

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Ambientali (*classe* LM-75)

Valutazione e gestione dei sistemi ambientali



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

Tesi di Laurea Magistrale

# Valutazione della tossicità di prodotti commerciali per la pulitura di materiali lapidei

**Relatore**

Prof. Marco Picone

**Laureando**

Riccardo De Riva

Matricola 865956

**Anno Accademico**

2020 / 2021



## Sommario

Introduzione .....	1
Approccio sperimentale .....	11
.....	18
Materiali e metodi.....	19
Metodi utilizzati nel livello I – tossicità acuta .....	20
Livello I – metodi per le acque dolci.....	20
Livello I – metodi per le acque salate e salmastre .....	25
Metodi utilizzato nel livello II – tossicità a lungo termine (sub-cronica e cronica).....	27
Livello II – metodi per acque dolci .....	27
Risultati.....	32
Risultati per il livello I – tossicità acuta .....	32
Livello I – risultati per le acque dolci.....	32
Livello I – risultati per le acque salate .....	33
Risultati per il livello II – tossicità a lungo termine (sub-cronica e cronica).....	37
Discussione .....	42
Discussione per il livello I – tossicità acuta .....	43
Livello I – discussione per le acque dolci.....	43
Livello I – discussione per le acque salate .....	43
Discussione per il livello II – tossicità a lungo termine (sub-cronica e cronica).....	44
Valutazione comparativa della Pappetta AB57 rispetto alla tossicità del cloruro di benzalconio .....	45
Conclusione .....	48
Bibliografia.....	49
Allegati.....	59
Allegato 1 – medium acquoso ricostruito per <i>P. subcapitata</i> ((Korshikov) F.Hindák 1990).....	59
Allegato 2 – mantenimento delle colture di <i>P. subcapitata</i> ((Korshikov) F.Hindák 1990) da utilizzare come alimento per <i>D. magna</i> (Straus, 1820).....	60
Allegato 3 – composizione acqua dolce ricostruita “M7” per test con <i>D. magna</i> (Straus, 1820) .....	61
Allegato 4 – composizione acqua salata ricostruita “ASTM” .....	63
Allegato 5 – composizione acqua ricostruita “f/2” .....	64
Allegato 6 – composizione acqua ricostruita “Medium al 20%” per test con <i>Acartia (Acanthacartia) tonsa</i> (Dana, 1849) .....	66
Allegato 7 – composizione acqua ricostruita “Medium Radix” .....	67
Allegato 8 – curve d’inibizione relative al test con l’alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ((Korshikov) F.Hindák 1990) .....	68
Allegato 9 – risultati del test di tossicità acuta su <i>D. magna</i> (Straus, 1820).....	71

Allegato 10 – curve d’inibizione relative al test con l’alga <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Butcher, 1959).....	72
Allegato 11 – curve d’inibizione relative al test con l’alga <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (Bohlin, 1898).....	75
Allegato 12 – dati estesi relativi al test di tossicità acuta su <i>Acartia (Acanthacartia) tonsa</i> (Dana, 1849) .	79
Allegato 13 – risultati estesi dati dall’elaborazione statistica ANOVA a una via per il test con <i>R. auricularia</i> (Linnaeus, 1758) .....	80
Allegato 14 – dati estesi relativi al test di tossicità cronica su <i>D. magna</i> (Straus, 1820).....	81
Allegato 15 – elaborazione statistica estesa per i dati relativi al test cronico con <i>D. magna</i> (Straus, 1820) .....	83



## Introduzione

Il patrimonio architettonico e artistico viene spesso definito come “eredità culturale”. La parola “eredità” deriva dalle antiche parole francesi “*iritage*”, “*eritage*” o “*héritage*”, che significano “ciò che è ereditato”, ovvero che arriva dal passato per qualcuno di specifico (un parente, solitamente). Nel tempo questo concetto si è modificato, prendendo in considerazione anche la futuribilità e il carattere pubblico della tematica (Bi, Vanneste, & Van Der Borg, 2016).

L'importanza di un'efficace conservazione dei beni architettonici e artistici viene colta dalla società umana solo a partire dal XIX secolo, quando in qualche modo si concretizza in agenzie e società civili specializzate, che fanno nascere le figure di esperti estetici e tecnici (Smith J. , 2015), fino ad arrivare ai più recenti organismi internazionali, come l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'educazione, la scienza e la cultura (UNESCO) e l'*International Council on Monuments and Sites (ICOMOS)* (Jokilehto, 1999; Choay, 2001; Smith L. , 2006; Waterton, Smith, & Campbell, 2006). Il valore culturale aggiunto che si ottiene da una conservazione efficace del patrimonio artistico, oltre che essere riconosciuto dalle istituzioni e dagli specialisti, è diventato parte del senso comune a cominciare dagli anni '80: in questo periodo la tutela dei beni culturali, di paesaggio e di comunità hanno visto un grande sviluppo anche per quanto riguarda l'interesse accademico (Von Droste, Plachter, & Rossler, 1995; Munjeri, 2004; Chung & Kim, 2010).

Proteggere e promuovere l'eredità culturale, in ogni sua sfaccettatura, sono diventate dunque delle priorità per le politiche culturali europee e internazionali, soprattutto negli ultimi anni (Ott, Dagnino, & Pozzi, 2015).

La conservazione dei beni prende forma nella seguente definizione: “Col restauro si comprendono tutti i tipi di interventi che hanno l'obiettivo di conservare e trasmettere al futuro tutte le opere di interesse ambientale, artistico e storico, facilitandone l'ammirazione e l'apprezzamento ma senza cancellare le tracce del passaggio del tempo, che è ineluttabile.” (Carbonara, 2012). In particolar modo, nel presente lavoro verranno presi in considerazione i possibili impatti di un prodotto utilizzato nel restauro di edifici, opere architettoniche e statue esterne, ovvero esposte alle azioni di danneggiamento degli agenti atmosferici, come anche al degrado dovuto dall'attività biotica e antropica stessa (a esempio si considerino inquinanti e polveri sottili).

Esiste una categoria di impatti, dovuta ai fattori più o meno naturali, quali gli agenti atmosferici (fenomeni di precipitazione e venti), l'acqua (sia per l'azione meccanica del moto ondoso che per l'idratazione dei sali presenti nelle matrici rocciose che costituiscono il patrimonio artistico), l'insolazione e altri che agiscono praticamente ininterrottamente su edifici e opere d'arte e che sono capaci di danneggiamenti considerevoli, sia nel breve che nel lungo periodo.

Come prima va chiaramente ricordata l'alterazione che viene messa in pratica dal soffiare dei venti. Questi esercitano un'erosione di tipo meccanico grazie alle particelle di sabbia che generalmente prendono in carico, che collidono con le superfici degli esterni, causando una lenta ma inevitabile rimozione di materiale (Al-Agha, 2006).

Inoltre, è stato dimostrato che lo stress termico a cui vengono sottoposti gli strati esterni di pietra può essere la causa di una serie di fenomeni di danneggiamento, sia fisico, come l'incurvamento, che chimico, a esempio l'indebolimento della struttura (Hall, 2011). In particolar modo, rocce carbonatiche, costituite in prevalenza dal minerale calcite ( $\text{CaCO}_3$ ), sono specialmente soggette all'alterazione termica (Nye, 1972). Le fluttuazioni della temperatura al di sopra e al di sotto del limite di congelamento dell'acqua possono anche tradursi in fenomeni localizzati di crioclastismo (Benavente, Martinez-Martinez, Cueto, Ordoñez, & Garcia-del-Cura, 2018): l'acqua solidifica espandendosi all'interno dei pori e delle fratture, danneggiando fisicamente il substrato.

È ormai chiaro che la vicinanza di Venezia all'acqua, in particolar modo a un'acqua che è per altro salmastra, sia di fondamentale importanza. È infatti noto come i sali siano causa del deterioramento della pietra che costituisce i monumenti: i sali solubili presenti nella matrice pietrosa, a contatto con l'acqua vengono idratati e migrano così verso la superficie, dove ricristallizzano (Morabito, et al., 2013). Il fenomeno di cristallizzazione esercita una pressione sui pori del materiale, che va dunque incontro ad alterazione fisica, quale la fratturazione, in maniera analoga al crioclastismo. Come si vedrà in seguito per il danneggiamento biologico, diversi cicli di idratazione e cristallizzazione possono portare a un danno considerevole (Colston, Watt, & Munro, 2001).

Tutti questi fenomeni sono, in qualche modo, intrinsecamente incontrastabili (non si può impedire al vento di soffiare o al sole di splendere) ma la definizione di restauro lascia spazio a una gran varietà di azioni che si possono intraprendere, per mantenere comunque l'opera apprezzabile nella sua interezza nel corso del tempo. Un ruolo fondamentale è ricoperto dalle iniziative atte a preservare dal degrado quei materiali che costituiscono la struttura fisica dell'opera. Sotto questa luce, il restauro deve considerare sia le peculiarità storiche dei materiali e delle tecniche di costruzione ma anche i limiti imposti dalle caratteristiche chimico-fisiche dei materiali stessi e dal progresso nello sviluppo di tecniche e prodotti (Carbonara, 2012). Chiaramente, è fondamentale che tutti gli esperti dialoghino per ottenere il miglior risultato.

Queste azioni di mantenimento dell'opera, citate giusto poco sopra, sono importanti quando c'è la necessità di operare delle pulizie delle superfici. Nell'area del centro storico di Venezia (Figura 1), è ben rappresentato il patrimonio artistico architettonico, con palazzi e statue antichi anche 500 anni (chiarissimo esempio è la celebre Basilica di San Marco [Figura 2], il cui inizio della costruzione risale addirittura al 1063).



Figura 1: veduta aerea del centro storico di Venezia, grazie alla quale si può notare la moltitudine di palazzi e monumenti che caratterizzano la città e che sono oggetto di conservazione e restauro, essendo patrimonio artistico e culturale. Da <https://www.tripsavvy.com/venice-travel-guide-and-attractions-1548175> (modificato).



Figura 2: facciata ovest della Basilica di San Marco, a Venezia. Da Zairon - Own work, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=73966842> (modificato).



Qui, la congiunzione di salsedine e vicinanza col porto industriale di Marghera (Figura 3), dove gli eventi di combustione non mancano, genera non pochi fenomeni di copertura delle facciate o delle statue stesse, a opera delle cosiddette “croste nere” (Pozo-Antonio, Rivas, López, Fiorucci, & Ramil, 2016) e delle altre deposizioni di particolato atmosferico (Morabito, et al., 2013) per via del consistente traffico marittimo.



*Figura 3: foto aerea del porto industriale di Marghera, situato a pochi chilometri dal centro storico di Venezia e che si affaccia sulla stessa omonima Laguna. Sono ben visibili tutti gli impianti, dalla cui attività ingenti quantità di particolato vengono prodotte. Da Marc Ryckaert - Own work, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=45782606> (modificato).*

Le deposizioni atmosferiche in senso ampio sono state recentemente prese in considerazione e studiate sia per quanto riguarda l’impatto ambientale ma anche per quello relativo a opere architettoniche e artistiche (Hatchfield & Carpenter, 1986; Norwich, 1991; Loupa, Charpantidou, Karageorgos, & Rapsomanikis, 2007; Ozga, et al., 2011).

Le croste nere consistono in un accumulo scuro e coerente di materiale sulle superfici esterne (Figura 4) e si manifestano in particolar modo sulla parte emersa e relativamente riparata degli edifici, dove non agisce l’azione meccanica dell’acqua che, sia col moto ondoso che con le piogge intense, le rimuoverebbe. È facile immaginare come i muri degli edifici nelle strette calli della città lagunare siano un valido sito perché queste si sviluppino.

Gli studi sulla formazione delle croste si sono focalizzati quasi esclusivamente su rocce sedimentarie carbonatiche e marmi (Brimblecombe & Grossi, 2007), confermando che queste compaiono grazie all’interazione tra il substrato roccioso e l’inquinamento atmosferico, in particolar modo diossido di zolfo



Figura 4: un sottile strato di croste nere formato su una pietra carbonatica facente parte di muro di una chiesa nella città di Fécamp (Francia). Da (Genot, et al., 2020) (modificato).

(SO<sub>2</sub>), diossido di carbonio (CO<sub>2</sub>) e ossidi di mono-azoto (NO<sub>x</sub>) (Schiavon, 2000; Brimblecombe & Grossi, 2007). Queste reazioni hanno come prodotto finale gesso, dalla struttura cristallina e dalle proprietà ben diverse da quelle del marmo (Rivas, Pozo, & Paz, 2014), in generale molto più vulnerabile e soggetto ad alterazione se in contatto con acqua (Mróz & Mucha, 2018; Sijiang, Chongyang, Yushun, & Meng, 2020). Viene dunque indiscutibilmente minata la stabilità dell'edificio o dell'opera in generale.

È comprovato comunque che non solo i marmi, che compongono la maggioranza degli edifici veneziani, siano soggetti alla formazione di croste nere ma che queste possano alterare anche substrati ignei (gabbro, sienite e granito) quando in atmosfera è presente diossido di zolfo (SO<sub>2</sub>) a concentrazioni superiori a 100 ppm, solitamente dovute a immissioni da combustibili fossili (Simão, Ruiz-Agudo, & Rodriguez-Navarro, 2006; McAlister, Smith, & Török, 2008).

Un altro tipo di degrado cui gli esterni possono andare incontro è quello operato biologicamente, definito "biodeterioramento", cioè il cambiamento tangibile nella struttura del materiale che costituisce l'opera dovuto principalmente all'azione biologica (Hueck, 1965; Miller, et al., 2012), quali sono generalmente la crescita di organismi come alghe, batteri o funghi.

Il tipo di danno biologico al patrimonio artistico e culturale può essere diviso e visto sotto due luci. Da un lato l'alterazione chimica messa in atto dalle sostanze secrete dagli organismi, che sono spesso acide o in grado di chelare ioni come il calcio, alterando così la struttura mineralogica del substrato e portando a fenomeni di neoformazione (spesso, anche in questo caso, di gesso) (Mohammadi & Krumbein, 2008). Dall'altra parte, è da considerare il danno fisico dato dalla vera e propria penetrazione delle strutture biologiche all'interno della pietra, quali radici o ife fungine, che sfruttano le già presenti fratture, allargandole. Quest'azione, insieme ai cicli di contrazione ed espansione dovuti ai cambiamenti di umidità e temperatura, fa sì che il processo di degrado sia fortemente velocizzato (Prieto & Silva, 2005).

Il più comune tipo di colonizzazione biologica, sia in generale che nello specifico caso veneziano, è quella operata dalle alghe (Grant, 1982), in particolare le clorofite (Macedo, Miller, Dionisio, & Saiz-Jimenez, 2009) (Figura 5). Secondi ma non meno importanti i cianobatteri (Figura 6), che mettono in atto le già descritte reazioni sulla superficie, coinvolgenti composti solforati ridotti, producendo solfati e degradando le rocce



Figura 5: alghe cresciute a ridosso degli edifici a Venezia. Nella città lagunare il fenomeno è molto comune, sostenuto dalle maree e dal moto ondoso dovuto all'intenso traffico marittimo. Da <https://www.domusweb.it/en/design/gallery/2020/04/07/the-polluting-algae-in-the-venetian-lagoon-become-stamps.html> (modificato).



