati di ogni concentrazione testata sono stati analizzati come media delle repliche per schiusa (Hatching = H), larval development ratio (LDR) ed early life stage mortality (ELS-mort.), associando Deviazione Standard (SD) e Standard Error (SE). Per una maggiore immediatezza nella lettura del dato, LDR è stato riportato anche come percentuale di inibizione dello sviluppo larvale rispetto al controllo (In%), mentre per il successivo confronto tra pesticidi ELS-mort (in tabella ELS-m) è stato riportato anche come ELS-s, cioè ricavando la sopravvivenza delle larve nei diversi test ($1 - \text{ELS-m}$). I risultati sono riportati nelle Tabelle 4, 6 e 8, rispettivamente per Nitenpyram, Dinotefuran e Flupyradifurone, mentre i dati completi sono consultabili in Appendice (Tab.V, tab.VI, tab.VII).

Tab. 4: Media di LDR, schiusa (Hatching) e ELS-mortality dei test con Nitenpyram.

	Larval development ratio				Hatching			Early-life stage mortality			
	LDR	SD	SE	In(%)	H	SD	SE	ELS-m	SD	SE	ELS-s
Controllo	0,57	0,19	0,09	-	0,85	0,09	0,04	0,37	0,15	0,06	0,63
0.01 µg L⁻¹	0,53	0,15	0,06	8%	0,87	0,06	0,03	0,38	0,13	0,05	0,62
0.1 µg L⁻¹	0,62	0,19	0,08	-9%	0,81	0,04	0,02	0,45	0,13	0,05	0,55
1 µg L⁻¹	0,45	0,18	0,07	21%	0,87	0,05	0,02	0,39	0,10	0,04	0,61
10 µg L⁻¹	0,32	0,18	0,07	45%	0,86	0,03	0,01	0,28	0,13	0,05	0,72
100 µg L⁻¹	0,00	0,01	0,00	99%	0,86	0,08	0,03	0,43	0,07	0,03	0,57

*SD= Deviazione Standard; SE=Standard Error; In%=percentuale di inibizione dello sviluppo larvale; ELS-s=1 - ELS-m

Per quanto riguarda l'analisi statistica dei dati sullo sviluppo larvale dopo l'esposizione a Nitenpyram, verificata la normalità dei dati e l'omogeneità delle varianze (test di Levene: $p=0,0977$), il test ANOVA applicato ha evidenziato differenze significative per almeno una concentrazione rispetto al controllo (ANOVA a una via: $F=11,21$ $p<<0,05$). In particolare, approfondendo attraverso il test di Tukey, sono emerse differenze statisticamente significative per LDR per le concentrazioni 10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. I valori risultanti dal test di Tukey sono riportati in Tab.5: i valori in rosso evidenziano un discostamento significativo dal controllo ($p<0,05$). Sulla base di questi risultati, la NOEC per Nitenpyram risulta essere 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, mentre la LOEC risulta pari a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. I dati del test con questo primo pesticida hanno permesso di ottenere una curva concentrazione-effetto, sulla base della quale si sono ricavate l'EC₂₀ e l'EC₅₀, rispettivamente pari a 2,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 9,4 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tab. 5: *p-value* relativi al Test di Tukey per Nitenpyram per il parametro LDR.

	Concentrazioni $\mu\text{g L}^{-1}$				
	0,01	0,1	1	10	100
Controllo	0,521	0,230	0,174	0,031	0,007

Prendendo in considerazione, invece, schiusa e ELS mortality, in entrambi i casi è stata verificata l'omogeneità delle varianze ed il test ANOVA a una via non evidenzia differenze dal controllo (rispettivamente $F=0,68$ $p=0,64$ e $F=1,36$ $p=0,26$).

Analogamente per il Dinotefuran si riportano i tre parametri come media delle repliche (Tab.6).

Tab. 6: *Media di LDR, schiusa (Hatching) e ELS-mortality dei test con Dinotefuran.*

	Larval development ratio				Hatching			Early-life stage mortality			
	LDR	SD	SE	ln(%)	H	SD	SE	ELS-m	SD	SE	ELS-s
Controllo	0,40	0,17	0,07	-	0,87	0,05	0,02	0,30	0,13	0,06	0,70
0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,37	0,11	0,04	6%	0,89	0,02	0,01	0,33	0,06	0,03	0,67
0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,34	0,14	0,06	14%	0,88	0,04	0,02	0,26	0,11	0,05	0,74
1 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,47	0,23	0,09	-17%	0,92	0,05	0,02	0,35	0,12	0,05	0,65
10 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,06	0,07	0,03	85%	0,91	0,05	0,02	0,35	0,12	0,05	0,65
100 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,00	0,00	0,00	100%	0,95	0,03	0,01	0,35	0,14	0,06	0,65

*SD= Deviazione Standard; SE=Standard Error; ln%=percentuale di inibizione dello sviluppo larvale; ELS-s=1 - ELS-m

Anche in questo caso, si è innanzitutto verificata la normalità dei dati relativi a LDR e la rispettiva omogeneità delle varianze (test di Levene: $p=0,1043$). Si considera perciò valido il risultato ottenuto dall'applicazione del test ANOVA ($F=11,88$ $p<<0,05$) che evidenzia differenze significative per almeno una concentrazione rispetto al controllo. Il test di Tukey ci permette di individuare quali concentrazioni effettivamente si discostino dal controllo in modo statisticamente significativo. Analogamente al caso precedente, anche per questo secondo pesticida tali concentrazioni corrispondono a 10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. I valori risultanti dal test sono riportati in Tab.7A. Sulla base di questi risultati, la NOEC per Dinotefuran risulta essere 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, mentre la LOEC risulta pari a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Sulla base della curva concentrazione-effetto ottenuta per questo secondo pesticida, l' EC_{20} e l' EC_{50} sono rispettivamente pari a 5,12 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 6,92 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Prendendo in considerazione la schiusa e verificata l'omogeneità delle varianze (test di Levene: $p=0,7873$), il test ANOVA a una via evidenzia differenze statisticamente significative ($F=3,004$ $p=0,026$), esplicitate successivamente tramite test di Tukey (Tab.7B) e corrispondenti alla sola concentrazione 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tab. 7: *p-value* relativi al Test di Tukey per Dinotefuran per i parametri LDR (A) e schiusa (B).

A.	Concentrazioni $\mu\text{g L}^{-1}$				
	0,01	0,1	1	10	100
Controllo	1,000	0,983	0,955	0,003	0,000

B.	Concentrazioni $\mu\text{g L}^{-1}$				
	0,01	0,1	1	10	100
Controllo	0,850	0,998	0,303	0,451	0,024

Per quanto riguarda ELS mortality per Dinotefuran, il test ANOVA a una via non evidenzia differenze statisticamente significative rispetto al controllo ($F=0,60$ $p=0,70$).

Si riportano in ultimo i dati relativi al Flupyradifurone (Tab.8).

Tab. 8: Media di LDR, schiusa (Hatching) e ELS-mortality dei test con Flupyradifurone.

	Larval development ratio				Hatching			Early-life stage mortality			
	LDR	SD	SE	In(%)	H	SD	SE	ELS-m	SD	SE	ELS-s
Controllo	0,38	0,16	0,07	-	0,97	0,03	0,01	0,25	0,05	0,02	0,75
0.01 µg L ⁻¹	0,17	0,13	0,05	55%	0,96	0,02	0,01	0,21	0,12	0,05	0,79
0.1 µg L ⁻¹	0,14	0,08	0,03	62%	0,97	0,03	0,01	0,22	0,04	0,02	0,78
1 µg L ⁻¹	0,12	0,19	0,08	69%	0,95	0,03	0,01	0,27	0,11	0,04	0,73
10 µg L ⁻¹	0,00	0,00	0,00	100%	0,97	0,02	0,01	0,23	0,08	0,03	0,77
100 µg L ⁻¹	0,00	0,00	0,00	100%	0,97	0,02	0,01	0,86	0,11	0,05	0,14

*SD= Deviazione Standard; SE=Standard Error; In%=percentuale di inibizione dello sviluppo larvale; ELS-s=1 - ELS-m

Per quanto riguarda l'analisi statistica dei dati sullo sviluppo larvale dopo l'esposizione a Flupyradifurone, verificata la normalità dei dati e l'omogeneità delle varianze (test di Levene: $p=0,1836$), il test ANOVA applicato ha evidenziato differenze per almeno una concentrazione rispetto al controllo (ANOVA a una via: $F=7,94$ $p<<0,05$). In particolare, approfondendo attraverso il test di Tukey, sono emerse differenze statisticamente significative per LDR per tutte le concentrazioni testate. I valori corrispondenti alle cinque concentrazioni sono riportati in Tab.9A: in rosso i valori che evidenziano un discostamento significativo dal controllo ($p<0,05$). Sulla base di questi risultati, la NOEC per Flupyradifurone risulta minore di $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, mentre la LOEC risulta pari a $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$. L'EC₂₀ e l'EC₅₀, ricavate dalla curva concentrazione-effetto dei dati di questo ultimo pesticida, sono rispettivamente pari a $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$.

Per quanto riguarda la schiusa, il test ANOVA a una via non evidenzia differenze statisticamente significative rispetto al controllo ($F=0,55$ $p=0,74$). Al contrario, prendendo in considerazione ELS mortality e verificata l'omogeneità delle varianze (test di Levene: $p=0,4851$), il test ANOVA a una via evidenzia differenze non trascurabili ($F=50,06$ $p<<0,05$), esplicitate nuovamente tramite test di Tukey (Tab.9B) e corrispondenti a $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tab. 9: p-value relativi al Test di Tukey per Flupyradifurone per i parametri LDR (A) e ELS-m (B).