Figura 6: esempio di fioritura di cianobatteri, che colora l'acqua del caratteristico verde. Esse avvengono in particolari condizioni climatiche, quando le temperature sono sufficientemente alte. È chiaro come risulti facile per i cianobatteri andare a coprire qualsiasi superficie a contatto con l'acqua, comprese quelle di edifici e patrimonio culturale. Da <https://klamathalerts.com/2020/05/19/be-aware-of-cyanobacteria-harmful-algae-blooms-this-summer/> (modificato).

carbonatiche, sulle quali questo processo avviene più facilmente che nelle altre, in gesso (Flores, Lorenzo, & Gomez-Alarcon, 1997; Pozo-Antonio, Rivas, López, Fiorucci, & Ramil, 2016). Questi microrganismi sono i responsabili delle patine, generalmente di intensa colorazione verde o rossa, che ricoprono le superfici adiacenti all'acqua, dove l'umidità è elevata (Crispim, Gaylarde, & Gaylarde, 2003; Prieto & Silva, 2005; Gaylarde, Ortega-Morales, & Bartolo-Pérez, 2007; Silva, Aira, Martínez-Cortizas, & Prieto, 2009; Macedo, Miller, Dionisio, & Saiz-Jimenez, 2009), requisito fondamentale per la loro proliferazione.

Alla luce della sopracitata definizione di "conservazione", si capisce come la pulitura del patrimonio culturale, in particolar modo quello esterno, sia una delle azioni fondamentali da mettere in pratica per far sì che tale resti apprezzabile nel tempo (Pozo-Antonio, Rivas, López, Fiorucci, & Ramil, 2016). Proprio per questo motivo, la pulizia è atta a rimuovere le coperture di sporco nel modo più delicato possibile, lasciando intatto il substrato, essendo il più possibile selettivo per la sola parte che si vuole rimuovere, evitando che si creino oltretutto dei prodotti secondari indesiderati (Smith, Gomez-Heras, & McCabe, 2008; Doehne & Price, 2010). Anche in questo campo, i metodi possono venire divisi in varie categorie. Primi quelli meccanici, che includono la classica spazzola metallica e il disco rotante, anch'esso metallico, da far scorrere sulla superficie. Altri vedono l'impiego di acqua spruzzata a diverse pressioni ed eventualmente addizionata con delle microparticelle siliciche, in modo che queste ultime migliorino l'effetto abrasivo (Lazzarini & Tabasso Laurenzi, 1986).

Dall'altro lato, i metodi chimici, fondati sull'applicazione di soluzioni, solitamente alcaline o acide, per ottenere una reazione con la parte da rimuovere e facilitarne il distacco o produrne addirittura la dissoluzione completa (Lazzarini & Tabasso Laurenzi, 1986).

Per rimuovere le croste nere, si sono storicamente utilizzate una serie di sostanze acide, quali cloruro di idrogeno (HCl), fluoruro di idrogeno (HF), acido tetraossosolfurico (V) (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e acido etanoico (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) o

basiche come idrossido di sodio (NaOH) e idrossido di potassio (KOH) (Pozo-Antonio, Rivas, López, Fiorucci, & Ramil, 2016).

Da ultimo, va per lo meno citato il metodo di rimozione laser (Asmus, Murphy, & Munk, 1974), consistente nell'ablazione degli strati che si intendono distaccare utilizzando delle pulsazioni laser ad alta frequenza, dell'ordine almeno dei nanosecondi (Vázquez de Aldana, Moreno, & Roso, 2012).

Data l'alta aggressività dei prodotti chimici, un'alternativa, la Pappetta AB57, viene sviluppata dall'Istituto Superiore per la Conservazione e il Restauro (ISCR) di Roma, risultando essere molto efficiente per quanto riguarda la rimozione delle croste nere e la pulizia in generale, compresa la rimozione di eventuali colonizzazioni biologiche (Mora, Mora, & Philippot, 1984; Lazzarini & Tabasso Laurenzi, 1986; Stavroudis & Doherty, 2005; Pozo-Antonio, Ramil, Rivas, López, & Fiorucci, 2016).

La composizione della Pappetta AB57 viene riportata in Tabella 1; all'interno della quale rientra anche un sale

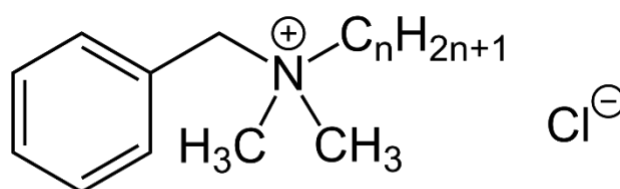
*Tabella 1: formulato commerciale consigliato per la Pappetta AB57, fornito insieme alla confezione. Tutte le masse dei componenti sono riferite a 1 L di acqua, nella quale vanno aggiunte secondo l'ordine in cui sono riportate. Di particolare interesse sarà il sale quaternario d'ammonio al 10%, approfondito in seguito.*

quaternario d'ammonio, il cloruro di benzalconio. Questa famiglia di composti organici, carichi positivamente, è molto utilizzata come disinfettanti, antimicrobici o tensioattivi e ricade tra le più

Composto	Quantità
Acqua	1 L
Bicarbonato d'ammonio ((NH <sub>4</sub> )HCO <sub>3</sub> )	30 g
Bicarbonato di sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	50 g
EDTA (sale bisodico)	25 g (ammesso fino a 125 g)
Sale quaternario d'ammonio al 10%	10 mL
Carbossimetilcellulosa	60 g
Ammoniaca (NH <sub>3</sub> )	Da aggiungere eventualmente per facilitare la rimozione di componenti grasse.
Trietanolamina (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub> )	

efficaci per la rimozione di cianobatteri dalle rocce carbonatiche (Nugari, Pietrini, Caneva, Imperi, & Visca, 2009). La struttura chimica generale è costituita da cloruri di alchilbenzil dimetil ammonio, in cui la catena alchilica può avere varie lunghezze e l'atomo di azoto è tetrasostituito e carico positivamente (Figura 7). La capacità antibatterica del composto viene dalla sua anfifilia: i siti idrofili interagiscono con la membrana batterica e al contempo quelli idrofobici penetrano nel doppio strato causando la lisi cellulare (Fazlara & Ekhtelat, 2012).

I composti quaternari d'ammonio, utilizzati sia nell'industria che in ambito domestico, finiscono



**n = 8, 10, 12, 14, 16, 18**

Figura 7: struttura chimica generale del cloruro di benzalconio. Da No machine-readable author provided. Jü assumed (based on copyright claims). - No machine-readable source provided. Own work assumed (based on copyright claims)., CC0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=29727055> (modificato).

spesso nel suolo e nelle acque dove, a causa nella loro tossicità per diverse specie, sia acquatiche che terrestri, compromettono tutti i processi naturali, come la biodegradazione (Lavorgna, Russo, D'Abrosca, Parrella, & Isidori, 2016). Il benzalconio cloruro è già stato rilevato in rifiuti ospedalieri in concentrazioni di 6 mg/L (Sütterlin, Alexy, & Kümmerer, 2008), in sedimenti in concentrazioni fino a 206 µg/kg (Ferrer & Furlong, 2002) e nonostante per le emissioni in acque superficiali si possa ipotizzare un effetto di diluizione che riduca la tossicità, questa non può comunque nel complesso venire esclusa. Infatti, si sa dalla bibliografia che, tra i tensioattivi, quelli cationici sono i più pericolosi per l'ambiente naturale (Ivanković & Hrenović, 2010) e in particolar modo, il cloruro di benzalconio è già stato testimoniato come tossico per i batteri *Aliivibrio fischeri* (Beijerinck, 1889) (Urbanczyk, Ast, Higgins, Carson, & Dunlap, 2007) e *Pseudomonas putida* ((Trevisan 1889) Migula 1895) (Sütterlin, Alexy, & Kümmerer, 2008), nonché per alghe d'acqua dolce come *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890) (Chen, et al., 2014) e salata, tra cui *Chaetoceros neogracile* (VanLandingham, 1968) e *Isochrysis galbana* (Parke, 1949) (Pérez, Fernández, & Beiras, 2009). È importante tenere presente che tutti questi studi si sono sempre concentrati sulla tossicità acuta del cloruro di benzalconio, tralasciando i possibili effetti cronici.

Si segnala inoltre come siano presenti degli studi che riguardano la possibile classificazione del benzalconio cloruro come agente con proprietà genotossiche, rilevate sia in cellule di mammiferi che di piante (Deutschle, Porkert, Reiter, Keck, & Riechelmann, 2006; Ferik, et al., 2007; Wu, et al., 2011).

Un recente studio (Lavorgna, Russo, D'Abrosca, Parrella, & Isidori, 2016) su due crostacei d'acqua dolce, *Ceriodaphnia dubia* (Richard, 1894) e *Daphnia magna* (Straus, 1820), indagante tossicità acuta (Tabella 2) e cronica (Tabella 3), rileva le seguenti soglie:

Tabella 2: valori di  $LC_{50}$  per *C. dubia* (Richard, 1894) e di  $EC_{50}$  per *D. magna* (Straus, 1820), espressi in µg/L, relativi ai test di tossicità acuta. I valori non in grassetto riportano i limiti di confidenza al 95%. Gli endpoint valutati sono stati rispettivamente la mortalità e l'assenza di movimento degli organismi. Da (Lavorgna, Russo, D'Abrosca, Parrella, & Isidori, 2016) (modificato).

<b><i>Ceriodaphnia dubia</i> 24 h</b>			<b><i>Daphnia magna</i> 48 h</b>		
<b>403,7</b>	265,2	614,7	<b>38,2</b>	33,7	43,2

Tabella 3: concentrazioni che hanno come effetto un'inibizione della riproduzione del 10% ( $EC_{10}$ ), 20% ( $EC_{20}$ ) e 50% ( $EC_{50}$ ), rispettivamente per *C. dubia* (Richard, 1894) dopo 7 giorni e per *D. magna* (Straus, 1820) dopo 21 giorni. Tutti i valori sono espressi in µg/L e quelli non in grassetto riportano i limiti di confidenza al 95%. Da (Lavorgna, Russo, D'Abrosca, Parrella, & Isidori, 2016) (modificato).

<b>EC</b>	<b><i>Ceriodaphnia dubia</i> 7 giorni</b>			<b><i>Daphnia magna</i> 21 giorni</b>		
$EC_{10}$	<b>43,97</b>	18,97	101,90	<b>1,29</b>	0,87	1,90
$EC_{20}$	<b>8,73</b>	2,94	19,23	<b>0,19</b>	0,09	0,33
$EC_{50}$	<b>3,39</b>	0,87	10,64	<b>0,06</b>	0,03	0,15

Anche la genotossicità viene presa in considerazione con un test di esposizione di 24 ore, basato sulla misura

delle rotture della catena nucleotidica e sul rilevamento di siti non rotti ma comunque labili (*Alkaline comet assay*, (Tice, et al., 2000)). I dati rilevati (Tabella 4) sono altrettanto interessanti, perché mettono in luce effettivamente la genotossicità del benzalconio cloruro in organismi esposti *in vivo*, cosa che tutti i precedenti test *in vitro* non erano stati in grado di fare univocamente (Hikiba, Watanabe, Barrett, & Tsutsui, 2005; Ferk, et al., 2007; Wu, et al., 2011; Dolan, Wheeler, & Burdock, 2013).

Tabella 4: stima dei valori (in ng/L) di No Observable Adverse Effect Concentration (NOAEC) e Lowest Observable Adverse Effect Concentration (LOAEC) derivate dal test di genotossicità alkaline comet assay (Tice, et al., 2000) dopo 24 ore di esposizione, confrontate coi valori (in ng/L) di No Observed Effect Concentration (NOEC) e Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) ottenuti dai test cronici con gli stessi organismi (7 giorni di esposizione per *C. dubia* [Richard, 1894] e 21 giorni di esposizione per *D. magna* [Straus, 1820]). Da (Lavorgna, Russo, D'Abrosca, Parrella, & Isidori, 2016) (modificato).

Soglia	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	<i>Daphnia magna</i>
NOEC	3300	70
LOEC	10000	220
NOAEC	0,4	0,04
LOAEC	4	0,4

È risultato chiaro che, in città come Venezia, dove la Pappetta AB57 viene spesso sfruttata, questa possa facilmente finire liberata in ambiente (D'Angelo, Cimino, & Accardo, 2012), non essendoci un vero e proprio protocollo vigente che regoli l'applicazione (per quanto esista un codice per la conservazione del patrimonio culturale (ICOMOS, 1964), che cita le buone norme di un trattamento di pulizia, che non deve modificare le caratteristiche dei materiali che ne vengono sottoposti, come il colore, la ruvidità o la riflettenza (Ricci, et al., 2020)) e soprattutto la rimozione, il trattamento e il controllo delle emissioni e del rifiuto chimico che si generano dopo l'utilizzo di questi prodotti, seppure si sappia che l'impatto ambientale va minimizzato (Ricci, et al., 2020).

Negli ultimi anni, come in altri settori, l'interesse per il progresso in direzione di una "green restoration" è cresciuto rapidamente, puntando a utilizzare tecnologie sempre più verdi sia per lo sviluppo dei prodotti che per la loro applicazione (Balliana, Ricci, Pesce, & Zendri, 2016); sta di fatto che attualmente manca un quadro generale per valutare la sostenibilità dei prodotti utilizzati nella conservazione del patrimonio culturale (Franzoni, Volpi, Bonoli, Spinelli, & Gabrielli, 2018; Semenzin, et al., 2019), in quanto il progredire delle tecnologie in questo campo è sempre e solo stato guidato dall'ottimizzazione a livello tecnico (Baglioni & Chelazzi, 2013).

Per analizzare la Pappetta AB57, viene proposta una valutazione degli effetti tossici nei confronti degli organismi acquatici, condotta secondo i principi del regolamento Europeo REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) (Commissione Europea, 2006) e del regolamento CLP (*Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures*) (Commissione Europea, 2008), i quali

riportano le linee guida per l'analisi e l'utilizzo di tutti i prodotti, sia come sostanze pure che quando utilizzati in miscele, valide sia per i produttori che per gli utilizzatori. Le valutazioni verranno estese in modo da comprendere anche l'ambiente di acqua salata e gli effetti a lungo termine.

Le suddette normative inoltre allineano il tipo di classificazione ed etichettatura europee con il sistema mondiale standardizzato *GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)*. Queste legislazioni, oltre a riportare le direttive per una corretta analisi di sicurezza chimica, incentivano a un approccio olistico per considerare come un punto fondamentale anche la sostenibilità dei prodotti che si considerano (Semenzin, et al., 2019). Gli impatti ambientali sono anche presi in considerazione dalla metodologia *TBL (Triple Bottom Line)*, insieme a quelli sociali ed economici (Elkington, 1999). Punto focale della *TBL* è il *life-cycle assessment*, che analizza l'intero ciclo di vita di un prodotto (dalla culla alla bara, *from cradle to grave*), valutando gli impatti sull'ambiente di ciascun passaggio e avendo come obiettivo ultimo quello di ridurre al minimo l'impronta ecologica del suddetto prodotto (Elkington, 1999).

La valutazione ambientale si delinea in quella che viene definita *Integrated Testing Strategy (ITS)*, uno schema gerarchico costituito da una serie di nodi, a ciascuno dei quali corrisponde una raccolta di dati inerenti alla classificazione della sostanza (Hengstler, et al., 2006; van Leeuwen, Patlewicz, & Worth, 2007).

Le procedure *ITS* prendono piede dall'emanazione del regolamento *REACH* (Jaworska, Gabbert, & Aldenberg, 2010), dove vengono indicate per un'adeguata analisi degli impatti sulla salute umana e dell'ambiente. La metodologia *ITS* deve valutare un prodotto basandosi su tre punti principali (Semenzin, et al., 2019):

1. La sostanza deve allinearsi con le normative europee vigenti riguardo la sicurezza;
2. I test di tossicità devono simulare nel modo migliore possibile delle situazioni reali e plausibili, considerando l'intero ciclo di vita della sostanza;
3. Includere la possibilità di raggruppare le sostanze sulla base della loro similarità.

Un aggiornamento della prassi porta allo sviluppo di una struttura a più livelli e ben definita, per passare dai test di tossicità più generici, come quelli *in vitro* a breve termine, a saggi più specifici, a esempio dei complessi studi di simulazione ambientale per valutare l'ecotossicità (Oomen, et al., 2014). Resta il fatto che l'approccio, in particolar modo riguardo le vie di esposizione del tossico verso le componenti dell'ecosistema, vada di volta in volta calibrato sul caso specifico.

In particolar modo, risulta importante raccogliere dati e informazioni riguardo sia la salute umana che relative agli impatti ambientali, effettuando misure sia al momento dell'utilizzo (Gherardi, Gordiani, & Proietto, 2006) che monitorando i rilasci per tutto il ciclo di vita del prodotto (Zuin, Gaiani, Ferrari, & Golanski, 2014; Semenzin, et al., 2019).

La tossicità deriva dalle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza (o del prodotto), che le consentono di procurare effetti negativi sugli organismi con cui interagisce, dipendentemente dalla quantità del

contaminante che entra in contatto effettivo con gli organismi, dalle caratteristiche ambientali (condizioni di esposizione, durata e frequenza possono variare a seconda dell'area o del periodo di tempo che si considera) e dalle caratteristiche proprie del bersaglio, in quanto esistono organismi più o meno sensibili e con differenti capacità di detossificazione.

Il biota in generale deve sostenere dei costi, che sono essenziali alla vita, spendendo energia sia per quanto riguarda il mantenimento del metabolismo basale e la riparazione dei tessuti che per tutte le attività come il foraggiamento e la digestione, nonché, quando possibile, investendone una parte per la crescita e la riproduzione (Weiner, 1992). Quando, per un qualsiasi motivo, la quantità di energia è limitata, le richieste di energia per il mantenimento del metabolismo basale essenziale e la crescita entrano in competizione e dato che il primo è fondamentale per mantenere in vita l'organismo, tutti gli altri usi energetici vengono limitati (McNab, 2002). In queste condizioni, gli organismi esposti a stress di tipo chimico possono andare incontro a maggiori spese energetiche per ridurre l'impatto dei tossici (Narváez, Ríos, Píriz, Sanchez-Hernandez, & Sabat, 2016), che possono compromettere l'efficienza di assimilazione energetica (Karasov & Martínez del Rio, 2007), modificare l'ambiente e conseguentemente l'accessibilità alle fonti di energia (Hopkins, et al., 2004) oppure ancora imporre stress diretto sull'organismo, alterandone i livelli di metabolismo e la normale fisiologia (Raimondo, Rowe, & Congdon, 1998).

Una specie che viene scelta come indicatrice per le analisi deve soddisfare una serie di caratteristiche fondamentali, permettendo così di avere dei risultati accurati e adeguati agli obiettivi dello studio. Questa selezione deve avvenire considerando il tipo di ambiente nel quale avviene l'esposizione, il tipo di contaminazione (comprese la dose del contaminante e le sue caratteristiche chimico-fisiche) e l'obiettivo ultimo dell'indagine.

È necessario che l'indicatore scelto abbia una certa rilevanza ecologica per l'ambiente che si considera e non sia un organismo di nicchia all'interno della rete trofica, che sia semplice da stabilire e mantenere in laboratorio, sensibile a più contaminanti e che abbia un ciclo di vita abbastanza breve da consentire di mettere in pratica anche dei test cronici. Deve quindi, praticamente, fornire delle risposte il più possibile inequivocabili e rapide (Mariani, et al., 2006; Pane, et al., 2008).

Alla luce di tutte queste assunzioni e necessità non indifferenti, risulta chiaro come non sia facile identificare una singola specie che possa sopperire a tutte. Per ovviare a questo inconveniente, si utilizzeranno più specie, in modo da coprire il più alto *range* di variabilità ambientale e di diversità biologica (concordemente al punto 2 dell'ITS).

#### Approccio sperimentale

Nell'ambito di questo studio, alcuni organismi target verranno esposti a delle concentrazioni note di sostanza tossica (la Pappetta AB57 od occasionalmente il suo solo biocida, il cloruro di benzalconio) e ne verranno



valutate le risposte (inibizione della crescita, mortalità, riproduzione) per definire il grado di tossicità del prodotto.

Sono state allestite diverse batterie di test per ambienti di acqua dolce e acqua salata, al fine di ottenere una valutazione più esaustiva dei possibili effetti. Dei test protocollari sono esplicitamente indicati nelle normative *REACH* e *CLP* per quanto riguarda la matrice d'acque dolci mentre mancano completamente, in queste direttive, indicazioni per il comparto salmastro. Si opterà dunque, con l'obiettivo di ottenere uno spettro di risultati il più completo possibile, per affiancare ai test dulciacquicoli anche quelli standard in uso per le acque salate. Ciò è di fondamentale importanza per due motivi: per prima cosa, risulta chiaro come il recettore finale di moltissimi inquinanti sia, molto spesso, un corpo d'acqua salata e dunque la significatività ecologica per questi ultimi è elevata; in secondo luogo, è interessante avere un confronto tra le due tipologie di ambienti visto che, in matrice salata, entrano in gioco più variabili, date dalla presenza di sali disciolti, che fungendo da leganti e chelanti, possono in qualche modo modificare la biodisponibilità del tossico (Bielmyer, Bullington, Decarlo, Chalk, & Smith, 2012). Per gli ambienti di acqua dolce sono stati utilizzati metodi già previsti dai Regolamenti *REACH* e *CLP*, tra cui i test con microalghe, il test acuto con *Daphnia magna* (Straus, 1820) e il test cronico con *Daphnia magna* (Straus, 1820) (sebbene a quest'ultimo si faccia raramente riferimento), cui è stato aggiunto il test di sviluppo larvale con molluschi gasteropodi, *Radix auricularia* (Linnaeus, 1758).

Nello specifico degli organismi autotrofi, sono stati applicati test su tre diverse specie di microalghe. In generale, le microalghe vengono considerate come un importante comparto per la produzione di biomasse, data la loro efficienza fotosintetica, il tasso di crescita molto rapido e l'alto rapporto resa/superficie (Patil, Tran, & Giselrod, 2008; Clarens, Resurreccion, White, & Colosi, 2010; Zou, Wu, Yang, Li, & Tong, 2010).

Iniziando a considerare il comparto delle acque dolci, si è utilizzata la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) (Hindark, 1990) (*Chlorophyta, Selenastraceae*) (Figura 8), conosciuta anche come *Raphidocelis subcapitata* o *Selenastrum capricornutum* (Krienitz, Bock, Nozaki, & Wolf, 2011). Questa è una comune microalga dulciacquicola che colonizza quasi tutti gli specchi d'acqua e per tale motivo è probabilmente l'alga per analisi biologiche più diffusamente usata in tutto il mondo (Heijerick, De Schamphelaere, & Janssen, 2002), tanto da essere oggetto di una procedura standard internazionale, la ISO 8692 (ISO, 2012).

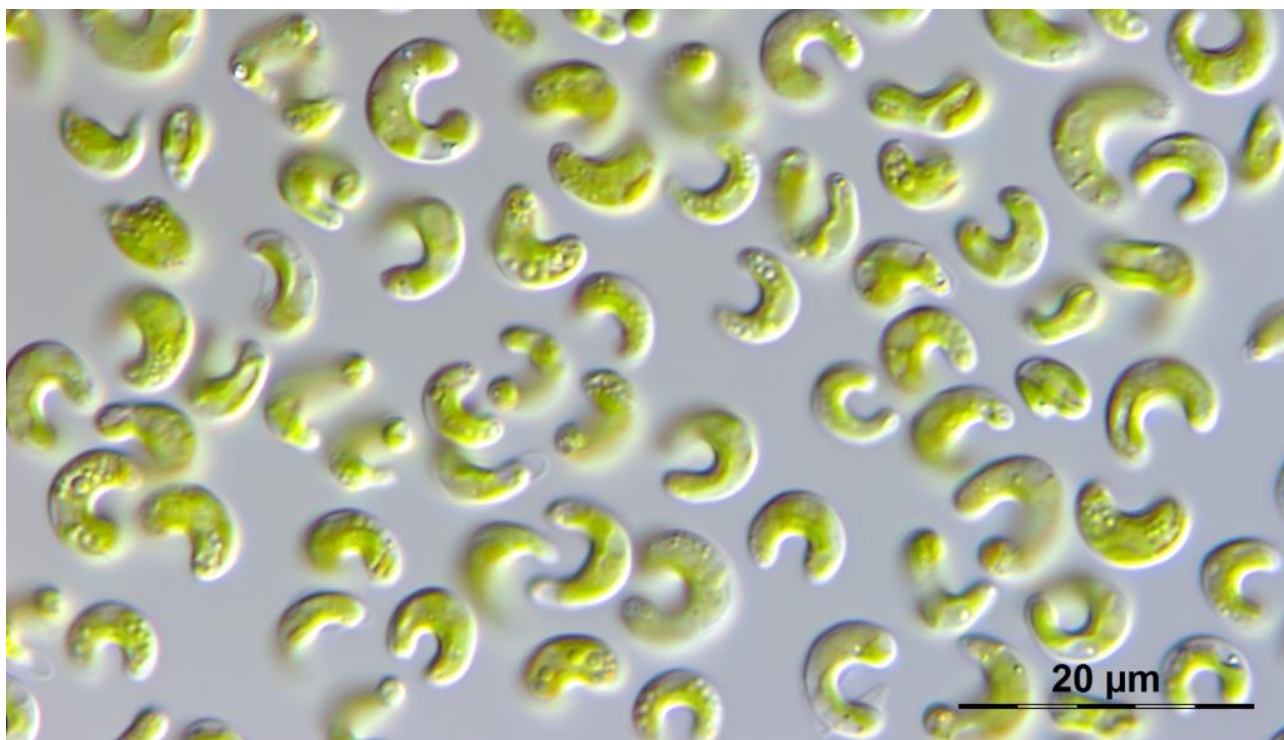


Figura 8: micrografia di *Pseudokirchneriella subcapitata* ((Korshikov) F.Hindák 1990). Nell'angolo in basso a destra è riportata la scala. Da <https://phyocosm.jgi.doe.gov/Rapsub1/Rapsub1.home.html> (modificato).

A seguire, sia per un test di tipo acuto che cronico, si considera *Daphnia magna* (Straus, 1820) (*Arthropoda, Daphniidae*) (Figura 9). Questo crostaceo è largamente diffuso nell'emisfero boreale, a esclusione delle zone tropicali, nella cosiddetta area olartica (Benzie, 2005). Essa colonizza vari corpi d'acqua sia dolce che salmastra, le cui dimensioni possono andare da quelle di un grande lago all'effimera pozza che si può venire a creare in zone costiere, dato che ha una buona tolleranza alla salinità (Ebert, 2005). Nonostante la sua

grande adattabilità, la si trova più spesso associata a quegli habitat caratterizzati da un substrato ricoperto da perifiton



Figura 9: *Daphnia magna* (Straus, 1820) (Siehoff, Hammers-Wirtz, Strauss, & Ratte, 2009) o altra sostanza organica, che *D. magna* sfrutta come risorse per il pascolamento, messo in pratica filtrando

Figura 9: *Daphnia magna* (Straus, 1820) femmina con covata di uova asessuate. L'animale è lungo circa 4 mm. Si possono osservare chiaramente, nella parte del capo, le due appendici che l'organismo utilizza per il movimento. Da Dieter Ebert, Basel, Switzerland - Own work, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=47132022> (modificato).

(Siehoff, Hammers-Wirtz, Strauss, & Ratte, 2009) o altra sostanza organica, che *D. magna* sfrutta come risorse per il pascolamento, messo in pratica filtrando

l'acqua attraverso le appendici toraciche (Fryer, 1991). È interessante riportare come, in presenza di kairomoni (particolari feromoni emessi da un organismo) dei predatori, il crostaceo in questione possa sviluppare delle spine allungate sul carapace o incrementare la propria taglia corporea (Meester, 1993), in modo da rendere più difficile l'ingestione da parte del cacciatore, il quale ruolo è solitamente ricoperto da pesci planctivori (Lampert, 2006).

Per il test di tipo sub-cronico, verrà utilizzato il gasteropode *Radix auricularia* (Linnaeus, 1758) (*Mollusca, Lymnaeidae*) (Figura 10). I gasteropodi sono uno dei taxa di eucarioti più diffusi a livello mondiale (Schell, et al., 2017), occupando una gran varietà di habitat e avendo così evoluto una moltitudine di adattamenti differenti (Romero, Pfenninger, Kano, & Klussmann-Kolb, 2016; Romero, Weigand, & Pfenninger, Positive selection on panpulmonate mitogenomes provide new clues on adaptations to terrestrial life, 2016), tradotti in una fiorente speciazione.

In particolare, le chioccioline di acqua dolce del genere *Radix* possiedono una distribuzione olartica (Cordellier, et al., 2012) e oltre che per l'ecotossicologia (Hallgren, Sorita, Berglund, & Persson, 2012), rivestono un ruolo chiave anche per lo studio degli effetti dei cambiamenti climatici sugli ecosistemi dulciacquicoli (Sommer, Adrian, Bauer, & Winder, 2012). Gli esemplari di questa specie sono ermafroditi contemporanei (Yu, Deng,



Figura 10: esemplare di *Radix auricularia* (Linnaeus, 1758), sul quale si possono osservare tutti i tratti distintivi descritti. Evidenti sono i tentacoli sul capo, dalla tipica forma appiattita e triangolare, che seguono la colorazione di tutto il corpo, ricoperto da punti bianchi. La conchiglia è destrorsa. Da [http://lifeinfreshwater.net/ngg\\_tag/lymnaeidae/](http://lifeinfreshwater.net/ngg_tag/lymnaeidae/) (modificato).

Zhang, & Duan, 2016). Il corpo è punteggiato di piccole macchie bianche sulla parte posteriore della testa e sui tentacoli ma non sul piede, a cui si accompagna, lungo il bordo del mantello, una linea di macchie scure (Baker, 1902; Falniowski, 1980). Il piede è rotondo e leggermente allungato (Baker, 1902).

La parte cefalica è ampia e anch'essa arrotondata, dalla quale emergono una coppia di tentacoli larghi e appiattiti più che lunghi, quasi lobati, di forma

triangolare (Jackiewicz & Buksalewicz, 1998).

Il loro sangue contiene emocianina blu (una proteina utilizzata da alcuni molluschi e artropodi come proteina respiratoria) (Jing, 1983), sospinto da un cuore con pulsazioni lente e regolari, attorno ai 34 battiti per minuto; conseguentemente l'animale si muove in modo lento (Baker, 1902).

Da segnalare, in quanto sarà utile per comprendere al meglio il tipo di test che verrà messo in pratica, che questa specie non possiede una fase larvale ma che gli organismi escono dall'uovo già formati, con la conchiglia, solo di taglia ridotta rispetto a un adulto.

Per la valutazione degli effetti in ambiente estuarino e marino, attività non prevista dalle attuali normative comunitarie, si sono utilizzati metodi di analisi con batteri bioluminescenti (test Microtox®), test con crostacei (*Acartia (Acanthacartia) tonsa*, [Dana, 1849]) e due distinte specie di microalghe: *Dunaliella tertiolecta* (Butcher, 1959) e *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1898).

I possibili effetti sulla componente microbica sono stati valutati sottoponendo a test il batterio Gram-negativo bioluminescente *Aliivibrio fischeri* (Beijerinck, 1889) (Figura 11), anche noto col nome, ormai non più accettato, di *Vibrio fischeri* (Urbanczyk, Ast, Higgins, Carson, & Dunlap, 2007) e *Photobacterium phosphoreum*. Il microrganismo in questione è distribuito globalmente in tutte le aree che presentano mari dal clima temperato e subtropicale e vive sia indipendentemente che associato in simbiosi con altri animali marini, in particolar modo i calamari, dove si stabilisce negli organi luminescenti (McFall-Ngai, 2014).