A.	Concentrazioni $\mu\text{g L}^{-1}$				
	0,01	0,1	1	10	100
Controllo	0,024	0,010	0,000	0,000	0,000

B.	Concentrazioni $\mu\text{g L}^{-1}$				
	0,01	0,1	1	10	100
Controllo	0,931	0,978	0,999	0,999	0,000

Per agevolare il confronto tra i tre diversi pesticidi, i dati sono stati rappresentati tramite istogrammi, provvedendo innanzitutto alla normalizzazione delle medie rispetto al controllo in modo da ottenere valori comparabili e successivamente analizzando separatamente i dati normalizzati come sviluppo larvale (LDR-n), schiusa (H-n) ed sopravvivenza (ELS-s-n). I grafici ottenuti sono riportati di seguito (Fig.6, 7, 8). Sempre ai fini del confronto, si propone una tabella riassuntiva dei parametri ricavati per ogni singolo pesticida in termini di NOEC, LOEC, EC₂₀ ed EC₅₀ (Tab.10).

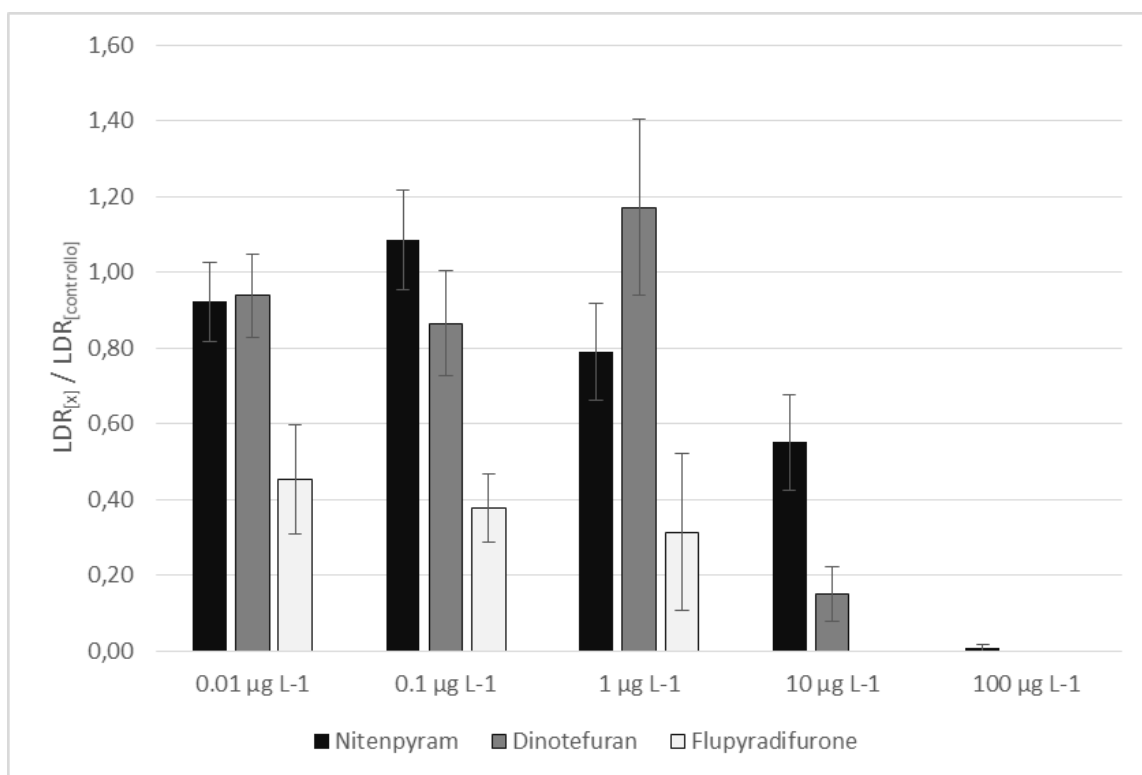


Figura 6: confronto degli effetti tossici generati dai 3 pesticidi nei confronti dello sviluppo larvale (LDR). I dati sono riportati come LDR normalizzato rispetto al LDR rilevato nel corrispondente controllo

Per quanto riguarda LDR, dal grafico sopra riportato (Fig.6) si evince come per Nitenpyram e per Dinotefuran si rilevi un apprezzabile discostamento dal controllo in termini di ritardo dello sviluppo larvale solo per concentrazioni pari o superiori a $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Come è possibile vedere dalle tabelle 4 e 6, a questa concentrazione si raggiunge rispettivamente la percentuale di inibizione dello sviluppo larvale del 45% per Nitenpyram e dell'85% per Dinotefuran. Confrontando questi dati con quanto ottenuto per il butenolide Flupyradifurone, si può notare un effetto tossico più marcato in quest'ultimo caso, con una percentuale di inibizione pari al 55% già da $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tab.8). Di conseguenza una totale inibizione dello sviluppo del nauplio e del passaggio allo stadio di copepodite si ritrova per Dinotefuran solo alla più elevata concentrazione testata, mentre per Flupyradifurone si registra già da $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Nel caso del Nitenpyram, seppur l'inibizione aumenti in modo significativo, alla massima concentrazione testata non si registra una totale assenza di copepoditi nei test.

Questa differenza in termini di LDR tra i due neonicotinoidi e il pesticida butenolide è ulteriormente sottolineata dal confronto tra NOEC, LOEC, EC_{20} ed EC_{50} : come riassunto nella tabella 10, la concentrazione di non effetto (NOEC) e la più bassa concentrazione di effetto (LOEC) di Nitenpyram e Dinotefuran si attestano rispettivamente a un ordine di grandezza cento volte e mille volte maggiore rispetto al Flupyradifurone. Conseguentemente, il butenolide registra l'insorgenza di effetti avversi, intesi qui come ritardo dello sviluppo larvale in una data percentuale degli individui costituenti il campione, a concentrazioni molto inferiori rispetto ai neonicotinoidi testati: prendendo per esempio l' EC_{50} , l'inibizione dello sviluppo larvale al 5° giorno per il 50% degli organismi esposti viene raggiunto a una concentrazione pari a $9,4 \mu\text{g L}^{-1}$ e $6,92 \mu\text{g L}^{-1}$ per Nitenpyram e Dinotefuran, ma già a $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ per Flupyradifurone.

Tab.10: confronto tra NOEC, LOEC, EC_{20} ed EC_{50} per tre pesticidi.

	Nitenpyram	Dinotefuran	Flupyradifurone
NOEC	$1 \mu\text{g L}^{-1}$	$1 \mu\text{g L}^{-1}$	$< 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$
LOEC	$10 \mu\text{g L}^{-1}$	$10 \mu\text{g L}^{-1}$	$0,01 \mu\text{g L}^{-1}$
EC_{20}	$2,1 \mu\text{g L}^{-1}$	$5,12 \mu\text{g L}^{-1}$	$0,001 \mu\text{g L}^{-1}$
EC_{50}	$9,4 \mu\text{g L}^{-1}$	$6,92 \mu\text{g L}^{-1}$	$0,02 \mu\text{g L}^{-1}$

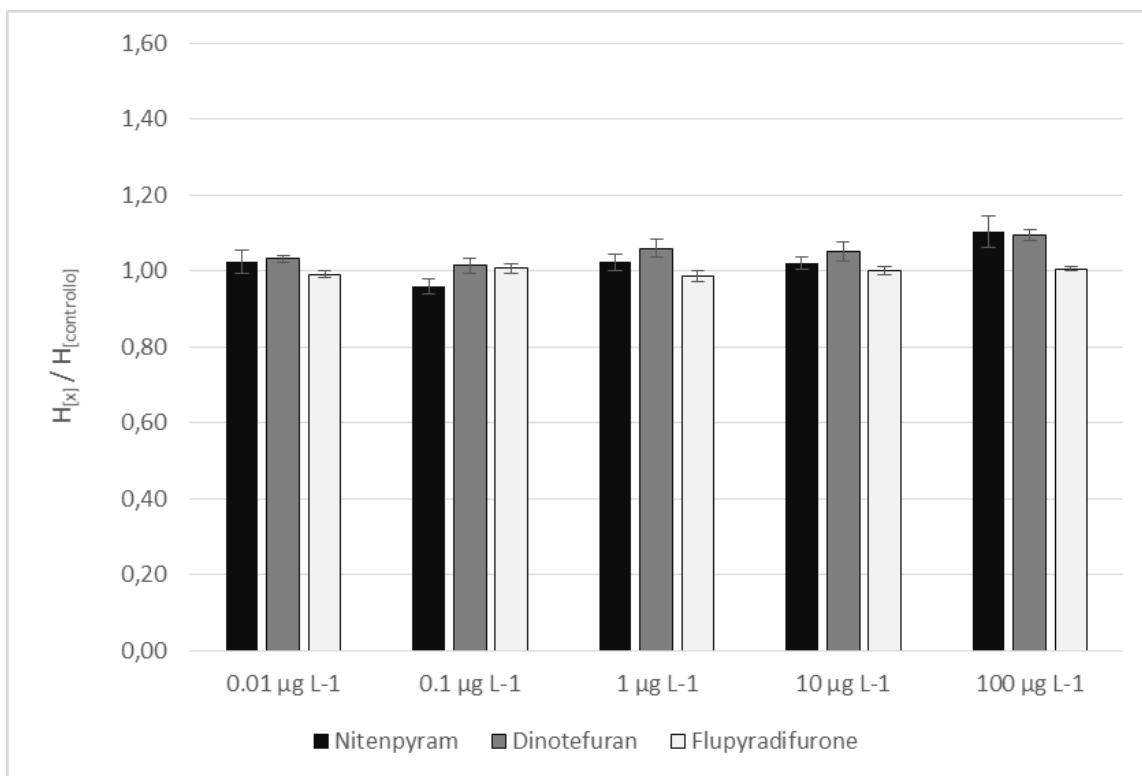


Figura 7: confronto degli effetti tossici generati dai 3 pesticidi nei confronti della schiusa (H). I dati sono riportati come H normalizzata rispetto ad H rilevato nel corrispondente controllo

Analizzando la schiusa, dal grafico in Fig.7 si evince chiaramente come non vi siano differenze apprezzabili per nessuno dei tre pesticidi oggetto di studio, indipendentemente dalla concentrazione considerata. In tutti e tre i casi, la schiusa delle uova esposte ai pesticidi si attesta analoga, suggerendo che tale parametro non sia influenzato dai principi attivi e che conseguentemente non insorgano effetti avversi che compromettono la schiudibilità. Si ricorda, tuttavia, che per il Dinotefuran era emersa dall'analisi statistica una differenza statisticamente significativa in termini di aumento del numero di uova schiuse rispetto al controllo, che tuttavia non risulta apprezzabile in sede di confronto.