La bioluminescenza del batterio è indotta dalla trascrizione dell'operone "lux", a sua volta causata dal fenomeno di *quorum sensing* (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, & Stahl, 2016), ovvero la popolazione di *A. fischeri* (Beijerinck, 1889) deve raggiungere un certo livello di densità cellulare per attivare l'operone e produrre luminescenza (Figura 12). Molti fattori, sia esterni che interni, sono in grado di inibire o stimolare

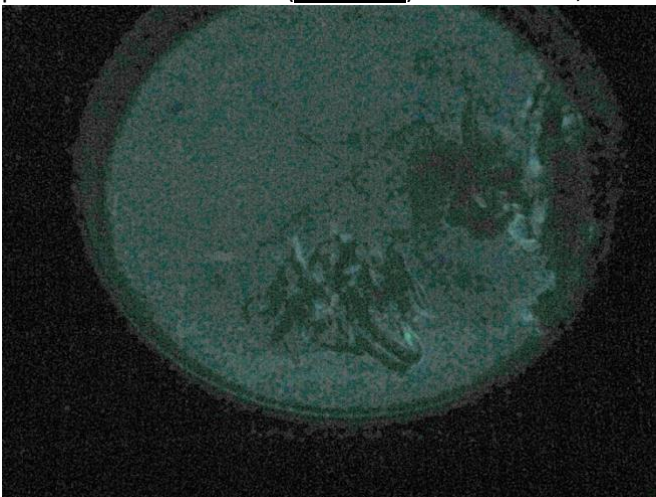


Figura 11: *Aliivibrio fischeri* (Beijerinck, 1889) che mettono in pratica la distintiva bioluminescenza all'interno di una capsula petri. Il fenomeno è dovuto al cosiddetto "quorum sensing" e si attiva solamente quando la densità cellulare dei microrganismi raggiunge una soglia critica. Questa particolare caratteristica viene inibita da condizioni di stress e ciò viene sfruttato in ecotossicologia. Da nicholas  
<https://www.flickr.com/photos/32452843@N00/8563287440/>, CC BY 2.0,  
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=68355339> (modificato).

la trascrizione di questo gene e conseguentemente stimolare la produzione di luce: è per questo motivo che i batteri vengono utilizzati in ecotossicologia.

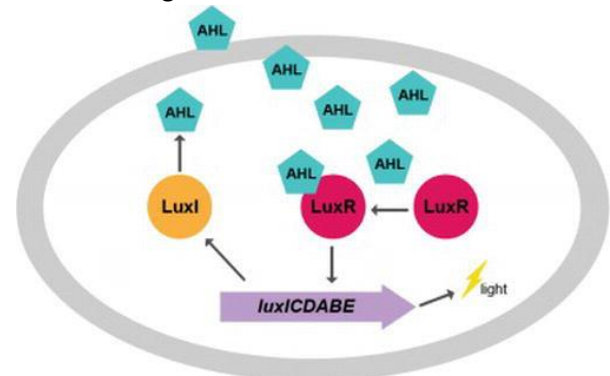


Figura 12: il quorum sensing in *Aliivibrio fischeri* (Beijerinck, 1889). I pentagoni verdi denotano l'autoinduttore AHL prodotto da LuxI (lattone 3OC6-omoserina). Il regolatore trascrizionale, LuxR, legato con AHL stesso quando questo è in quantità elevate, modula l'espressione dell'AHL sintasi stessa (LuxI) e l'espressione dell'operone lux, portando all'emissione di luce mediata dalla luciferasi. Da (Waters & Bassler, 2005) (modificato).

Come accennato in precedenza, gli effetti sulla

componente vegetale di acque salmastre verrà valutata con l'ausilio di due distinte specie: una cloroficea, *Dunaliella tertiolecta* (Butcher, 1959) e una diatomea, *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1898).

Le microalghe del genere *Dunaliella* (*Chlorophyta*, *Dunaliellaceae*) (Figura 13) possiedono una buona tolleranza alla salinità, alla temperatura, a eventuali limitazioni di nutrienti e all'insolazione (Azua-Bustos, Gonzalez-Silva, Salas, Palma, & Vicuna, 2010; Segovia, et al., 2015). La maggioranza degli esponenti conosciuti di questo genere ha caratteristiche planctoniche (Henley, Cobbs, Novoveská, Buchheim, & Graham, 2018) ma esistono anche poche specie che vivono aderenti, ricoprendo le rocce e altri substrati solidi all'interno dei corpi d'acqua (Brock, 1975). Questo disequilibrio tra i due comparti è probabilmente dovuto al fatto che le attenzioni della ricerca si siano concentrate prevalentemente sulla componente planctonica; si è infatti visto come siano state individuate rapidamente nuove specie considerando anche il benthos, dato che lì le condizioni sono diverse e spesso più favorevoli alla crescita (Post, 1977), rispetto alla colonna d'acqua. Al giorno d'oggi sono state isolate 29 specie all'interno del genere (Henley, Cobbs, Novoveská, Buchheim, & Graham, 2018) ma l'aver quasi ignorato il benthos fa sì che se ne sospetti un'abbondanza maggiore (Kirkwood & Henley, 2006; Azua-Bustos, Gonzalez-Silva, Salas, Palma, & Vicuna, 2010; Buchheim, Kirkwood, Buchheim, Verghese, & Henley, 2010).



Figura 13: microalghe unicellulari d'acqua salata del genere *Dunaliella*. Non è sempre facile distinguere tra le varie specie appartenenti a questo genere basandosi solo su caratteristiche morfologiche, dato che le cellule sono prive di barriere rigide e dunque soggette a una certa malleabilità di forma. Molte sono le applicazioni in biotecnologie di quest'alga, tra cui la produzione di  $\beta$ -carotene per i cosmetici e quella di biocarburanti. Da CSIRO, CC BY 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=35487939> (modificato).

La seconda specie di microalga marina considerata è *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1898) (*Bacillariophyta*, *Phaeodactylaceae*) (Figura 14), che condivide con *Dunaliella* le buone caratteristiche di

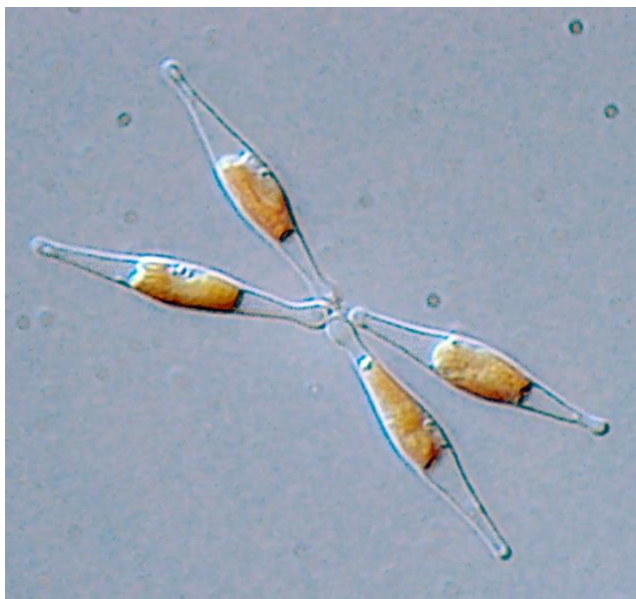


Figura 14: micrografia di *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1898). Questa diatomea pennata è l'unica appartenente al suo genere. È particolare il fatto che, a differenza di altre diatomee possa sopravvivere in assenza di silicio, non producendo l'esoscheletro: per questo può assumere diverse forme. Da (Image courtesy of Alessandra de Martino and Chris Bowler, Stazione Zoologica and Ecole Normale Supérieure.) - Bradbury J: Nature&#039;s Nanotechnologists: Unveiling the Secrets of Diatoms. PLoS Biol 2/10/2004: e306. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0020306>, CC BY 2.5, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1375344> (modificato).

Per la componente planctonica animale, i saggi su acqua salata sono stati effettuati impiegando il copepode calanoide *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849) (*Arthropoda*, *Acartiidae*) (Figura 15). I copepodi rappresentano il taxon dominante di invertebrati negli ambienti acquatici, andando a costituire quasi il 70% della totale biomassa degli oceani, contando all'incirca 14000 specie (Huys & Boxshall, 1991). Come già detto in precedenza, nei test ecotossicologici si opta per dare la preferenza a organismi rilevanti a livello ecosistemico (estensione del secondo punto del metodo ITS) ed è per questo che i copepodi, particolarmente importanti a livello di catena trofica, vengono così tanto utilizzati (Kwok, Souissi, Dur, Won, & Lee, 2015; Zhou, et al., 2018). In quest'ottica, molteplici endpoints possono essere considerati, tra cui la fecondità, la mortalità, il successo

crescita e resa, essendo così un'ottima alternativa alle coltivazioni su suolo, in particolar modo per quanto riguarda la produzione di pigmenti, lipidi (Alonso, Belarbi, Rodríguez-Ruiz, Segura, & Giménez, 1998) e acidi grassi polinsaturi (dei quali il più comune è l'omega-3), per i quali costituiscono una valida alternativa a quelli estratti dal pesce, principalmente per la maggiore sostenibilità (Fajardo, et al., 2007; Cui, Thomas-Hall, Chua, & Schenk, 2021). Questa diatomea marina viene ritrovata in diversi areali nel mondo, preferendo le zone costiere. È particolare il fatto che si presenti in tre differenti forme: fusiforme, ovale o triradiata (Martino, Meichenin, Shi, Pan, & Bowler, 2007).

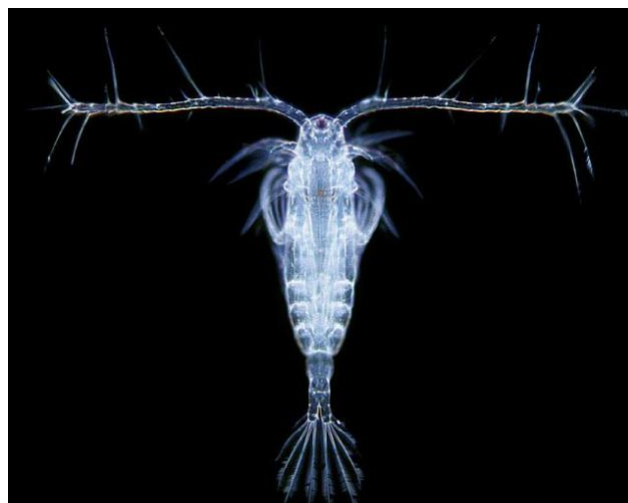


Figura 15: il copepode calanoide *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849). Gli organismi appartenenti a questa specie sono traslucidi. Le femmine sono lunghe da 0,8 a 1,5 mm, mentre i maschi raggiungono al massimo 1,3 mm (Razouls, de Bovée, Kouwenberg, & Desreumaux, 2015). Può essere distinto dalle specie simili osservando le lunghe antenne primarie, che raggiungono almeno la metà della lunghezza corporea, da cui si dipartono una serie di antenne secondarie ramificate. Altra caratteristica peculiare è la presenza di un'articolazione tra il quinto e il sesto segmento corporeo. Da <https://fishlarvae.org/galleries/images-of-species-that-we-work-on/> (modificato).

nella schiusa delle uova e lo sviluppo larvale (Gorbi, et al., 2012; Vitiello, Zhou, Scuderi, Pellegrini, & Buttino, 2016; Buttino, Vitiello, Macchia, Scuderi, & Pellegrini, 2018).

*Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849) risulta essere distribuito globalmente e in maniera abbondante in tutti gli ecosistemi marini subtropicali e temperati d'acqua salata (Cervetto, Pagano, & Gaudy, 1995; Hansen, Buttino, Cunha, & Drillet, 2016). Tutto ciò ha portato alla definizione di protocolli utili sia al mantenimento in laboratorio del copepode (Kiørboe, Møhlenberg, & Hamburger, 1985; Støttrup, Bell, & Sargent, 1999; Sørensen, Drillet, Engell-Sørensen, Hansen, & Ramløv, 2007), sia per quanto riguarda i veri e propri test ecotossicologici, standardizzati da agenzie, includendo orizzonti temporali sia acuti che cronici (Zhou, et al., 2018). Di particolare interesse sarà il test acuto, che prende in considerazione gli effetti di sostanze sulla sopravvivenza degli adulti o al più, sullo stadio larvale di nauplii (Gorbi, et al., 2012) (Figura 16). Esistono comunque anche saggi cronici, che considerano invece il numero di uova prodotte, la frazione di uova che si schiudono con successo (Gorbi, et al., 2012) o ancora controllando lo sviluppo larvale, ovvero quante larve raggiungono lo stadio giovanile di copepodite (Figura 17) durante il periodo di esposizione (ISO, 2015; Buttino, Vitiello, Macchia, Scuderi, & Pellegrini, 2018).



Figura 16: prima fase larvale di nauplio del copepode *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849). Il corpo è diviso tra testa, telson e tre paia di appendici, che muteranno poi in antenne, antennule e mandibole. Possiede un occhio semplice mediano detto "naupliare". Raggiunge la fase adulta attraverso una serie di mute. Da <https://www.shapeoflife.org/news/featured-creature/2018/05/16/nauplii-larvae> (modificato).



Figura 17: fase vitale di copepodite, che segue quella di nauplio e precede quella di copepode adulto in *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849). Vengono individuati sei stadi, dallo sviluppo delle prime due appendici natatorie al raggiungimento della maturità. Da <https://watershed.ucdavis.edu/experiments/zoopsid/AgeClassification/copepoditeinfo.html> (modificato).

## Materiali e metodi

Nell'ottica del progetto di valutazione della sostanza, la stima avanzata del pericolo (*Integrated Testing Strategy – ITS*) viene elaborata su due livelli (Figura 18).

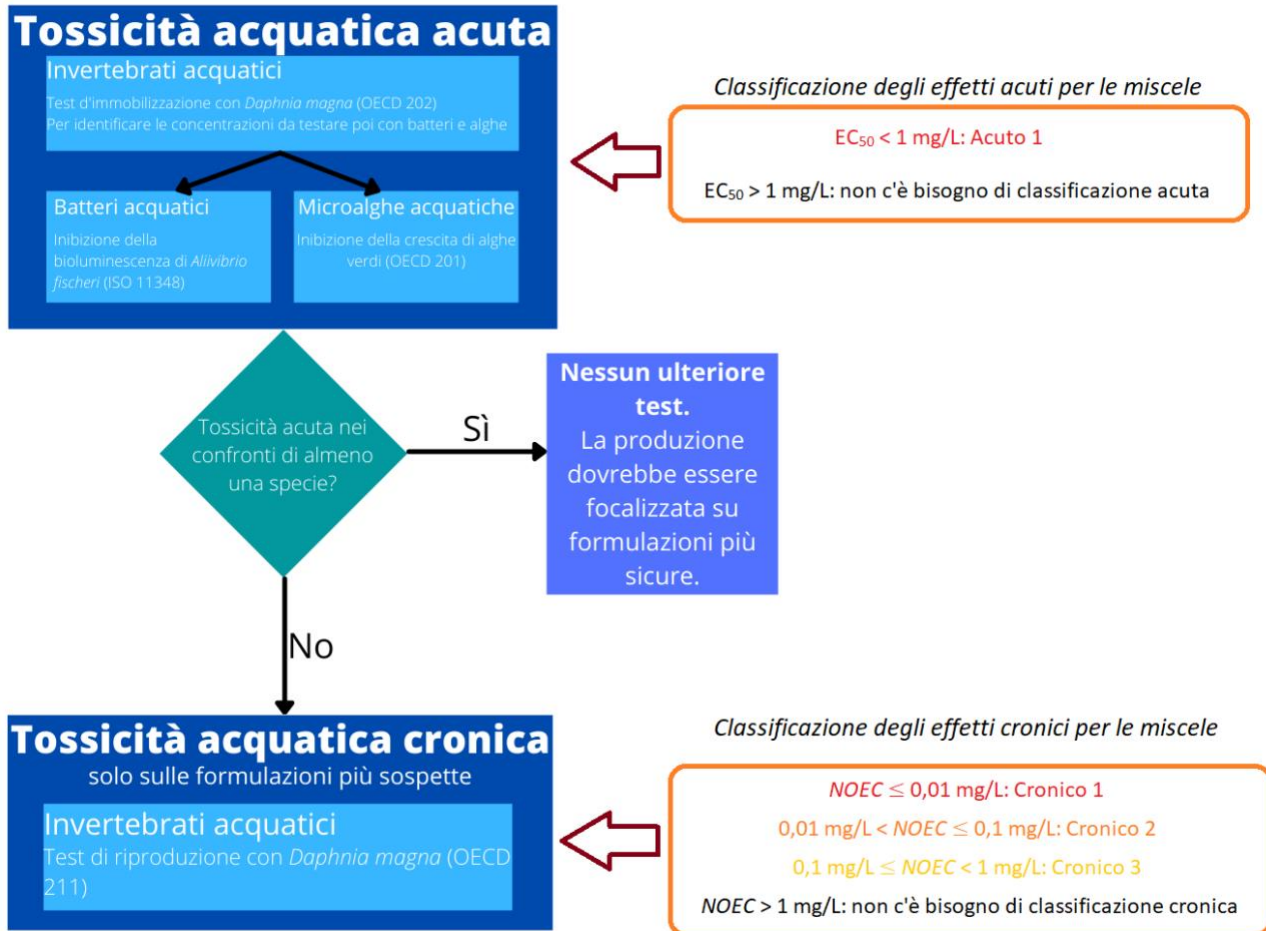


Figura 18: rappresentazione schematica della metodologia ITS che verrà utilizzata all'interno di questo lavoro. Il primo livello riguarda i test di tossicità acuta, che prendono in considerazione varie specie. Nel riquadro affiancato a destra viene riportata la soglia indicata dalla normativa CLP per considerare una sostanza come tossica a livello acuto. Se la formulazione non presenterà tossicità acuta, si approfondirà l'indagine utilizzando in test di tipo cronico (il livello della procedura ITS), classificandola, in base ai risultati, coerentemente con quanto riportato nel secondo riquadro in basso a destra.

Il primo di questi livelli ha l'obiettivo di valutare la tossicità acuta tramite una serie di test su un'ampia selezione di specie (si veda il paragrafo 1, "Introduzione") tale da coprire il più ampio *range* di variabilità degli ecosistemi acquatici, sia salati che dulciacquicoli, essendo questi i recettori finali della sostanza tossica.

Il secondo livello della procedura ITS, invece, viene tarato su test di sviluppo larvale e riproduzione con specie d'acqua dolce, di durata temporale più estesa, in particolar modo considerando rispettivamente *Radix auricularia* (Linnaeus, 1758) e *Daphnia magna* (Straus, 1820).



Per tutte le elaborazioni statistiche che i dati rilevati di volta in volta necessiteranno, verrà sempre seguito il filo logico riportato in [Figura 19](#).

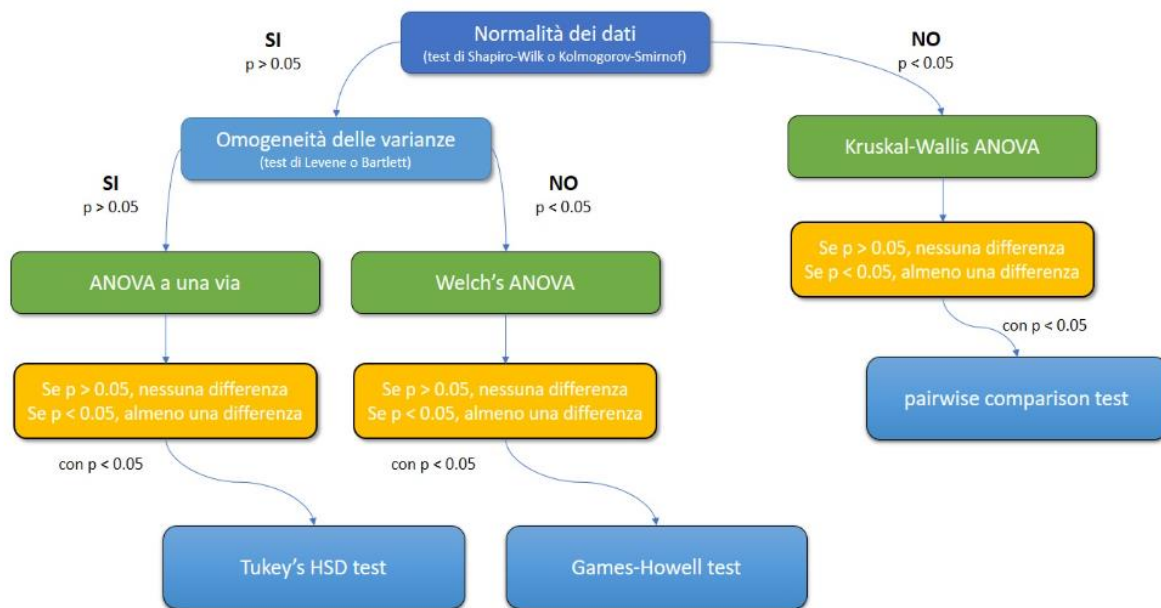


Figura 19: mappa concettuale che descrive le varie alternative considerate man mano che si procede con le analisi statistiche dei dati rilevati con i test ecotossicologici messi in pratica.

## Metodi utilizzati nel livello I – tossicità acuta

I test acuti prevedono l'esposizione degli organismi a concentrazioni elevate per un periodo di tempo breve e solitamente vanno a valutare la mortalità. Questi sono quelli che vengono più spesso utilizzati per le analisi, per via delle loro caratteristiche di riproducibilità, dato il design sperimentale semplice, la rapidità con cui si possono effettuare e i costi contenuti.

### Livello I – metodi per le acque dolci

*Test di crescita algale con Pseudokirchneriella subcapitata ((Korshikov) F.Hindák 1990)*

Il primo test acuto utilizzato nel livello I è il test di crescita della durata di 72 ore con l'alga unicellulare *Pseudokirchneriella subcapitata* ((Korshikov) F.Hindák 1990) ([Figura 8](#)), che cresce in acqua dolce. Questo test acuto viene eseguito seguendo le linee guida *OECD* (OECD, 2011): esso consiste in una stima dell'inibizione della crescita algale provocata dall'esposizione a elementi o sostanze chimiche nocivi.

Una serie di colture verranno esposte a diverse concentrazioni della sostanza da saggiare e verrà valutato l'eventuale rallentamento della crescita algale, confrontando questo dato con i valori di crescita medi ottenuti da una coltura di controllo, costituita solamente dal medium di crescita e priva di tossici.

L'inibizione del tasso di crescita viene espressa come logaritmo di crescita della densità algale nel periodo di tempo considerato e si mira infine a calcolare il valore di  $EC_{50}$ , ovvero la concentrazione di sostanza che riduce il tasso di crescita del 50% rispetto al controllo.

La coltura algale da cui si attingono gli organismi da sottoporre a test viene sempre mantenuta in laboratorio a una temperatura tra i 21 e i 24 °C, in una beuta sottoposta a costante movimento grazie a una piastra agitatrice. Si ha fatto attenzione a mantenere la coltura algale sempre nella condizione di crescita esponenziale, rinnovando la soluzione ogni sette giorni.

La conta delle 72 ore comincia con l'inoculo di un'aliquota di *P. subcapitata* ((Korshikov) F.Hindák 1990) tale da ottenere la concentrazione di  $5 \cdot 10^4$  cell/mL, determinata effettuando un conteggio preliminare sulla coltura di partenza. Tale inoculo viene effettuato usando piastre sterili in polistirene da 24 pozzetti con coperchio (Figura 19), preparando: 3 mL della soluzione da testare, costituita da acqua ricostruita OECD (OECD, 2011) (Allegato 1), la sostanza test e l'aliquota di alghe provenienti dalla coltura esponenziale.

Il range di concentrazioni testato copre il range 0,1 - 1000 mg/L, ottenuto preparando una soluzione iniziale a 1000 mg/L e procedendo per diluizioni successive in rapporto 1:10 fino all'ultima concentrazione. Ogni concentrazione viene realizzata in quattro repliche. Insieme alla sostanza test vengono prodotti anche dei pozzetti di controllo negativo (con il solo medium senza tossico) e di controllo



Figura 19: piastra sterile in polistirene da 24 pozzetti utilizzata per il test con l'alga unicellulare *P. subcapitata* ((Korshikov) F.Hindák 1990). Da <https://www.starlabgroup.com/IT-it/product/piastra-a-24-pozzetti-cytoone-trattata-cc7682-7524.html> (modificato).

positivo utilizzando soluzioni di riferimento di bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ), dato che le linee guida (OECD, 2011) affermano che i risultati del test siano da considerare significativi quando il tasso di crescita medio del controllo negativo supera il valore di 0,97 al giorno, con un coefficiente di variazione <7%.

Le piastre così realizzate sono state chiuse e incubate alla temperatura di  $20 \pm 2$  °C, in condizioni di illuminazione continua e costante, come richiesto dalle linee guida (OECD, 2011).

Al concludersi del periodo di tempo di 72 ore, le alghe sono state fissate aggiungendo una goccia di formaldeide tamponata al 4% con tetraborato di sodio, in ogni pozzetto. Si è dunque effettuata la conta al microscopio invertito (Figura 20), prelevando una piccola quantità da ciascun pozzetto e ponendola nelle

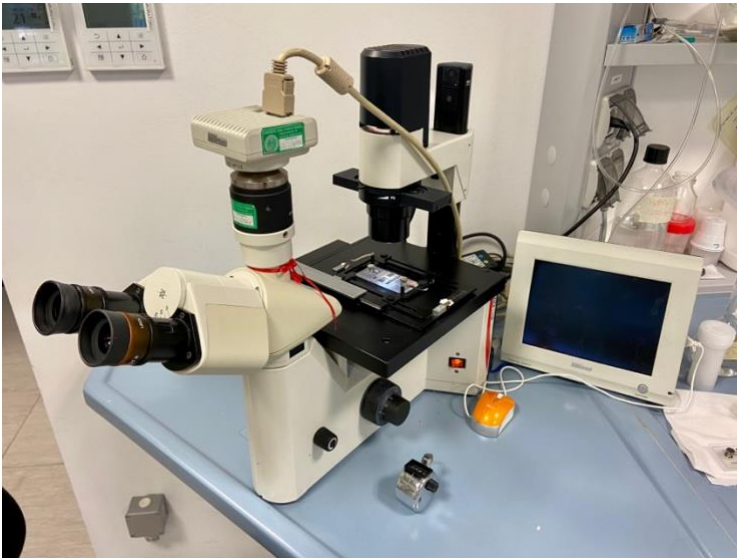


Figura 20: microscopio invertito, ovvero con la sorgente di luce e il condensatore posti in alto mentre torretta e obiettivi stanno in basso, utilizzato per la conta delle microalghe poste sull'apposita camera di Bürker. È equipaggiato di un dispositivo per il contrasto di fase, per andare a osservare le cellule evitando l'uso di coloranti.



Figura 21: camera di conta di Bürker. Sono visibili le pinze che fermano il vetrino, al di sotto del quale sono presenti i due loci dove va inoculata la soluzione contenente le cellule da contare. Si può vedere anche l'indicazione del volume. Da <https://magapor.com/en/portfolio-items/burker/> (modificato).

camere di conta di Bürker (emocitometro di Bürker) (Figura 21).

L'emocitometro (Figura 21) è composto da due celle di forma quadrangolare sulle quali si inocula una piccola porzione della soluzione fissata, solo dopo aver preparato la cella con un vetrino copri oggetti fissato lateralmente da due pinze. Le alghe occuperanno così per capillarità tutta la superficie e dato che la camera viene costruita per contenere un volume noto di soluzione, si può stimare una media del numero di cellule con una semplice formula:

$$\text{media n}^\circ \text{ cellule} = \frac{\text{n}^\circ \text{ cellule contate}}{\text{n}^\circ \text{ quadrati considerati}}$$

Il numero di quadrati considerati sarà sempre pari a 3, dato che si effettua il conteggio considerando solo quelli lungo la diagonale dall'angolo in alto a sinistra a quello in basso a destra della cella (Figura 22); in caso ci fossero state delle cellule eventualmente presenti a ridosso di un bordo, sono state prese in considerazione solo quelle sul lato superiore e destro di ciascun quadrato, in modo da evitare doppi conteggi.

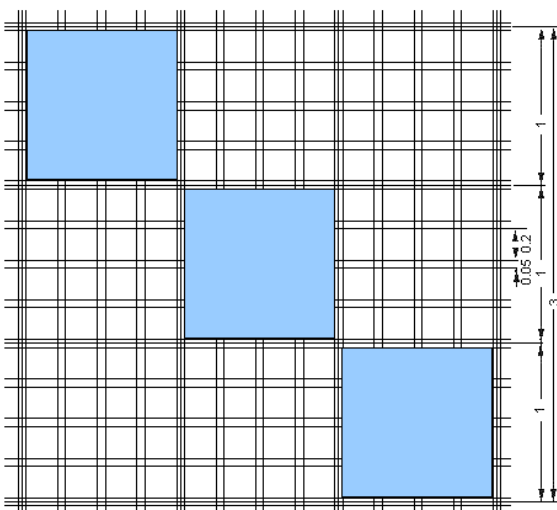


Figura 22: schema di quadrati presente all'interno della camera di conta di Bürker. Solo quelli evidenziati di colore azzurro verranno considerati durante il conteggio. Da <http://2010.igem.org/Team:Debrecen-Hungary/protocols/Transfection> (modificato).

Date le densità algali, si risale a una stima del tasso di crescita  $\mu$ :

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0}$$

Dove:

- $t_0$  = tempo di inizio del test;
- $t_L$  = tempo di fine del test, 72 ore da protocollo (OECD, 2011);
- $x_0$  = densità algale iniziale, rilevata al momento dell'inoculo;
- $x_L$  = densità algale finale.

I tassi di crescita  $\mu$  determinati in questo modo per ciascuna replica di ciascuna concentrazione vengono poi utilizzati per il calcolo della percentuale d'inibizione dello stesso tasso di crescita ( $I_\mu$ ) rispetto a quello del controllo, basandosi sulla formula:

$$I_{\mu_{x_i}} = 100 \times \frac{\mu_c - \mu_{x_i}}{\mu_c}$$

Dove:

- $\mu_c$  = tasso di crescita misurato nel controllo negativo;
- $\mu_{x_i}$  = tasso di crescita calcolato per la replica i-esima della concentrazione x, mediando i risultati delle singole repliche.

Se dai dati risulta almeno un valore di  $I_\mu > 50\%$  allora è possibile calcolare l'EC<sub>50</sub>. Ciò si fa attraverso l'elaborazione del software "LWL", sviluppato dal DTU di Kongens Lyngby in Danimarca che analizza dati continui, modellandoli attraverso distribuzioni Logit, LogNormal o Weibull (Christensen, Kusk, & Nyholm, 2009).