Per quanto riguarda ELS-s, dal grafico in Fig.8 si evince come per Nitenpyram e per Dinotefuran non si rilevi un apprezzabile discostamento dal controllo in termini di sopravvivenza degli individui. Come è possibile vedere anche dalle tabelle 4 e 6, la mortalità associata alle diverse concentrazioni si mantiene piuttosto costante per questi due pesticidi, con una flessione minima alle concentrazioni più elevate. Confrontando questi dati con quanto ottenuto per il Flupyradifurone, si può notare come la sopravvivenza associata alle prime quattro concentrazioni riportate nel grafico sia analoga a quella degli altri due pesticidi testati, tuttavia un effetto tossico più marcato si associa in termini di mortalità al Flupyradifurone nei test a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. In questo ultimo caso la sopravvivenza si riduce notevolmente: basandosi sui dati in tab.8, la mortalità aumenta dell'81% rispetto al controllo (ELS-s a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ pari al 19%).

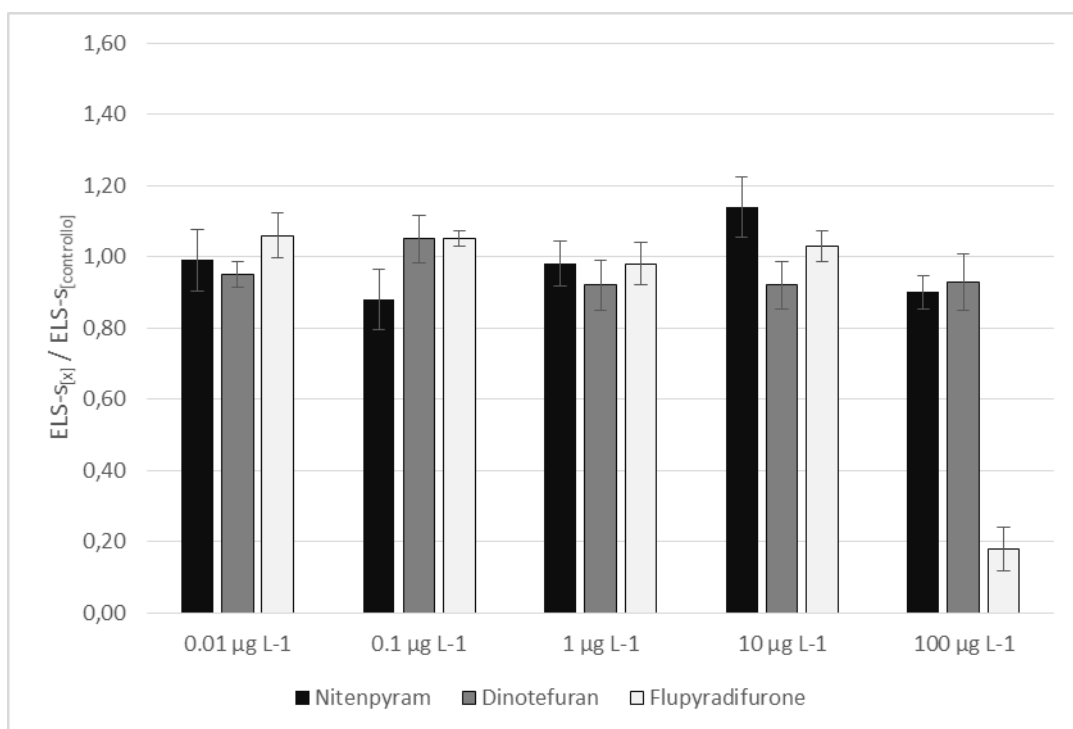


Figura 8: confronto degli effetti tossici generati dai 3 pesticidi nei confronti della sopravvivenza (ELS-s). I dati sono riportati come ELS-s normalizzata rispetto alla sopravvivenza rilevato nel corrispondente controllo

4. Discussione e conclusioni

I dati di tossicità ottenuti mediante i test con neonicotinoidi e butenolidi oggetto di questo studio evidenziano come questi composti comportino l'insorgenza di effetti avversi su organismi non target esposti, in linea con quanto si trova in bibliografia per pesticidi appartenenti alla medesima categoria (Alexander et al, 2007; Beketov & Liess, 2008; Decourtye & Devillers, 2010; Miles et al, 2018; Sumon et al, 2018; Alberoni et al, 2021). Lo studio di tali effetti è reso complesso non solo dalla numerosità dei composti chimici che possiamo ritrovare nei diversi comparti, ma anche da possibili effetti cumulativi o agonistici, dall'influenza delle condizioni ambientali sulla persistenza (Morrissey et al, 2015) e dalla molteplicità degli endpoint che possono essere registrati a seconda della specie considerata. A tale proposito, si ricorda come nello studio degli impatti sugli organismi, nel nostro caso su invertebrati acquatici, sia fondamentale considerare non solo l'endpoint mortalità, ma anche qualsiasi altra problematica, di sviluppo, riproduttiva, comportamentale, che possa insorgere a seguito dell'esposizione e come la scelta degli effetti da considerare sia strettamente collegata alla specie che si intende studiare (Miles et al, 2018) al fine di mettere in luce tutti gli effetti, inclusi quelli subletali. Come emerge dallo studio, anche per *A. tonsa*, il mero studio della mortalità fornisce un dato parziale sulla tossicità dei composti e l'affiancamento di endpoint subletali, come il ritardo nello sviluppo larvale, si dimostra indispensabile per la valutazione dei potenziali effetti su una popolazione. Analogamente si sottolinea l'importanza di procedere anche con test cronici e subcronici che seppur più complessi possono fare emergere criticità a medio e lungo termine non riscontrabili con i test acuti.

A. tonsa si riconferma, come da studi precedenti, una specie con una buona sensibilità nei confronti di numerosi principi attivi, potenzialmente presenti nelle diverse matrici ambientali e in ultimo accumulabili negli ambienti acquatici in seguito a fenomeni di dilavamento e runoff. Come si evince anche dal presente studio, diversi principi attivi, seppur talvolta appartenenti alla stessa categoria dal punto di vista chimico e con lo stesso meccanismo d'azione sugli organismi come nel nostro caso l'interferenza con la trasmissione dell'impulso nervoso a livello di sinapsi colinergiche, possono presentare tossicità più o meno marcata in funzione di piccole sostituzioni di gruppi funzionali, che determinano in ultimo ripercussioni a livello di specificità di legame, stabilità e persistenza dello stesso o maggiore affinità verso determinate specie. Prendendo in considerazione l'inibizione dello sviluppo larvale, quale endpoint di maggior impatto per la specie, si evince come *A. tonsa* manifesti diversa incidenza degli effetti a seconda del composto in esame.

Dal confronto dell'EC₅₀ di Nitenpyram, Dinotefuran e Flupyradifurone (rispettivamente 9,4 µg L⁻¹, 6,92 µg L⁻¹, 0,02 µg L⁻¹) emerge chiaramente come quest'ultimo si attesti più tossico rispetto ai primi due per la specie test, con concentrazioni che causano un ritardo nello sviluppo larvale per il 50% del campione esposto molto più basse rispetto a quelle dei neonicotinoidi analizzati, ma anche più basse rispetto alla loro NOEC. In altre parole, laddove l'esposizione a Nitenpyram e Dinotefuran non ha ancora raggiunto concentrazioni tali da dare effetti osservabili sul rapporto tra naupli e copepoditi presenti, il Flupyradifurone raggiunge già tali manifestazioni in metà degli organismi esposti nel test. Oltre alla struttura chimica della molecola, che ne determina la classificazione come butenolide, ricordiamo anche che il Flupyradifurone è l'unico dei pesticidi qui analizzati che ha registrato un'incidenza elevata su un secondo endpoint, cioè quello della sopravvivenza alle alte concentrazioni, che risulta essere notevolmente diminuita, mentre per gli altri principi attivi si nota solo una leggera flessione della numerosità, comunque non statisticamente significativa. La sopravvivenza al Flupyradifurone delle larve, viceversa, ci consente di aggiungere ulteriori dettagli all'analisi, in quanto non solo il principio ritarda lo sviluppo in modo importante, ma se superiore nella matrice a una certa soglia si dimostra capace di incidere anche a livello di mortalità. Anche se non si può assumere *a priori* che un endpoint di questo tipo a livello di individuo riscontrato tramite test di laboratorio comporti effetti avversi sulle popolazioni naturali, bisogna comunque considerare che tale eventualità non è del tutto escludibile e che un aumento della mortalità nei test suggerisce la necessità di ulteriori approfondimenti e la possibilità di impatti a più larga scala. Tale dato di tossicità potrebbe essere letto anche alla luce del fatto che la molecola, diversamente da tutti i neonicotinoidi oggi conosciuti, presenta due atomi di Fluoro, di cui è nota la tossicità anche su organismi superiori sia come elemento sia come acido fluoridrico formato per contatto con l'acqua, se in concentrazione o dose superiori a una certa soglia, essendo comunque un elemento essenziale in tracce (IPCS, 2002; Kyzer & Martens, 2021). Se per il butenolide la diversa potenza (intesa come attività del composto chimico, visualizzabile dalla curva concentrazione-effetto come distanza dall'origine lungo l'asse x, rappresentante la concentrazione) è facilmente attribuibile alla sua sostanziale differenza di struttura rispetto agli altri pesticidi, non è da trascurare, come precedentemente accennato, il fatto che anche nella stessa classe dei neonicotinoidi la tossicità non è uniforme e che differenze di tossicità si registrano anche in relazione alla specie esposta.

Considerando i risultati ottenuti in questo studio e confrontandoli con quanto emerge nelle medesime condizioni sperimentali per *A. tonsa* per gli altri neonicotinoidi, si osserva che la

situazione a livello di EC_{50} è diversificata. I neonicotinoidi oggi di maggior impiego soprattutto ai fini agricoli (Imidacloprid, Acetamiprid, Clothianidin, Thiacloprid e Thiamethoxam) sono accumulati dal registrare insorgenza di effetti avversi in termini di ritardo dello sviluppo larvale a concentrazioni comprese tra 0,4 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Nello specifico dal confronto dei risultati ottenuti con precedenti test, si riscontra tossicità comparabile tra Nitenpyram, Dinotefuran e Imidacloprid, con EC_{50} che si discostano l'uno dall'altro di poche unità: per l'Imidacloprid consideriamo un EC_{50} pari a 7,89 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Picone et al, unpublished data). Seppur il motivo di questa analogia, non sia stato indagato, possiamo notare come a livello chimico questi tre composti siano accumulati da un gruppo funzionale non presente negli altri principi della categoria: si tratta del gruppo nitrico NO_2 . Per altre tipologie di composti chimici, quali per esempio alcuni tipi di farmaci (psicofarmaci o anestesie), alcuni studi evidenziano l'insorgenza di neuropatie o mutagenicità conseguente all'aggiunta di gruppi nitrici alla formula di partenza (Chung et al, 1996; Pema et al, 1998). Per quanto riguarda gli altri neonicotinoidi, la tossicità si manifesta sullo sviluppo larvale già a concentrazioni minori (vicine a 1 o 2 $\mu\text{g L}^{-1}$), con effetti avversi maggiormente marcati in assoluto dopo l'esposizione degli organismi test a soluzioni contenenti Acetamiprid: EC_{50} pari a 0,48 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Picone et al, unpublished data). Questi altri composti non presentano gruppo nitrico nella molecola, ma sono accumulati dalla presenza di zolfo. È possibile quindi desumere che i neonicotinoidi oggetto di questo studio si attestano con tossicità leggermente minore rispetto a quelli di maggior utilizzo, fatta eccezione solo per l'Imidacloprid che si dimostra avere azione analoga. Emerge tuttavia che tutti i principi della categoria neonicotinoidi, compresi quelli di largo impiego non testati in questo studio, risultano invece avere effetti avversi in termini di LDR sulla specie considerata meno importanti rispetto al Flupyradifurone, al cui tossicità è di conseguenza notevolmente maggiore. Come già accennato in precedenza, tale discrepanza è anche legata al fatto che il composto è il primo rappresentante di una nuova classe di pesticidi, chimicamente distinta. I risultati ottenuti con *A. tonsa* non sono generalizzabili ad altre specie, motivo per cui spesso il confronto e la valutazione degli impatti ambientali richiedono molteplici studi. Se per i principi attivi principali la bibliografia è florida relativamente alla tossicità nei confronti di specie acquatiche (soprattutto per i test acuti), per Dinotefuran, Nitenpyram e Flupyradifurone gli studi sono ancora scarsi. Tra questi spicca uno studio su crostacei e insetti acquatici con Dinotefuran di Morrissey et al, 2015, da cui emerge che questo pesticida è meno tossico rispetto agli altri neonicotinoidi di maggior impiego, ma da cui si evince anche i crostacei sono in generale meno sensibili al Dinotefuran rispetto agli insetti acquatici, con differenze significative all'interno del

gruppo tassonomico: gli efemerotteri sono i più sensibili tra gli insetti insieme ai tricotteri, mentre per i crostacei troviamo podocopidi, misidacei e anfipodi, mentre i cladoceri si attestano poco sensibili. Uno studio condotto con test acuti su *Chironomus dilutus* al fine di valutare nuovi insetticidi in uso alternativo ai principi attivi oggetto di regolamentazione mostra come, per questa specie, il Flupyradifurone non sia la molecola con maggiore tossicità e anzi insetticidi più diffusi come l'Imidacloprid abbiano sulla fase larvale acquatica di questo insetto effetti più marcati, portando alla classificazione del butenolide come moderatamente tossico: ad titolo esemplificativo la LC_{50} per Imidacloprid si conferma intorno a $7 \mu\text{g L}^{-1}$ mentre per il Flupyradifurone è $16,6 \mu\text{g L}^{-1}$ (Maloney et al, 2020). Un comportamento analogo è stato riscontrato per altri insetti caratterizzati da fase larvale acquatica (*Hexagenia* spp), confermando anche in questo caso particolare che Flupyradifurone mostra tossicità intermedia e minore rispetto ad altri insetticidi come il Dinotefuran: per questi organismi la tossicità del Dinotefuran a 96h si manifesta a concentrazioni pari a $4 \mu\text{g L}^{-1}$, concentrazione venti volte minore rispetto a quanto emerge per il butenolide (Bartlett et al, 2018). Considerando organismi con intero ciclo vitale acquatico come l'anfipode *Hyalella azteca* e *D. magna* per quest'ultimo principio attivo le concentrazioni di effetto sono analoghe o addirittura maggiori a quanto rilevato con *Hexagenia* spp, rispettivamente $16 \mu\text{g L}^{-1}$ (Barlett et al, 2019) e $77600 \mu\text{g L}^{-1}$ (European Food Safety Authority, 2016). Dato nuovamente in discontinuità con la specie impiegata in questo studio. Maloney et al, 2020 sottolineano, tuttavia, come siano presenti differenze significative anche all'interno dello stesso genere, con *Chironomus riparus* che vede nei test con Flupyradifurone effetti avversi maggiori rispetto ai neonicotinoidi, come accade con *A. tonsa*. Dalla variabilità nella sensibilità e nei profili di tossicità si evince come sia fondamentale diversificare le specie indicatrici per valutare opportunamente gli impatti ambientali a più larga scala, in quanto non è apprezzabile un comportamento comune anche tra organismi affini.

Il sempre maggior impiego di questi pesticidi ed insetticidi per scopi agricoli e domestici potrebbe quindi comportare il raggiungimento di concentrazioni critiche per la specie anche in ambiente. Tuttavia, è necessario anche considerare che accanto alla problematica di composti chimici ingegnerizzati per essere tossici che impattano su specie non target, vi è anche quella di molecole sintetizzate per altri scopi che manifestano talvolta a lungo termine tossicità inaspettata. A tal proposito, la specie test si dimostra sensibile anche ad altre sostanze, come ad esempio i contaminanti emergenti costituiti da fragranze (Picone et al, 2021). Questi composti di difficile rimozione dalle acque reflue attraverso i sistemi di depurazione oggi in uso e largamente utilizzati

dalla popolazione costituiscono motivo di preoccupazione per i potenziali effetti avversi sugli organismi acquatici. Da recenti studi emerge che le fragranze, diffuse in detersivi, cosmetici ed altri prodotti per la cura personale o della casa, causano inibizione dello sviluppo larvale in *A. tonsa* a concentrazioni molto minori rispetto a quanto riscontrato per le medesime molecole in altre specie acquatiche, quali *D. magna* ma anche pesci o alghe (Belsito et al, 2007; Natsch et al, 2018; Picone et al, 2021). Anche Picone et al, 2018 mette in luce come sostanze immesse in ambiente solitamente senza destare grande preoccupazione in quanto considerate innocue sulla base di test acuti condotti in laboratorio, possono in realtà causare l'insorgenza di importanti effetti avversi anche a basse concentrazioni e che quindi non solo i composti prodotti per avere funzione di pesticida possono essere impattanti dal punto di vista ambientale.