Per esprimere i risultati relativi ai test sulle microalghe viene preferita l'elaborazione attraverso il metodo LogNorm, che verrà utilizzata per tutte e tre le specie considerate, sia nei casi dei controlli positivi che quando è stata somministrata la sostanza oggetto di studio. Si tenga presente anche l'assunzione che, quando i tassi di crescita risultavano troppo bassi o addirittura negativi, si è sostituito il valore con 0,01 per rendere i calcoli matematicamente possibili.

#### *Test di immobilizzazione con Daphnia magna (Straus, 1820)*

Questo saggio, che considera l'immobilizzazione o la mortalità del crostaceo, rientra tra quelli più impiegati nelle valutazioni di sostanze immesse in ambiente, venendo adottato sia dalle linee guida nazionali (APAT-IRSA) che internazionali (OECD, 2004), nonché menzionato dal regolamento REACH per valutare la commerciabilità di sostanze chimiche.

Le colture di laboratorio, periodicamente pulite e rinnovate, sono conservate in condizioni ottimali con lo

scopo di evitare di stressare gli organismi già dalla fase di mantenimento (potendo così indurre risultati non veritieri, dato che organismi già stressati sono più soggetti a mortalità), con la temperatura che deve mantenersi in un *range* tra i 18 e i 22 °C mentre l'illuminazione segue un ciclo giorno-notte di 16-8 ore. Gli organismi sono nutriti somministrando periodicamente una soluzione contenente l'alga unicellulare *P. subcapitata* ((Korshikov) F.Hindák 1990), la stessa utilizzata per il test ecotossicologico (Allegato 2). Da queste colture si prelevano individui di età inferiore alle 24 ore per poi esporli a concentrazioni di 1 g/L della sostanza AB57 e successive diluizioni 1:10 fino a 1 mg/L, per un tempo standardizzato di 48 ore. Tutta la procedura è stata svolta utilizzando materiale adatto: piastre in polistirene da 6 pozzetti (Figura 23), quattro dei quali riempiti con una miscela di medium M7 (Allegato 3) e diverse quantità di sostanza test, in modo da ottenere



Figura 23: piastra sterile in polistirene da 6 pozzetti utilizzata per il test con il cladocero *Daphnia magna* (Straus, 1820). Da <https://www.starlabgroup.com/IT-it/product/piastra-a-6-pozzetti-cytoone-trattata-cc7682-7506.html> (modificato).

le varie concentrazioni, di cui poco sopra. Un'ulteriore piastra viene sfruttata per realizzare il controllo negativo, utilizzando solo medium M7, lo stesso che si usa per il mantenimento delle colture e che consente il mantenimento della specie. I pozzetti, contenenti ciascuno 5 individui (per un totale, dunque, di 20 individui per concentrazione testata), vengono isolati e incubati nelle stesse condizioni ottimali di luce e temperatura delle colture.

Allo scadere dei due giorni, vengono conteggiati gli organismi immobili, per ciascuna concentrazione e per il controllo negativo, in modo da poter poi stimare la concentrazione alla quale si ottiene il valore di EC<sub>50</sub>.

L'elaborazione dei dati viene messa in pratica appoggiandosi a un software DOS (EPA Trimmed Spearman Karber, v3.1), utilizzato per calcolare il valore di EC<sub>50</sub> dei test acuti con risultato discreto attraverso il metodo di Spearman-Karber.

Livello I – metodi per le acque salate e salmastre

*Test Microtox® su bioluminescenza del batterio Aliivibrio fischeri (Beijerinck, 1889)*

Il test esplorativo con batteri *Aliivibrio fischeri* (Beijerinck, 1889), seguendo il protocollo Microtox® (ISO, 2007), è il primo messo in pratica sulle matrici salmastre, per individuare il *range* delle concentrazioni di effetto che verranno poi approfondite successivamente. L'*endpoint* misurato è l'inibizione della bioluminescenza naturale che caratterizza questi microrganismi, poiché, in presenza di contaminanti, essa viene ridotta. La misura di quanto la produzione luminosa venga ostacolata, rispetto a una situazione di riferimento, fa sì che si possa valutare il grado di tossicità di una sostanza o della miscela testata.

Questo test, oltre a seguire il protocollo ISO 11348 (ISO, 2007), è di fondamentale importanza dato che prende in considerazione anche il comparto microbico della comunità acquatica, che verrebbe invece tralasciato se si seguisse solamente il regolamento CLP.

Per l'esecuzione del test si sono utilizzati batteri liofilizzati forniti dal rivenditore ufficiale Microtox® (ECOTOX LDS, Cornaredo, MI), riattivati inoculando 1 mL di soluzione ricostituente al cloruro di sodio (NaCl) al 20%

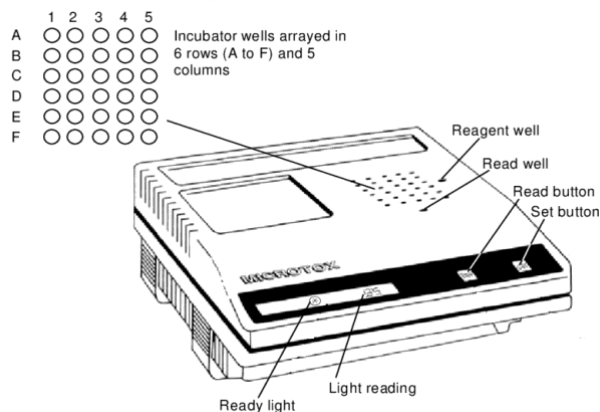


Figura 24: analizzatore Microtox M500. Sono mostrate le caratteristiche operative e la serie di pozzetti dell'incubatore in cui sono posizionate le cuvette di vetro. Da (Doe, Jackman, Scroggins, McLeay, & Wohlgeschaffen, 2005) (modificato).

alla temperatura di 4 °C nel contenitore dei microrganismi, agitando e lasciando poi riposare per 30 minuti.

Lo strumento utilizzato per il test è il luminometro Microtox® M500 (Figura 24), che mantiene i vari campioni alla temperatura di 15 °C e contemporaneamente effettua le misure di luminescenza, accoppiato al suo software di gestione MicrotoxOMNI.

Parallelamente al test, si porta avanti anche un esame utilizzando solfato di zinco ( $ZnSO_4$ ) come sostanza tossica, in modo che i dati qui rilevati fungano come riferimento per il controllo positivo. Le concentrazioni misurate verranno riportate come "mg( $Zn^{2+}$ )".

Il primo esame, esplorativo, ha previsto l'esposizione dei batteri a concentrazioni di Pappetta AB57 disciolta in acqua "ASTM" (ASTM, 1998) (Allegato 4) di 1 g/L, 100 mg/L, 10 mg/L, 1 mg/L, 0,1 mg/L e 0,01 mg/L, valutando l'effetto dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione. Il test è stato eseguito in triplicato. Contestualmente è stato condotto un controllo negativo con la sola acqua di diluizione. Individuata con più precisione la concentrazione che risulta più nociva (1 g/L), il test viene ripetuto con diluizioni più piccole, questa volta 1:2, partendo sempre da 1 g/L.

Si ritiene utile esprimere le concentrazioni anche come quantità di solo biocida presente nella formulazione, in quanto si sospetta che l'effetto tossico sia dovuto quasi esclusivamente a questa particolare sostanza. Per farlo, si misura la quantità di puro biocida, che risulta essere di 0,099 g/mL di soluzione di benzalconio cloruro al 10% (preparato commerciale già pronto). Misurando poi anche la densità della sostanza completa (intera

Pappetta AB57), pari a 1,158 g/mL, si riesce a calcolare, conoscendo le proporzioni del cloruro di benzalconio nella formulazione (Tabella 1), come alla concentrazione testata di 1 g/L di Pappetta AB57 completa, corrispondano 0,854 mg/L di puro biocida. Dato che le successive diluizioni avvengono in serie 1:2, le altre masse sono facilmente calcolabili; ci si ferma alla concentrazione di 0,107 mg/L.

La stessa procedura viene poi ripetuta anche utilizzando come sostanza test il solo cloruro di benzalconio, il biocida presente nella formulazione della Pappetta AB57, analizzandone la tossicità prima nuovamente in acqua ASTM, poi in un'acqua con NaCl al 20‰, per verificare se la sua azione tossica fosse diversa quando presente nel prodotto completo o a sé stante. Vengono utilizzati medium differenti per avere uno spettro il più possibile completo di dati, in quanto l'acqua ricostruita "ASTM" (Allegato 4) è quella che meglio approssima le condizioni ambientali d'acqua salata (ASTM, 1998), mentre la soluzione NaCl al 20‰ è utile per avere una eventuale comparazione coi dati di tossicità di altre sostanze, siccome, storicamente, i risultati dei test Microtox® vengono riportati basandosi su questa soluzione. Nel nuovo saggio si utilizza una concentrazione di partenza di 1·10<sup>-4</sup>% di solo benzalconio cloruro (cui corrispondono 0,989 mg/L), in modo da mantenere lo stesso ordine di grandezza precedente e si mettono in opera diluizioni successive 1:2, fino alla concentrazione di 0,062 mg/L.

I risultati verranno infine riportati come percentuale di effetto (I(%)) utilizzando la seguente formula:

$$I(\%) = 100 \times \left( I_b - \frac{I_c}{I_b} \right)$$

Dove:

- $I_b$  = emissione luminosa del bianco di controllo negativo;
- $I_c$  = emissione luminosa del campione.

*Test di crescita algale con Dunaliella tertiolecta (Butcher, 1959) e Phaeodactylum tricornutum (Bohlin, 1898)*  
La stessa metodologia ed elaborazione dati descritta per *P. subcapitata* ((Korshikov) F.Hindák 1990) viene messa in pratica in maniera analoga per i test con *D. tertiolecta* (Butcher, 1959) e *P. tricornutum* (Bohlin, 1898); anche in questi casi, durante l'analisi dati con il software "LWL", si è assunta una distribuzione LogNorm. Le uniche modifiche riguardano il medium di crescita, che ha previsto l'impiego del medium "f/2" di Guillard (Allegato 5), visto che queste ultime due microalghe sono d'acqua salata e le concentrazioni del controllo positivo, realizzato con bicromato di potassio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>): per *D. tertiolecta* (Butcher, 1959) vanno da 15 a 2,5 mg/L (con riduzioni successive di 2,5 mg/L) mentre per *P. tricornutum* (Bohlin, 1898) vengono verificati solo i 20 mg/L e i 5 mg/L.

Con *P. tricornutum* (Bohlin, 1898) è stato condotto un ulteriore test di approfondimento, impiegando il solo cloruro di benzalconio (cioè il biocida contenuto nella formulazione completa della Pappetta AB57) come tossico. Le concentrazioni considerate vanno da un 1·10<sup>-4</sup>% (0,989 mg/L) di puro biocida, per giungere con diluizioni successive 1:2 a quella di 0,31·10<sup>-5</sup>% (0,031 mg/L).

#### *Test di mortalità con Acartia (Acanthacartia) tonsa (Dana, 1849)*

Per concludere, il test acuto su *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849), riguardo le acque salate. Il protocollo cui si fa riferimento è quello indicato da ISO 14669 (ISO, 1999). Si mantiene il *modus operandi* già utilizzato in precedenza, così da ottenere dei dati il più possibile confrontabili: la Pappetta AB57 viene disciolta nel medium appositamente realizzato per il copepode (“Medium al 20%”, Allegato 6) partendo dalla concentrazione più alta di 1 g/L e giungendo, per diluizioni successive 1:10, fino a quella di 1 mg/L.

Due organismi adulti vengono prelevati dalla coltura di mantenimento e posti in boccette contenenti 10 mL della soluzione da testare e 100 µL di soluzione di *Pavlova lutheri* ((Droop) J.C.Green 1975), che fungerà da fonte di alimentazione per i copepodi. Il test viene eseguito in tripla replica e affiancato da un controllo negativo con il solo “Medium al 20%”. Tutte le boccette vengono incubate in condizioni di temperatura  $T = 20 \pm 1$  °C e illuminazione standard a luce fredda, proprio per non alterare la temperatura, con ciclo giorno/notte di 16/8 ore.

Al termine del tempo protocollare di 48 ore, le boccette vengono prelevate e si procede alla conta degli organismi che, dopo uno stimolo meccanico, non manifestano alcun tipo di movimento e che vengono dunque considerati morti.

#### Metodi utilizzato nel livello II – tossicità a lungo termine (sub-cronica e cronica)

##### Livello II – metodi per acque dolci

#### *Test di sviluppo larvale con Radix auricularia (Linnaeus, 1758)*

Tra i test acuti e quelli cronici, si inserisce quello che comprende una scala temporale media, definita “sub-cronica”. Il saggio sub-cronico messo in pratica impiega il gasteropode *R. auricularia* (Linnaeus, 1758).

Le colture di *Radix* vengono mantenute in laboratorio in condizioni di temperatura e luce standardizzate, a 21 °C e con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio, in acquari ventilati contenenti acqua di rubinetto dechlorata, mantenuta in aerazione continua ( $21 \pm 2$  °C, pH: 8,5-9,5, OD: 6,5-9 mg/L a 20 °C, Eh: 100-200 mV, conducibilità: 400-800 µS/cm, NH<sub>3</sub>: 0,05 mg/L) (Figura 25). Per la raccolta delle placche ovigere, vengono allestite delle vasche di vetro di dimensioni ridotte, sempre riempite con acqua di rubinetto, le cui pareti sono ricoperte da vetrini di microscopio rimovibili (Figura 26). Questa procedura viene attuata per rimuovere e maneggiare con più facilità le placche ovigere dell’animale (Figura 27), che sono il vero oggetto del test.

Per il test, vengono utilizzate placche ovigere deposte entro 24 ore dall’inizio dell’attività di test (ovvero nello stadio denominato *before event velum*, Figura 28), prelevate dalle vasche di allevamento, di cui viene conteggiato al microscopio invertito (Figura 20) il numero esatto di uova. Tali placche sono poi poste in un becher contenente una soluzione di “Medium *Radix*” (Allegato 7) e la sostanza tossica da testare, alle concentrazioni di 10 mg/L, 1 mg/L e 0,1 mg/L, facendo particolare attenzione a che la placca sia interamente immersa. Parallelamente si avviano dei campioni contenenti solo “Medium *Radix*” (Allegato 7) in modo che fungano da controllo negativo. Il tutto viene realizzato in tripla replica.



Si procede a incubare le uova nelle stesse condizioni standard delle colture.

Essendo un test basato sullo sviluppo embrionale, dopo otto giorni dall'avvio del saggio si effettua un primo controllo al microscopio invertito, prelevando il vetrino con adesiva la placca e verificando lo stato di sviluppo dell'embrione. In condizioni normali, gli embrioni raggiungono lo stadio di *shell formation* (Figura 28)

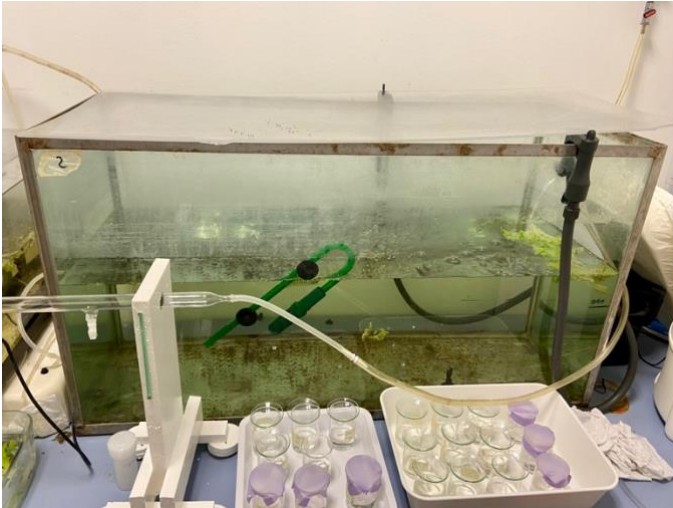


Figura 25: acquario di mantenimento per *R. auricularia* (Linnaeus, 1758). La temperatura viene mantenuta a 21 °C, il fotoperiodo è di 16 ore di luce e 8 di buio. È presente una pompa di movimento all'interno. Sulla superficie dell'acqua la pianta *Lemna minor* (Linnaeus, 1758).