Analogamente a quanto riscontrato con i neonicotinoidi, non è possibile stabile a priori la tossicità di una classe di composti su organismi non target sulla base di singoli test di laboratorio, in quanto gli effetti possono essere molto diversi. Osservando il comportamento delle fragranze, ad esempio, si evince come alcune molecole presentino una discreta tossicità per *A. tonsa*, non paragonabile comunque a quella di un pesticida, come ad esempio la tonalide (AHTN) essenza diffusa in profumi, deodoranti e lozioni avente EC_{50} pari a $26 \mu\text{g L}^{-1}$ (Wollenberger, 2005); al contrario, altre fragranze presentano tossicità maggiore rispetto ai neonicotinoidi, come ad esempio il salicilato di esile (HEX) con EC_{50} pari a 57 ng L^{-1} (Picone et al, 2021). Quanto detto è applicabile a numerosi altre classi di contaminanti organici, i cui effetti sono stati studiati sulla medesima specie test, confermando la sensibilità a una vasta gamma di contaminanti organici, come ad esempio gli estrogeni (Wollenberger, 2005) e avvalorando la preoccupazione per gli effetti dei contaminanti emergenti quali farmaci e insetticidi di nuova generazione sul comparto acquatico.

Analizzando il comportamento dei neonicotinoidi in un contesto acquatico più ampio, alcuni studi hanno indagato gli effetti su altri indicatori biologici. Le specie maggiormente impiegate in questo genere di test sono *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*. Numerosi studi sono ricorsi all'esposizione di questi crostacei cladoceri, sia per motivi storici legati al loro impiego in ecotossicologia, sia per l'economicità, la facilità di allevamento, mantenimento e la rilevanza ecologica. Tuttavia, confrontando i risultati ottenuti da diversi studi su queste specie test, possiamo concludere che *D. magna* si dimostra meno sensibile di *A. tonsa* e di *C. dubia* per alcuni tipi di contaminanti (Wollenberger, 2005). Non è tuttavia da sottovalutare il fatto che trattandosi

di specie diverse sono stati scelti endpoint differenti che rendono tale confronto piuttosto difficile e non direttamente corrispondente. Per *Daphnia*, ad esempio, sono ugualmente studiati endpoint come l'immobilizzazione, ma anche l'inibizione della muta soprattutto in presenza di sostanze estrogeniche (Zou & Fingerman, 1997). Per i due cladoceri, è nota la scarsa sensibilità ai neonicotinoidi in test acuti, mentre per quanto riguarda i test cronici la tossicità è ben caratterizzata per *D. magna*, ma poco studiata per *C. dubia*. Uno studio condotto su *Daphnia magna* ha registrato un EC₅₀ a 7 giorni sull'endpoint riproduttività pari a 2,98 mg L⁻¹ per Thiacloprid e maggiore a 67 mg L⁻¹ per Dinotefuran, mentre *C. dubia* si attesta due volte più sensibile ai medesimi principi (Raby et al, 2018^b). La differenza con quanto emerso in questo studio per *A. tonsa* sull'effetto subletale considerato (LDR) è notevole e sottintende che a parità di concentrazione ambientale gli effetti siano diversificati a seconda della specie e del tempo considerato; tuttavia, ciò deve essere letto nell'ottica in cui si tratta comunque di endpoint diversi. Questo dato è in linea con quanto emerge da studi precedenti su altre specie (Bartlett et al, 2018; Berlett et al, 2019; Maloney et al, 2020). Anche se i valori di tossicità cronica per le due specie si dimostrano notevolmente più alte delle concentrazioni spesso registrate in ambiente, non sono escludibili potenziali impatti, anche alla luce di quanto emerge da studi sugli effetti della sostanza come principio o come parte di una formulazione. Diversi autori riportano infatti che la tossicità sia fortemente condizionata dalla formulazione del prodotto finale (effetti sinergici o antagonisti) e talvolta i principi attivi testati puri si dimostrino meno tossici del composto contenente anche altri additivi (Mortl et al, 2019; Mortl et al, 2020). Ancora una volta, il discorso non può essere generalizzato a qualsiasi pesticida: a titolo esemplificativo, Takacs et al, 2017 ha riscontrato nei test acuti di immobilizzazione su *Daphnia magna* una tossicità 46 volte maggiore col formulato Apache 50WG (il cui principio attivo è il Clothianidin) rispetto alla molecola pura e una tossicità tre volte minore coi formulati ACTARA 240SC e CALYPSO 480SC (i cui principi attivi sono rispettivamente Thiamethoxam e Thiacloprid) rispetto alla sostanza pura. Analogamente Mortl et al, 2020 riportano una tossicità maggiore con Thiacloprid e Thiamethoxam impiegati come sostanze pure e con Clothianidin e Acetamiprid usati in formulati, proprio per l'effetti sinergico con gli additivi. Accanto a ciò, è necessario considerare anche come la tossicità possa variare se viene considerata una singola immissione o immissioni multiple: la stessa *Daphnia* si dimostra fortemente tollerante a Imidacloprid, grazie alla capacità di depurazione rapida dai tessuti molli, ma si registrano tempi di recupero significativamente più lunghi se sottoposti a esposizione intermittente (Huizhen et al, 2021).

L'elevata conservazione a livello evolutivo della trasmissione dell'impulso nervoso tramite il neurotrasmettitore ACh fa sì che il medesimo meccanismo d'azione possa essere riscontrato anche in phyla distanti tra loro: studi sul legame tra neonicotinoidi e proteine leganti l'acetilcolina hanno evidenziato affinità anche in alcune specie di molluschi gasteropodi, come *Lymnaea stagnalis* e *Aplysia californica* e di bivalvi (Ewere et al, 2020). Il medesimo studio, mette in luce come a seconda della specie effetti tossici si manifestino a concentrazioni diverse e riguardino endpoint differenti. Prendendo ad esempio il bivalve *Saccostrea glomerata*, l'esposizione di adulti a Imidacloprid per 4 giorni causa riduzione del tasso di filtrazione (Ewere et al, 2019) e l'esposizione per due settimane causa la riduzione dell'enzima ACh e il cambiamento nel normale rapporto tra classi di acidi grassi (Ewere et al, 2019^b). Lo stesso neonicotinoide impiegato in test su *Mytilus galloprovincialis* registra a 4 giorni sovraregolazione del gene codificante le Heat Shock Protein (Dondero et al, 2010) e riduzione della superossido dismutasi (SOD) nelle ghiandole digestive a 20 giorni (Stara et al, 2020). In entrambe le specie si parla di concentrazioni dell'ordine dei mg L⁻¹, ponendole come meno sensibili rispetto ad *A. tonsa* (si consideri comunque che per questa specie si sono impiegati stadi larvali e non adulti e questo pone già la specie in una situazione di maggiore sensibilità). In letteratura non si trovano molti dati sui neonicotinoidi meno diffusi. Risultati analoghi si possono riscontrare anche su specie non acquatiche: ricordiamo ad esempio che alcuni studi di laboratorio sottolineano come *Apis mellifera* registri mortalità del 50% del campione esposto a neonicotinoidi con gruppo nitrico con valori che non raggiungono il µg (Iwasa et al, 2004). Comparando ciò con quanto finora detto per *A. tonsa*, si evince che le api si dimostrano, in presenza di gruppo nitrico nel pesticida, più sensibili rispetto a questo copepode, il cui endpoint sopravvivenza si attesta per i neonicotinoidi un parametro non significativo.

Quanto finora detto sia per quanto riguarda il presente test sia per quanto riguarda studi con altri neonicotinoidi o altri indicatori biologici rimanda chiaramente al fatto che i test di laboratorio sono altamente standardizzabili, ripetibili e controllabili, ma non colmano il gap con le conoscenze necessarie a valutare l'impatto ambientale dei contaminanti: nonostante l'elevata rilevanza ecologica degli organismi impiegati, le variabili ambientali, composizionali, le dinamiche di popolazione o di comunità possono creare una discrepanza tra i risultati di laboratorio e quanto emerge in ambiente. La rilevanza dei dati che si ottengono dal laboratorio riguarda il fatto di ottenere delle prime indicazioni su come una particolare molecola sia in grado di interagire a livello di organismo, livello basilare perché si possano riscontrare effetti anche a livelli di organizzazione superiori, ma non esaustivi del problema. La rilevanza ecologica, quindi, deve

essere valutata anche in relazione a sistemi sperimentali a scala maggiore o a casi studio direttamente nella matrice interessata. Morrissey et al, 2015 ha riportato come nella metà dei siti monitorati per le acque a livello mondiale si registri presenza di Imidacloprid, probabilmente per il fatto che si tratta del primo storicamente entrato in commercio. Analizzando i range riscontrati si evince come la concentrazione di Imidacloprid raggiunga in alcuni siti valori massimi pari a $320 \mu\text{g L}^{-1}$, quella di Acetamiprid pari a $44,1 \mu\text{g L}^{-1}$, quella di Thiamethoxam pari a $225 \mu\text{g L}^{-1}$ e quella di Clothianidin pari a $3,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Nonostante non si menzionino i pesticidi testati nel presente studio, è facilmente intuibile come in ambiente, dove diversi insetticidi sono presenti contemporaneamente, anche concentrazioni intermedie rispetto a quelle riportate possono risultare preoccupanti, anche alla luce del fatto che sempre nuovi principi vengono sintetizzati e che tra questi alcuni presentano tossicità più marcata nei confronti di alcuni organismi non target, come nel caso del Flupyradifurone. Proprio questo principio attivo, è uno dei composti esclusi dalla regolamentazione a livello mondiale e viene citato solo nelle Linee Guida Per la Qualità delle Acque USEPA (US Environmental Protection Agency) (Maloney et al, 2020). Se ancora non si fa riferimento specificatamente al Flupyradifurone nelle matrici ambientali, al contrario Nitenpyram e Dinotefuran sono talvolta esclusi da confronti e analisi in quanto si registrano solo pochi rilevamenti durante i monitoraggi, a riprova della loro modesta diffusione (Raby et al, 2018).

In conclusione, anche se l'EFSA ad oggi riporta come valore di riferimento una NOEC cumulativa per i neonicotinoidi pari a 200 ng L^{-1} (Mortl et al, 2020), a livello mondiale alcuni corpi idrici si attestano ben al di sopra di tale soglia: va considerato, inoltre, il fatto che in una matrice ambientale si possono venire a trovare diversi contaminanti (pesticidi, fragranze, farmaci) e ognuno può contribuire a dare tossicità in una data specie. In tal senso, anche se i risultati di questo studio, fatta eccezione del Flupyradifurone, potrebbero risultare poco preoccupanti se confrontati con quelli di altri pesticidi, essi assumono importanza nel contesto di una matrice complessa e dei potenziali effetti a livello di popolazione o di comunità.

Bibliografia

Alberoni D., Favaro R., Baffoni L., Angeli S., Di Gioia D. (2021). Neonicotinoids in the agroecosystem: in-field long-term assessment on honeybee colony strength and microbiome. *Science of the Total Environment*, Vol. 762.

Andersen H.R., Wollenberger L., Halling-Sørensen B., Kusk K.O. (2001). Development of copepod nauplii to copepodites - a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2821–2829.

Akayama A., Minamida I. (1999). Discovery of a new systemic insecticide, nitenpyram and its insecticidal properties. *Nicotinoid insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*, 127-148.

Alexander A.C., Culp J.M., Liber K., Cessna A.J. (2007). Effects of insecticide exposure on feeding inhibition in mayflies and oligochaetes. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1726–1732.

Armbrust K.L., Peeler H.B., (2002). Effects of formulation on the run-off of imidacloprid from turf. *Pest Manag. Sci.* 58, 702–706.

ARPAV (2017). Stato delle Acque superficiali del Veneto.

Bartlett A.J., Hedges A.M., Intini K.D., Brown L.R., Maisonneuve F.J., Robinson S.A., Gillis P.L., de Solla S.R. (2018). Lethal and sublethal toxicity of neonicotinoid and butenolide insecticides to the mayfly, *Hexagenia* spp. *Environmental Pollution* 238: 63-75

Bartlett A.J., Hedges A.M., Intini K.D., Brown L.R., Maisonneuve F.J., Robinson S.A., Gillis P.L., de Solla S.R. (2019). Acute and chronic toxicity of neonicotinoid and butenolide insecticides to the freshwater amphipod, *Hyalella azteca*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 175: 215–223

Beketov M.A., Liess M. (2008). Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 461–470.

Belsito D., Bickers D., Bruze M., Calow P., Greim H., Hanifin J.M., Rogers A.E., Saurat J.H., Sipes I.G., Tagami H. (2007). A toxicologic and dermatologic assessment of salicylates when used as fragrance ingredients. *Food Chem. Toxicol.* 45, 318–361.

Boxshall G.A., Halsey S.H. (2004). *An Introduction to Copepod Diversity*. The Ray Society, London UK, 966.

Buttino I., Vitiello V., Macchia S., Pellegrini D., Gorbi G. (2019). Saggio di sviluppo larvale in presenza di sedimento con il copepode calanoide planctonico *Acartia tonsa* (Dana, 1848). *Quaderni di Ecotossicologia*. ISPRA, Quaderni - Ricerca Marina n. 13/2019.

Camatti E., Pansera M., Bergamasco Al. (2019). The copepod *Acartia tonsa* DANA in a microtidal mediterranean lagoon: history of a successful invasion. *Water* 11(6).

Carisa J.E., Durkin K.A., (2013). Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annu. Rev. Entomol.* 2013.58:99-117.

Castonguay M., Plourde S., Robert D., Runge J.A., Fortier L. (2008). Copepod production drives recruitment in a marine fish. *Can. J. Fish.Aquat.Sci.* 65 (8), 1528–1531.

Christensen E.R., Kusk K.O., Nyholm N. (2009). Dose–response regressions for algal growth and similar continuous endpoints: Calculation of effective concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 826–835.

Chung K.T., Murdock C.A., Zhou Y., Stevens S.E., Li Y.S., Wei C.I., Fernando S.Y., Chou M.W. (1998). Effects of the nitro-grou on the mutagenicity and toxicity of some benzamines. *Environ Mol Mutagen* 27: 67-74.

Comaschi A., Acri F., Bianchi F., Bressan M., Camatti E. (2000). Temporal changes of species belonging to *Acartia* genus (Copepoda: Calanoida) in the Northern Basin of the Venice Lagoon. *Boll Mus Civ Stor Nat Ven*, 50: 189–193.

Cluzeau S. (2002). Risk assessment of plant protection products on honey bees. Devillers J, Pham-Delegue MH, eds. *Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals*. London: Taylor and Francis 2002:42–55.

Decourtye A., Devillers J., (2010). Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. Hervé Thany, S. (Ed.), *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*. Springer-Verlag, Berlin.

Dondero F., Negri A., Boatti L., Marsano F., Mignone F., Viarengo A. (2010). Transcriptomic and proteomic effects of a neonicotinoid insecticide mixture in the marine mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lam.). *Sci. Total Environ*. 2010, 408, 3775–3786.

EFSA Scientific Committee, 2013. Scientific opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment. *EFSA Journal*, 11 (3):3132, 84pp

Eskenazi B., Bradman A., Castorina R., (1999). Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environ. Health Perspect*. 107, 409–419.

European Environment Agency, (2018). Annual Indicator Report Series (AIRS) — In support to the monitoring of the 7th Environment Action Programme - Environmental indicator report 2018.

European Food Safety Authority. 2016. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flupyradifurone. Parma, Italy.

Ewere E.E., Powell D., Rudd D., Reichelt-Brushett A., Mouatt P., Voelcker N.H., Benkendorff K. (2019). Uptake, depuration and sublethal effects of the neonicotinoid, imidacloprid, exposure in Sydney rock oysters. *Chemosphere*, 230, 1–13.

Ewere E.E., Reichelt-Brushett A., Benkendorff K. (2019^b). Imidacloprid and formulated product impacts the fatty acids and enzymatic activities in tissues of Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. *Mar. Environ. Res.* 2019, 151, 104765.

Ewere E.E., Reichelt-Brushett A., Benkendorff K. (2021). Impacts of Neonicotinoids on Molluscs: What We Know and What We Need to Know. *Toxics*, 9

FAO, (1991). Guidelines on the initial introduction and subsequent development of a simple national pesticide registration and control scheme.

Farabegoli A., Ferrari I., Manzoni C., Pugnetti A. (1989). Prima segnalazione nel Mare Adriatico del copepode calanoide *Acartia tonsa* DANA. *Nova Thalassia*, 10: 207-208.

Fossen M. (2006). Environmental Fate of Imidacloprid. Environmental Monitoring Department of Pesticide Regulation CA-USA.

Gibbons D., Morrissey C., Mineau P., (2014). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–16.

Gonzales-Mariño I., Rodriguez L.R., Cela R. (2018). Photodegradation of Nitenpyram under UV and solar radiation: kinetics transformation products identification and toxicity prediction. *Science of total Environment*, vol. 644, 995-1005.

Guillard R.R.L., Ryther J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.

Guillard R.R.L., (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Culture of Marine Invertebrate Animals. Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) Plenum Press, NY, 26-60.

Hem L., Abd El-Aty A.M., Park J.H., Shim J.H. (2012). Determination of dinotefuran in pepper using liquid chromatography: contribution to safety evaluation. J. Korean Soc. Appl. Bi, 55, 765-768.

Huizhen L., Qingjun A., Hang S., Jing Y., Wen-Xiong W. (2021). High tolerance and delayed responses of *Daphnia magna* to neonicotinoid insecticide Imidacloprid: toxicokinetic e toxicodynamic modeling. Environ. Sci. Technol., 55, 1, 458–467

Ianora A., Miralto A., Poulet S.A., Carotenuto Y., Buttino I., Romano G., Casotti R., Pohnert G., Colucci-D'Amato L., Terrazzano G., Smetacek V. (2004). Aldehyde suppression of copepod recruitment in blooms of a ubiquitous planktonic diatom. Nature, 429: 403–407.

IPCS (2002) World Health Organization, International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 227. Fluorides. Geneva.

ISO 16778, 2015. Water quality-Calanoid copepod early-life stage test with *Acartia tonsa*.

Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J.T., Roe R.M., (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. Crop. Prot. 23, 371–378.

Jeschke P., Nauen R. (2005). Neonicotinoid Insecticides. Comprehensive Molecular Insect Science. Vol. 5, 53-105.

Jeschke P., Nauen R. (2008). Neonicotinoids—From zero to hero in insecticide chemistry. Pest Manag Sci 64:1084–1098.

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

Kyzer J.L., Martens M. (2021). Metabolism and Toxicity of Fluorine Compounds. *Chemical Research in Toxicology*, vol. 34 (3): 678-680.

Maloney E.M., Sykes H., Morrissey C., Peru K.M., Headley J., Liber K. (2020). Comparing the Acute Toxicity of Imidacloprid with Alternative Systemic Insecticides in the Aquatic Insect *Chironomus dilutes*. *Environmental Toxicology and Chemistry — Vol. 39, N° 3*: 587–594

McKinnon A.D., Duggan S., Nichols P.D., Rimmer M.A., Semmens G., Robino B., (2003). The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture* 223 (1–4), 89–106.

Miles J.K., Hua J., Sepulveda M.S., Krupke C.H., Hoverman J.T. (2018). Effects of Clothianidin on aquatic communities: evaluating the impacts of lethal and sublethal exposure to neonicotinoids. *PLOS ONE* 13(3)

Morrissey C.A., Mineau P., Devries J.H., Sanchez-Bayo F., Liess M., Cavallaro M.C., Liber K. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environ Int* 74:291–303.