Figura 27: placca ovigera tipo di *R. auricularia* (Linnaeus, 1758). Ciascun elemento di forma sferica è un uovo. Da (Russo, et al., 2021) (modificato).

all'ottavo giorno.

Procedimento del tutto

analogo viene messo in

pratica al tredicesimo giorno di test, tenendo conto che a questo punto lo stadio di sviluppo ideale è quello di *capsule rupture* (Figura 28), in cui è fondamentale che venga verificata la presenza del guscio e la rottura dell'involucro dell'uovo.

Si registrano entrambe le volte, per ogni placca, la fase di sviluppo raggiunta da ogni uovo e l'eventuale morte dell'embrione.

La tossicità della sostanza, data dalla concentrazione a cui si manifestano i primi effetti, viene evidenziata dal rallentamento dello sviluppo embrionale o nel peggiore dei casi, dalla morte. È difficile fare una distinzione sulla base della quantificazione del ritardo ma si può provare ad affermare che più in ritardo si trovano gli embrioni, più tossica è la sostanza.

Il risultato che si ottiene verrà espresso come percentuale di larve che hanno raggiunto il livello di sviluppo atteso (*shell formation* all'ottavo giorno o *capsule rupture* al tredicesimo giorno), sul numero totale di embrioni conteggiati nella placca all'inizio.

Le elaborazioni statistiche sui dati prevedono di poter essere eseguite in due modi alternativi: un'analisi della varianza, atta a identificare la concentrazione osservata di non effetto (NOEC) o utilizzando lo stesso software "LWL", già citato in precedenza per quanto riguarda le microalghe, sviluppato dal DTU di Kongens Lyngby in

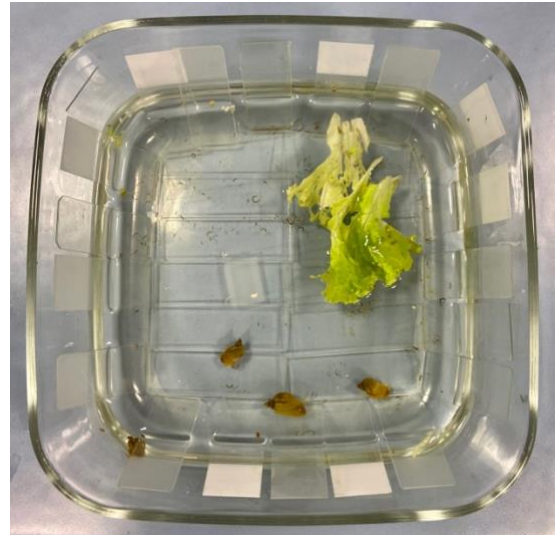


Figura 26: vaschetta "frigoverre" adibita per la raccolta delle placche ovigere dei gasteropodi. Si possono osservare i vetrini di microscopio posti in modo da ricoprire la più grande porzione possibile di superficie interna alla vasca. Viene fornita periodicamente una foglia di insalata biologica come alimentazione per gli organismi.

Danimarca, che effettua modellazioni di dati continui sfruttando distribuzioni Logit, LogNormal o Weibull (Christensen, Kusk, & Nyholm, 2009).

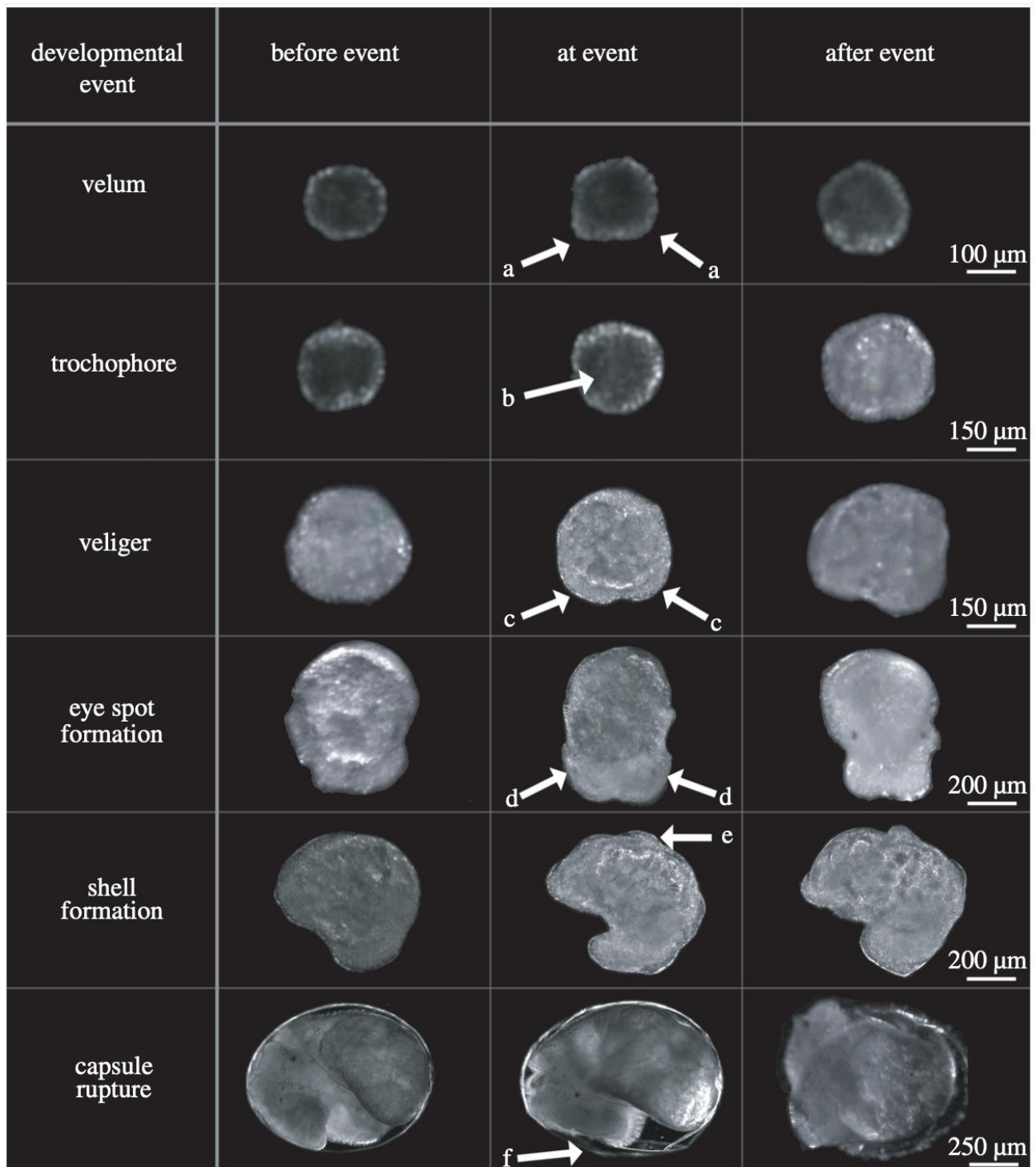


Figura 28: immagini di scattate in momenti specifici dello sviluppo embrionale, utilizzate come riferimento per individuare di volta in volta la fase. A ogni fotografia è associata la relativa scala. Velum – (a) – il velum semitrasparente si è esteso fino a ricoprire completamente un lato dell’embrione; trocofora – (b) – cellule circolari del fegato sono visibili nell’embrione e si sono estese tanto da essere apparenti su entrambi i lati; veliger – (c) – i due lobi velari si sono estesi, assumendo una forma di “luna crescente” con una chiara rientranza tra i due; formazione degli occhi – (d) – i punti in cui si stanno formando gli occhi sono ben evidenti su entrambi i lati del capo; formazione della conchiglia – (e) – il setto della conchiglia diventa visibile al di sopra del mantello e man mano che lo sviluppo procede, cresce in direzione della testa; rottura della capsula – (f) – la forma prima arrotondata dell’uovo appare spiegazzata, dato che l’organismo la sta perforando usando la radula. Da (Tills, Rundle, & Spicer, 2013) (modificato).

### *Test cronico di riproduzione con Daphnia magna (Straus, 1820)*

Ultimo test per il livello II ITS riguarda ancora il cladocero *D. magna* (Straus, 1820), questa volta sottoposto a esposizione cronica, dato che questo tipo di esposizione risulta più significativa per l'ambiente e rilevante in termini di conservazione e gestione. Si farà riferimento alla procedura ISO 10706 (ISO, 2000), che descrive la metodologia per la determinazione della tossicità sub letale data da prodotti chimici in acqua, adattata dallo standard OECD 211 (OECD, 2012).

Sono state predisposte dieci repliche per le due concentrazioni testate, 1 mg/L e 0,1 mg/L (selezionate alla luce dei risultati dei precedenti test), a cui se ne aggiungono un'altra decina per il controllo negativo, costituito da solo medium acquoso M7 (Allegato 3).

Come per il test acuto, organismi di età inferiore alle 24 ore sono stati prelevati dalle colture di laboratorio e posti singolarmente nei recipienti di materiale inerte (becher in vetro Pyrex, Figura 29) contenenti ciascuno 50 mL di soluzione. Sempre in analogia, i becher vengono quindi incubati in un ambiente controllato, dove la temperatura viene mantenuta costante, in un *range* tra 18 e 22 °C e dove l'illuminazione, alternata in un ciclo giorno-notte di 16-8 ore, si mantiene nell'intervallo tra 600 e 800 lux.



*Figura 29: becher in vetro Pyrex da 100 mL, utilizzato per il test cronico con *D. magna*. In ciascuno vengono posti 50 mL di soluzione, con all'interno anche il tossico e un individuo giovane.*

Seguendo le indicazioni della normativa, le soluzioni a cui gli organismi sono esposti vengono rinnovate completamente tre volte a settimana,

facendo attenzione a minimizzare il volume di soluzione trasferita con l'organismo stesso. Insieme alla procedura di rinnovo, tutti gli organismi vengono nutriti, inizialmente con 0,5 mL e poi, dopo il primo evento riproduttivo, proporzionalmente all'aumento di taglia ed eventualmente del numero di individui, con 1 mL di soluzione di *P. subcapitata* ((Korshikov) F.Hindák 1990) (Allegato 2). Infine, nello stesso momento si procede di volta in volta anche alla conta e alla rimozione dell'eventuale prole prodotta, fenomeno che non avviene solitamente prima del nono giorno di test.

Alla fine del periodo di 21 giorni viene registrata la sopravvivenza dei genitori insieme al numero di prole viva prodotta per ogni genitore.

Per calcolare la tossicità della sostanza testata, si confrontano la sopravvivenza dei genitori, il numero di eventi riproduttivi e la quantità di nuovi individui prodotti tra il controllo negativo e le due soluzioni contenenti il tossico.

Il test appena descritto è da considerarsi valido se, nel controllo, la mortalità e lo sviluppo di individui maschi è inferiore al 20% (dato che *D. magna* [Straus, 1820] fa sviluppare esemplari maschi quando si trova in condizioni di stress, per mettere in pratica una riproduzione sessuata in grado di produrre uova quiescenti, solitamente in coppia) e se c'è stata una produzione di prole maggiore o uguale di 60. Inoltre, il coefficiente di variazione tra il numero di nuovi nati nei controlli non deve superare il 20%.

I risultati vengono riportati come valore totale di nuovi nati vivi prodotti da ogni singolo genitore, di cui poi viene calcolata la media per ogni concentrazione. Si confronta quindi il valore ottenuto nel controllo e nelle concentrazioni testate attraverso il test sulla varianza di Dunnett (ISO, 2000): la più bassa concentrazione che produce una risposta statisticamente differente dal controllo viene definita *LOEC (Lowest Observed Effect Concentration)*, mentre la più alta concentrazione al di sotto della *LOEC* e che dunque è statisticamente simile al valore del controllo, prende il nome di *NOEC (No Observed Effect Concentration)*.

Per tutte le elaborazioni statistiche che i dati necessitano, verrà seguito lo schema procedurale riportato in Figura 19, che ben esplica le alternative considerate.

## Risultati

### Risultati per il livello I – tossicità acuta

Livello I – risultati per le acque dolci

*Test di crescita algale con P. subcapitata ((Korshikov) F.Hindák 1990)*

Per prima cosa si riportano i valori ottenuti nel controllo positivo (Tabella 5), in cui la sostanza tossica è il bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ). Si rimanda all'Allegato 8 per i grafici riguardanti le modificazioni al rateo di crescita e la curva d'inibizione.

*Tabella 5: valori per il test acuto di 72 ore ottenuti con Pseudokirchneriella subcapitata ((Korshikov) F.Hindák 1990), sottoposta a diverse concentrazioni di bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ), che vanno a fungere da controllo positivo, contro cui confrontare i dati relativi alla sostanza test. La prima colonna riporta i valori di EC, rappresentanti rispettivamente un effetto di inibizione di crescita del 10% ( $EC_{10}$ ), 20% ( $EC_{20}$ ) e 50% ( $EC_{50}$ ). Le concentrazioni di effetto sono riportate in grassetto in seconda colonna mentre i limiti confidenziali al 95% in terza e quarta colonna. Tutti i valori sono espressi in mg/L.*

<b>P. subcapitata – controllo positivo (<math>K_2Cr_2O_7</math>)</b>		<b>Limiti di confidenza al 95%</b>	
<b>EC</b>	<b>mg/L</b>	Inferiore	Superiore
<b>10</b>	<b>0,57</b>	0,47	0,70
<b>20</b>	<b>0,69</b>	0,59	0,81
<b>50</b>	<b>0,99</b>	0,90	1,09

A questi seguono i valori per la sostanza test, la Pappetta AB57 (Tabella 6), con cui poter effettuare un primo confronto. Anche in questo caso, sono presenti in Allegato 8 i grafici relativi.

*Tabella 6: valori per il test acuto di 72 ore ottenuti con Pseudokirchneriella subcapitata ((Korshikov) F.Hindák 1990), sottoposta a diverse concentrazioni di Pappetta AB57. La prima colonna riporta i valori di EC, rappresentanti rispettivamente un effetto di inibizione di crescita del 10% ( $EC_{10}$ ), 20% ( $EC_{20}$ ) e 50% ( $EC_{50}$ ). Le concentrazioni di effetto sono riportate in grassetto in seconda colonna mentre i limiti confidenziali al 95% in terza e quarta colonna. Tutti i valori sono espressi in mg/L.*

<b>Pseudokirchneriella subcapitata – AB57</b>		<b>Limiti di confidenza al 95%</b>	
<b>EC</b>	<b>mg/L</b>	Inferiore	Superiore
<b>10</b>	<b>9,3</b>	4,6	18,8
<b>20</b>	<b>16,5</b>	9,5	28,4
<b>50</b>	<b>49,1</b>	35,5	67,9

*Test di immobilizzazione con D. magna (Straus, 1820)*

I valori ottenuti con il controllo positivo per questo test, in cui la sostanza tossica di riferimento è il rame, vengono esposti in Tabella 7. La sopravvivenza nel controllo negativo fu del 100%.

Tabella 7: dati per il controllo positivo riguardo il test acuto di immobilizzazione a 48 ore con *D. magna* (Straus, 1820). La sostanza tossica è rame. Il valore di  $EC_{50}$  viene riportato in seconda colonna in  $\mu\text{g/L}$ , mentre in terza e quarta colonna sono presenti i limiti di confidenza al 95%.