Mörthl M., Takács E., Klátyik S., Székács A. (2019). Aquatic toxicity and loss of linear alkylbenzenesulfonates alone and in a neonicotinoid insecticide formulation in surface water. *Sci. Total Environ.* 652, 780–787

Mörthl M., Vehovszky A., Klátyik S., Takács E., Gyori J., Székács A. (2020). Neonicotinoids: Spreading, Translocation and Aquatic Toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health Review*

Nauen R., Jeschke P., Velten R., Beck M.E., Ebbinghaus-Kintscher U., Thielert W., Wolfel K., Haas M., Kunz K., Raupach G. (2014) Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. Pest Management Science.

Natsch A., Laue H., Haupt T., Von Niederhausern V., Sanders G. (2018). Accurate prediction of acute fish toxicity of fragrance chemicals with the RTgill-W1 cell assay. Environ. Toxicol. Chem. 37, 931–941.

Paffenöfer G.A.; Stearn D.E. (1988). Why is *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) restricted to nearshore environment? Mar. Ecol. Prog. Ser., 42, 33–38.

Payne M.F., Rippingale R.J., (2000). Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched Artemia. Aquaculture 188 (3–4), 353–361.

Pema P.J., Holli A.H., Wyatt R.H. (1996). Myelopathy Caused by Nitrous Oxide Toxicity. AJNR Am J Neuroradiol 19: 894-896.

Picone M., Bergamin M., Delaney E., Volpi Ghirardini A., Kusk K.O. (2018). Testing lagoonal sediments with early life stages of the copepod *Acartia tonsa* (Dana): an approach to assess sediment toxicity in the Venice Lagoon. Ecotoxicol. Environ. Saf. 147, 217–227.

Picone M., Distefano G.G., Marchetto D., Russo M., Vecchiato M., Gambaro A., Barbante C., Volpi Ghirardini A. (2021). Fragrance materials (FMs) affect the larval development of the copepod *Acartia tonsa*: An emerging issue for marine ecosystems. Ecotoxicology and Environmental Safety 215.

Raby M., Nowierski M., Perlov D., Zhao X., Hao C., Poirier D.G., Sibley P.K. (2018). Acute toxicity of 6 neonicotinoid insecticides to freshwater invertebrates. Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 37, n.5, pp 1430-1445.

Raby M., Zhao X., Hao C., Poirier D.G., Sibley P.K. (2018)^b. Relative chronic sensitivity of neonicotinoid insecticides to *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 15.

Rahman M.M., Abd El-Aty A.M., Choi J.H., Kim S.W., Shin S.C., Shim J.H. (2015). Consequences of the matrix effect on recovery of dinotefuran and its metabolites in green tea during tandem mass spectrometry analysis. *Food Chem*, 168, 445-453.

Raupach G., Almanza M.T., Haas M., Tapia E., Thielert W., Nauen R., 2012. Sivanto: profile of a new systemic insecticide. *Book of abstracts, Annual Meeting of the Entomological Society of America*, Knoxville, USA

Rubirola A., Boleda M.R., Galceran M.T. (2017). Multiresidue analysis of 24 Water Framework Directive priority substances by on-line solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry in environmental waters. *Journal of Chromatography* 1493, 64-75.

Sánchez-Bayo F. (2011). Impacts of agricultural pesticides on terrestrial ecosystems. In: *Ecological impacts of toxic chemicals*. Bentham Science Publishers Ltd, USA, pp 63–87

Sheets L.P. (2014). Imidacloprid. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, pp. 1000-1003.

Sotherton N., Holland J. (2002). Indirect effects of pesticides on farmland wildlife. In: *Handbook of ecotoxicology*, 2nd edn. CRC Press Ltd, USA, pp 1173–1196

Sousa J.C.G., Ribeiro A.R., Barbosa M.O., Robeiro C., Tiritan M.E., Pereira M.F.R., Silva A.M.T. (2019). Monitoring of the 17 EUWatch List contaminants of emerging concern in the Ave and the Sousa Rivers. *Science of the Total Environment* 649: 1083–1095.

Stara A., Pagano M., Capillo G., Fabrello J., Sandova M., Vazzana I., Zuskova E., Velisek J., Matozzo V., Faggio C. (2020). Assessing the effects of neonicotinoid insecticide on the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis*. *Sci. Total Environ.* 2020, 700, 134914.

Sumon K.A., Ritika A.K., Peeters E.T.H.M., Rashid H., Bosma R.H., Rahman S., Fatema K., Van den Brink P.J. (2018). Effects of Imidacloprid on the ecology of sub-tropical freshwater microcosms. *Environmental Pollution*, vol. 236, 432-441.

Sur R., Stork A. (2003). Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bull Insectol* 56:35–40.

Szczepaniec A., Creary S.F., Laskowski K.L., Nypop J.P., Raupp M.J. (2011). Neonicotinoid insecticide Imidacloprid causes outbreak of spider mites on elm trees in urban landscapes. *PLOS ONE*

Takács E., Klátyik S., Mörtl M., Rácz G., Kovács K., Darvas B., Székács A. (2017). Effects of neonicotinoid insecticide formulations and their components on *Daphnia magna*—The role of active ingredients and co-formulants. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 97, 885–900

Tennekes H.A. (2010). The significance of the Druckrey–Kupfmüller equation for risk assessment—the toxicity of neonicotinoid insecticides to arthropods is reinforced by exposure time. *Toxicology* 276, 1–4.

Tomizawa M., Casida J.E. (2009). Minor structural changes in nicotinoid insecticides confer differential subtype selectivity for mammalian nicotinic acetylcholine receptors. *British journal of Pharmacology*. 127; issue 1.

University of Herfordshire (2007). Pesticide Properties Database (PPDB).

Van Dijk T.C., Van Staalduinen M.A., Van del Sluijs J.P. (2013). Macro-invertebrate decline in surface water polluted with Imidacloprid. *PLOS ONE*, 8.

Velten R., Jeschke P., Haas M., Kunz K., 2013. Discovery of Sivanto, a new butenolide insecticide. *Book of Abstracts, American Chemical Society, Indianapolis, USA*

Wakita T. (2011). Molecular design of dinotefuran with unique insecticidal properties. *J. Agric. Food Chem.* 59,7: 2938-2942.

Wollenberger L., (2005). Toxicity Tests with Crustaceans for Detecting Sublethal Effects of Potential Endocrine Disrupting Chemicals. Ph.D. Thesis. Lyngby. Environment & Resources, Technical University of Denmark

Wood T.J., Goulson D. (2017). The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environ. Sci Pollut Res* 24:17285-17325.

Xu Y., Li X., Zhang W.L., Jiang H.T., Pu Y.J., Cao J.K., Jiang W.B. (2021). Zirconium (IV)-based metal-organic framework for determination of Imidacloprid and Thiamethoxam pesticides from fruits by UPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, Vol. 344.

Yamamoto I., Yabuta G., Tomizawa M., Saito T., Miyamoto T., Kagabu S. (1995). Molecular mechanism for selective toxicity of nicotinoids and neonicotinoids. *J. Pestic. Sci.* 20, 33–40.

Zhang J., Wu C., Pellegrini D., Romano G., Esposito F., Ianora A., Buttino I. (2013). Effects of different monoalgal diets on egg production, hatching success and apoptosis induction in a Mediterranean population of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *Aquaculture*, 400–401: 65–72.

Zhang J., Ianora A., Wu C., Pellegrini D., Esposito F., Buttino I. (2015). How to increase productivity of the copepod *Acartia tonsa* (Dana): effects of population density and food concentration. *Aquac Res*, 46: 2982–2990.

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

Zou E., Fingerman M. (1997). Synthetic estrogenic agents do not interfere with sex differentiation but do inhibit molting of the cladoceran *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58:596-602.

Appendice

Tabella I: Parametri di Ossigeno e pH dei test con Nitenpyram

	Iniziali			Finali		
	O ₂		pH	O ₂		pH
Controllo	8,78	103,2%	7,55			
10 ng L⁻¹	9	105,0%	7,95	8,65	108,0%	8,87
100 ng L⁻¹	9,0	104,9%	8,04	8,8	109,0%	8,64
1 µg L⁻¹	8,94	104,6%	8,07	8,39	105,0%	8,63
10 µg L⁻¹	8,91	104,1%	8,07	8,64	108,0%	9,55
100 µg L⁻¹	8,83	103,4%	8,06	8,68	104,0%	8,89

Tabella II: Parametri di Ossigeno e pH dei test con Dinotefuran

	Iniziali			Finali		
	O ₂		pH	O ₂		pH
Controllo	8,7	110,3%	8,19	8,57	111,5%	9,87
10 ng L⁻¹	8,3	104,8%	7,93	8,86	114,1%	9,37
100 ng L⁻¹	8,3	104,3%	7,92	9,1	116,7%	8,86
1 µg L⁻¹	8,34	104,4%	8,03	9,76	122,5%	8,96
10 µg L⁻¹	8,35	104,4%	8,23	8,86	114,4%	8,36
100 µg L⁻¹	8,38	104,7%	8,29	6,32	81,4%	8,13

Tabella III: Parametri di Ossigeno e pH dei test con Flupyradifurone

	Iniziali			Finali		
	O ₂		pH	O ₂		pH
Controllo				9,32	116,1%	8,78
10 ng L⁻¹	7,12	91,2%	7,65	9,41	117,2%	8,71
100 ng L⁻¹	7,5	92,7%	7,81	9,3	111,9%	9,57
1 µg L⁻¹	7,48	92,5%	7,85	9,74	117,3%	9,20
10 µg L⁻¹	7,55	93,0%	7,89	8,85	104,6%	8,75
100 µg L⁻¹	7,69	94,4%	7,89	5,26	64,3%	7,15

Tabella IV: Parametri di Ossigeno e pH dei test con Diclorofenolo

	Iniziali			Finali		
	O ₂		pH	O ₂		pH
Controllo	8,79	112%	8,03	10,28	130%	10,14
25	7,54	94%	8,26	10,29	129%	10,24
50	7,6	94%	8,34	10,1	126%	10,20
100	7,81	95%	8,32	9,35	116%	8,93
200	7,83	95%	8,34	11,89	147%	9,18
400	8,1	98%	8,35			

Tabella V: Test con Nitenpyram.

		Uova		Naupli	Copepoditi	LDR	ELS-mort.	H	LDR norm.
		t0	t5						
Controllo	C1	42	5	19	6		0,32	0,88	
	C2	59	4	14	27	0,659	0,25	0,93	1,15
	C3	56	2	5	20	0,800	0,54	0,96	1,40
	C4	50	12	9	8	0,471	0,55	0,76	0,82
	C5	43	10	10	17	0,630	0,18	0,77	1,10
	C6	49	11	16	7	0,304	0,39	0,78	0,53
0.01 µg/L	R1	71	13	17	15	0,469	0,45	0,82	0,82
	R2	58	5	17	15	0,469	0,40	0,91	0,82
	R3	51	4	22	10	0,313	0,32	0,92	0,55
	R4	64	11	6	17	0,739	0,57	0,83	1,29
	R5	57	12	14	23	0,622	0,18	0,79	1,09
	R6	61	4	16	20	0,556	0,37	0,93	0,97
0.1 µg/L	R1	60	13	21	9	0,300	0,36	0,78	0,52
	R2	54	9	6	19	0,760	0,44	0,83	1,33
	R3	61	13	5	11	0,688	0,67	0,79	1,20
	R4	54	6	11	12	0,522	0,52	0,89	0,91
	R5	46	9	9	17	0,654	0,30	0,80	1,14
	R6	55	12	5	21	0,808	0,40	0,78	1,41
1 µg/L	R1	38	8	7	11	0,611	0,40	0,79	1,07
	R2	68	9	27	16	0,372	0,27	0,87	0,65
	R3	41	3	8	14	0,636	0,42	0,93	1,11
	R4	47	5	24	5	0,172	0,31	0,89	0,30
	R5	52	8	9	11	0,550	0,55	0,85	0,96
	R6	55	7	19	11	0,367	0,38	0,87	0,64
10 µg/L	R1	58	7	38	5	0,116	0,16	0,88	0,20
	R2	48	7	20	7	0,259	0,34	0,85	0,45
	R3	56	5	16	24	0,600	0,22	0,91	1,05
	R4	50	9	22	9	0,290	0,24	0,82	0,51
	R5	52	6	18	4	0,182	0,52	0,88	0,32
	R6	42	7	15	12	0,444	0,23	0,83	0,78
100 µg/L	R1	61	4	34	1	0,029	0,39	0,93	0,05
	R2	52	15	20	0	0,000	0,46	0,71	0,00
	R3	53	8	27	0	0,000	0,40	0,85	0,00
	R4	56	4	23	0	0,000	0,56	0,93	0,00
	R5	51	9	27	0	0,000	0,36	0,82	0,00
	R6	54	5	27	0	0,000	0,45	0,91	0,00

t0=inizio test; t5= fine test, a 5 giorni; C= replica del controllo; R*= numero di replica; LDR-norm=LDR normalizzato al controllo

Tab.VI: Test con Dinotefuran.

		Uova		Naupli	Copepoditi	LDR	ELS-mort.	H	LDR norm.
		t0	t5						
Controllo	C1	60	12	16	19	0,543	0,27	0,80	1,36
	C2	49	7	13	19	0,594	0,24	0,86	1,49
	C3	52	7	17	9	0,346	0,42	0,87	0,87
	C4	46	3	23	15	0,395	0,12	0,93	0,99
	C5	69	11	38	5	0,116	0,26	0,84	0,29
	C6	54	5	15	10	0,400	0,49	0,91	1,00
0.01 µg/L	R1	68	7	23	23	0,500	0,25	0,90	1,25
	R2	55	6	23	11	0,324	0,31	0,89	0,81
	R3	70	8	29	12	0,293	0,34	0,89	0,73
	R4	70	5	25	12	0,324	0,43	0,93	0,81
	R5	74	7	22	24	0,522	0,31	0,91	1,31
	R6	65	9	25	10	0,286	0,38	0,86	0,72
0.1 µg/L	R1	68	6	21	24	0,533	0,27	0,91	1,34
	R2	72	11	35	18	0,340	0,13	0,85	0,85
	R3	58	5	23	5	0,179	0,47	0,91	0,45
	R4	78	7	42	12	0,222	0,24	0,91	0,56
	R5	59	7	21	18	0,462	0,25	0,88	1,16
	R6	75	14	32	16	0,333	0,21	0,81	0,84
1 µg/L	R1	63	4	27	13	0,325	0,32	0,94	0,81
	R2	60	6	5	25	0,833	0,44	0,90	2,09
	R3	52	3	20	10	0,333	0,39	0,94	0,84
	R4	75	1	22	16	0,421	0,49	0,99	1,06
	R5	60	5	28	9	0,243	0,33	0,92	0,61
	R6	48	8	12	22	0,647	0,15	0,83	1,62
10 µg/L	R1	55	5	43	0	0,000	0,14	0,91	0,00
	R2	38	7	18	0	0,000	0,42	0,82	0,00
	R3	45	2	25	3	0,107	0,35	0,96	0,27
	R4	53	2	23	5	0,179	0,45	0,96	0,45
	R5	74	7	36	2	0,053	0,43	0,91	0,13
	R6	74	6	45	1	0,022	0,32	0,92	0,05
100 µg/L	R1	53	1	29	0	0,000	0,44	0,98	0,00
	R2	58	1	29	0	0,000	0,49	0,98	0,00
	R3	48	4	37	0	0,000	0,16	0,92	0,00
	R4	30	2	21	0	0,000	0,25	0,93	0,00
	R5	46	2	32	0	0,000	0,27	0,96	0,00
	R6	42	3	21	0	0,000	0,46	0,93	0,00

t0=inizio test; t5= fine test, a 5 giorni; C= replica del controllo; R*= numero di replica; LDR-norm=LDR normalizzato al controllo

Tab.VII: Test con Flupyradifurone.

		Uova		Naupli	Copepoditi	LDR	ELS-mort.	H	LDR norm.
		t0	t5						
Controllo	C1	48	0	30	8	0,211	0,21	1,00	0,56
	C2	64	4	24	25	0,510	0,18	0,94	1,36
	C3	57	4	20	20	0,500	0,25	0,93	1,33
	C4	73	2	29	23	0,442	0,27	0,97	1,18
	C5	93	3	33	28	0,459	0,32	0,97	1,22
	C6	74	0	45	7	0,135	0,30	1,00	0,36
0.01 µg/L	R1	81	3	50	6	0,107	0,28	0,96	0,28
	R2	78	3	73	3	0,039	-0,01	0,96	0,10
	R3	73	4	47	6	0,113	0,23	0,95	0,30
	R4	83	2	54	8	0,129	0,23	0,98	0,34
	R5	54	1	21	15	0,417	0,32	0,98	1,11
	R6	73	5	43	12	0,218	0,19	0,93	0,58
0.1 µg/L	R1	40	0	29	2	0,065	0,23	1,00	0,17
	R2	63	0	39	9	0,188	0,24	1,00	0,50
	R3	76	2	46	16	0,258	0,16	0,97	0,69
	R4	64	0	45	4	0,082	0,23	1,00	0,22
	R5	59	4	42	3	0,067	0,18	0,93	0,18
	R6	52	3	29	7	0,194	0,27	0,94	0,52
1 µg/L	R1	62	6	36	4	0,100	0,29	0,90	0,27
	R2	72	3	24	24	0,500	0,30	0,96	1,33
	R3	58	1	45	0	0,000	0,21	0,98	0,00
	R4	74	1	43	0	0,000	0,41	0,99	0,00
	R5	45	3	35	3	0,079	0,10	0,93	0,21
	R6	51	2	32	1	0,030	0,33	0,96	0,08
10 µg/L	R1	48	2	33	0	0,000	0,28	0,96	0,00
	R2	73	5	55	0	0,000	0,19	0,93	0,00
	R3	61	1	50	0	0,000	0,17	0,98	0,00
	R4	66	0	57	0	0,000	0,14	1,00	0,00
	R5	75	2	48	0	0,000	0,34	0,97	0,00
	R6	54	2	37	0	0,000	0,29	0,96	0,00
100 µg/L	R1	52	1	8	0	0,000	0,84	0,98	0,00
	R2	55	2	14	0	0,000	0,74	0,96	0,00
	R3	56	3	6	0	0,000	0,89	0,95	0,00
	R4	55	1	0	0	\	1,00	0,98	\
	R5	60	1	15	0	0,000	0,75	0,98	0,00
	R6	68	1	2	0	0,000	0,97	0,99	0,00

t0=inizio test; t5= fine test, a 5 giorni; C= replica del controllo; R*= numero di replica; LDR-norm=LDR normalizzato al controllo