<b>D. magna – controllo positivo (rame)</b>		<b>Limiti di confidenza al 95%</b>	
<b>EC</b>	<b><math>\mu\text{g/L}</math></b>	Inferiore	Superiore
<b>50</b>	<b>71</b>	58	88

I risultati ottenuti con il test di immobilizzazione con *D. magna* (Straus, 1820) vengono riportati di seguito (Tabella 8, Allegato 9 per la schermata restituita dal programma DOS di elaborazione). È da tener presente che i limiti fiduciali calcolati per il valore mostrato non vengono riportati essendo non attendibili, in quanto la curva che modella i dati è troppo pendente.

Tabella 8: risultati ottenuti con il test di tossicità acuta su *D. magna* (Straus, 1820). La prima colonna riporta tutte le concentrazioni testate, la cui unità di misura è  $\text{mg/L}$ . Nella seconda colonna il numero di individui esposti, sempre pari a 20. L'ultima colonna infine mostra il numero di individui trovati immobili al termine delle 48 ore di test. In conclusione, viene riportata la stima calcolata dal software EPA Trimmed Spearman Karber, v3.1 della quota di  $EC_{50}$ , pari a 316,23  $\text{mg/L}$ . Si tenga presente che siccome le proporzioni di mortalità non erano monotonicamente crescenti, sono stati utilizzati degli aggiustamenti prima di calcolare la stima.

<b>Concentrazione (<math>\text{mg/L}</math>)</b>	<b>Numero di individui esposti</b>	<b>Mortalità</b>
Controllo negativo	20	2
1	20	3
10	20	3
100	20	0
1000	20	20
<b>Stima Spearman-Karber:</b>	<b><math>EC_{50}</math>:</b>	<b>316,23 <math>\text{mg/L}</math></b>

Livello I – risultati per le acque salate

*Test Microtox® su bioluminescenza del batterio Aliivibrio fischeri (Beijerinck, 1889)*

Per prima cosa, è utile riportare i dati ottenuti dal controllo positivo con solfato di zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ), in Tabella 9, interessanti per un confronto con quelli sulle sostanze esaminate. Questi valori vengono anche sfruttati per controllare la validità del lotto di batteri utilizzato, che viene confermata solo se il valore di  $EC_{50}$  con zinco si trova tra 0,6  $\text{mg}(\text{Zn}^{2+})/\text{L}$  e 2,2  $\text{mg}(\text{Zn}^{2+})/\text{L}$ , cosa che effettivamente avviene ( $EC_{50} = 2,14 \text{ mg}(\text{Zn}^{2+})/\text{L}$ ).

Tabella 9: risultati ottenuti dal test Microtox® per il controllo positivo su bioluminescenza del batterio Aliivibrio fischeri (Beijerinck, 1889), espressi come  $\text{mg}(\text{Zn}^{2+})$  effettivi. La sostanza tossica è solfato di zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) e il medium utilizzato è acqua "ASTM" (Allegato 4). La colonna con l'etichetta " $EC_{50}$ " riporta la concentrazione che causa una riduzione della bioluminescenza del 50%. Discorso del

tutto analogo per la colonna di "EC<sub>20</sub>", dove però la riduzione della bioluminescenza è del 20%. "c.r. 95%" indica i limiti di confidenza al 95% per i valori adiacenti. Viene considerato solo il tempo a 15 minuti.

Sostanza	Medium	15 minuti							
		EC <sub>50</sub> (mg/L)		c.r. 95% (mg/L)		EC <sub>20</sub> (mg/L)		c.r. 95% (mg/L)	
ZnSO <sub>4</sub>	ASTM	<b>2,14</b>		1,99	2,31	<b>0,898</b>		0,798	1,01

Per tutti i test Microtox® effettuati sulla sostanza completa, non è mai stato possibile calcolare il valore di EC<sub>50</sub>, per via della bassa tossicità della Pappetta AB57 esaminata. Si è quindi optato per riportare il valore di EC<sub>20</sub>, che rappresenta la concentrazione a cui si è osservato una riduzione pari al 20% della bioluminescenza. Per i test condotti con il cloruro di benzalconio si riportano tanto i valori di EC<sub>50</sub> quanto i valori di EC<sub>20</sub>. I test, con la metodologia Microtox®, restituiscono i seguenti risultati, riportati suddivisi per tempistiche, dopo 5 minuti dall'avvio del saggio, dopo 15 e dopo 30 minuti (Tabella 10).

Tabella 10: risultati ottenuti dal test Microtox® su bioluminescenza del batterio *Aliivibrio fischeri* (Beijerinck, 1889). La sostanza tossica e il medium utilizzato sono indicati di volta in volta nelle colonne più a sinistra. Le colonne con l'etichetta "EC<sub>50</sub>" riportano, quando possibile, la concentrazione che causa una riduzione della bioluminescenza del 50%. Discorso del tutto analogo per le colonne di "EC<sub>20</sub>", dove però la riduzione della bioluminescenza è del 20%. "c.r. 95%" indica i limiti di confidenza al 95% per i valori adiacenti. La "Conc. Effe. Max" riporta la più alta concentrazione cui i batteri sono stati sottoposti e in corrispondenza la percentuale di inibizione della bioluminescenza più alta che si è rilevata, con la rispettiva deviazione standard ("Sigma"). Le tre tabelle seguenti sono in analogia per quanto riguarda la definizione delle colonne; riportano in ordine i dati dopo 5 minuti, dopo 15 e dopo 30 minuti.

Sostanza	Medium	5 minuti									
		EC <sub>50</sub> (mg/L)		c.r. 95% (mg/L)		EC <sub>20</sub> (mg/L)		c.r. 95% (mg/L)		Conc. Effe. Max (mg/L)	% effe. Max
AB57	ASTM	<b>NC</b>	-	-	<b>625,31</b>		549,25	711,91	1000	33,02	5,1
Clor. Benz.	ASTM	<b>0,639</b>	0,568	0,718	<b>0,236</b>		0,212	0,261	0,989	69,91	4,8
Clor. Benz.	NaCl 20‰	<b>0,243</b>	0,209	0,285	<b>0,112</b>		0,092	0,136	0,989	91,33	7,0

Sostanza	Medium	15 minuti									
		EC <sub>50</sub> (mg/L)		c.r. 95% (mg/L)		EC <sub>20</sub> (mg/L)		c.r. 95% (mg/L)		Conc. Effe. Max (mg/L)	% effe. Max
AB57	ASTM	<b>NC</b>	-	-	<b>616,83</b>		554,82	685,76	1000	32,68	4,3
Clor. Benz.	ASTM	<b>0,433</b>	0,377	0,498	<b>0,165</b>		0,145	0,188	0,989	82,94	5,1
Clor. Benz.	NaCl 20‰	<b>0,162</b>	0,143	0,183	<b>0,055</b>		0,047	0,065	0,989	91,27	0,8

Sostanza	Medium	30 minuti									
		EC <sub>50</sub> (mg/L)		c.r. 95% (mg/L)		EC <sub>20</sub> (mg/L)		c.r. 95% (mg/L)		Conc. Effe. Max (mg/L)	% effe. Max
AB57	ASTM	<b>NC</b>	-	-	<b>678,11</b>		573,24	802,16	1000	27,20	5,4
Clor. Benz.	ASTM	<b>0,488</b>	0,421	0,567	<b>0,173</b>		0,150	0,199	0,989	80,12	6,8
Clor. Benz.	NaCl 20‰	<b>0,108</b>	0,091	0,129	<b>0,036</b>		0,028	0,047	0,989	93,85	0,8

#### Test di crescita algale con *D. tertiolecta* (Butcher, 1959) e *P. tricornutum* (Bohlin, 1898)

Si vanno a mostrare di seguito i risultati per le due specie di microalghe considerate, sempre tenendo presente che l'elaborazione dati avviene seguendo il metodo LogNorm. Anche in questi casi, il valore 0,01 ha sostituito i tassi di crescita qualora fossero stati misurati minori o uguali a 0.

Si inizia con i risultati ottenuti dal controllo positivo, anche nel caso di *D. tertiolecta* (Butcher, 1959), realizzato con bicromato di potassio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) (Tabella 11). Si rimanda all'Allegato 10 per i grafici riguardanti le modificazioni al tasso di crescita e la curva d'inibizione.

Tabella 11: valori per il test acuto di 72 ore ottenuti con *Dunaliella tertiolecta* (Butcher, 1959), sottoposta a diverse concentrazioni di bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ), che vanno a fungere da controllo positivo, contro cui confrontare i dati relativi alla sostanza test. La prima colonna riporta i valori di EC, rappresentanti rispettivamente un effetto di inibizione di crescita del 10% ( $EC_{10}$ ), 20% ( $EC_{20}$ ) e 50% ( $EC_{50}$ ). Le concentrazioni di effetto sono riportate in grassetto in seconda colonna mentre i limiti confidenziali al 95% in terza e quarta colonna. Tutti i valori sono espressi in mg/L.

<b><i>D. tertiolecta</i> – controllo positivo (<math>K_2Cr_2O_7</math>)</b>		<b>Limiti di confidenza al 95%</b>	
<b>EC</b>	<b>mg/L</b>	Inferiore	Superiore
<b>10</b>	<b>7,1</b>	6,6	7,7
<b>20</b>	<b>8,9</b>	8,4	9,4
<b>50</b>	<b>13,8</b>	13,4	14,2

Si ha, a seguire, ciò che si è ottenuto dal test con la sostanza indagata, la Pappetta AB57 (Tabella 12). I grafici relativi il tasso di crescita e la curva d'inibizione si trovano in Allegato 10.

Tabella 12: valori per il test acuto di 72 ore ottenuti con *Dunaliella tertiolecta* (Butcher, 1959), sottoposta a diverse concentrazioni di Pappetta AB57. La prima colonna riporta i valori di EC, rappresentanti rispettivamente un effetto di inibizione di crescita del 10% ( $EC_{10}$ ), 20% ( $EC_{20}$ ) e 50% ( $EC_{50}$ ). Le concentrazioni di effetto sono riportate in grassetto in seconda colonna mentre i limiti confidenziali al 95% in terza e quarta colonna. Tutti i valori sono espressi in mg/L.

<b><i>Dunaliella tertiolecta</i> – AB57</b>		<b>Limiti di confidenza al 95%</b>	
<b>EC</b>	<b>mg/L</b>	Inferiore	Superiore
<b>10</b>	<b>333</b>	152	728
<b>20</b>	<b>602</b>	323	1125
<b>50</b>	<b>1872</b>	948	3695

Per il test con *P. tricornutum* (Bohlin, 1898), il valore di  $EC_{50}$  del controllo positivo con bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ) non è stato calcolabile, come conseguenza del fatto che la concentrazione saggiata non raggiunge il minimo necessario di 50% di effetto; si riesce ad avere solo il risultato di  $EC_{20}$ , pari a 11,05 mg/L. Si procede dunque a riportare i risultati per la sostanza completa (Tabella 13) e per il solo biocida (cloruro di benzalconio) (Tabella 14). Presenti in Allegato 11 i grafici per i tassi di crescita e la curva d'inibizione.

Tabella 13: valori per il test acuto di 72 ore ottenuti con *Phaedactylum tricornutum* (Bohlin, 1898), sottoposta a diverse concentrazioni di Pappetta AB57. La prima colonna riporta i valori di EC, rappresentanti rispettivamente un effetto di inibizione di crescita del 10% ( $EC_{10}$ ), 20% ( $EC_{20}$ ) e 50% ( $EC_{50}$ ). Le concentrazioni di effetto sono riportate in grassetto in seconda colonna mentre i limiti confidenziali al 95% in terza e quarta colonna. Tutti i valori sono espressi in mg/L.

<b><i>Phaedactylum tricornutum</i> – AB57</b>		<b>Limiti di confidenza al 95%</b>	
<b>EC</b>	<b>mg/L</b>	Inferiore	Superiore
<b>10</b>	<b>687</b>	46	10368
<b>20</b>	<b>733</b>	78	6918
<b>50</b>	<b>829</b>	215	3196



Tabella 14: valori per il test acuto di 72 ore ottenuti con *Phaedactylum tricornutum* (Bohlin, 1898), sottoposta a diverse concentrazioni di benzalconio cloruro. La prima colonna riporta i valori di EC, rappresentanti rispettivamente un effetto di inibizione di crescita del 10% (EC<sub>10</sub>), 20% (EC<sub>20</sub>) e 50% (EC<sub>50</sub>). Le concentrazioni di effetto sono riportate in grassetto in seconda colonna mentre i limiti confidenziali al 95% in terza e quarta colonna. Tutti i valori sono espressi in mg/L.

<b><i>Phaedactylum tricornutum</i> – benzalconio cloruro</b>		<b>Limiti di confidenza al 95%</b>	
<b>EC</b>	<b>mg/L</b>	Inferiore	Superiore
<b>10</b>	<b>0,218</b>	0,205	0,232
<b>20</b>	<b>0,244</b>	0,233	0,255
<b>50</b>	<b>0,303</b>	0,285	0,322

*Test di mortalità con Acartia (Acanthacartia) tonsa (Dana, 1849)*

Per prima cosa si riporta il dato ottenuto dal controllo positivo, in [Tabella 15](#), messo in atto utilizzando 3,5-DCP (diclorofenolo) come sostanza tossica. La sopravvivenza nel controllo negativo fu del 95%.

Tabella 15: dati per il controllo positivo riguardo il test acuto di mortalità a 48 ore con *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849). La sostanza tossica di riferimento è 3,5-DCP (diclorofenolo). Il valore di EC<sub>50</sub> viene riportato in seconda colonna in mg/L, mentre in terza e quarta colonna sono presenti i limiti di confidenza al 95%.

<b><i>Acartia (Acanthacartia) tonsa</i> – controllo positivo (3,5-DCP)</b>		<b>Limiti di confidenza al 95%</b>	
<b>EC</b>	<b>mg/L</b>	Inferiore	Superiore
<b>50</b>	<b>0,5</b>	0,4	0,6

I risultati avuto dal test di mortalità effettuato con *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849), della durata di 48 ore, vengono riportati nella tabella seguente in modo sintetico ([Tabella 16](#), [Allegato 12](#) per la schermata restituita dal programma DOS di elaborazione).

Tabella 16: risultati ottenuti con il test di tossicità acuta su *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849). La prima colonna riporta tutte le concentrazioni testate, la cui unità di misura è mg/L. Nella seconda colonna il numero di individui esposti; compare il valore "100" in quanto tutti i risultati ottenuti sono stati convertiti in percentuale per una più facile elaborazione. Si rimanda all'[Allegato 12](#) per visualizzare i risultati effettivi. L'ultima colonna infine riporta il numero di individui trovati morti al termine delle 48 ore di test; il valore fa riferimento alla porzione percentuale di morti sul totale delle tre repliche. In conclusione, viene riportata la stima calcolata dal software EPA Trimmed Spearman Karber, v3.1 della quota di EC<sub>50</sub>, pari a 145,03 mg/L, con le corrispondenti soglie di sicurezza al 95%.

<b>Concentrazione (mg/L)</b>	<b>Numero di individui esposti</b>	<b>Mortalità</b>
Controllo negativo	100	0
1	100	17
10	100	17
100	100	33

1000	100	100
<b>Stima Spearman-Karber:</b>	<b>EC<sub>50</sub>:</b>	<b>145,03 mg/L</b>
Limiti di confidenza al 95%:	102,87	204,48

## Risultati per il livello II – tossicità a lungo termine (sub-cronica e cronica)

### Test di sviluppo larvale con *Radix auricularia* (Linnaeus, 1758)

Proseguendo con le matrici dulciaquicole, il successivo è il test che vede impiegata *R. auricularia* (Linnaeus, 1758). Subito sotto, in Tabella 17, vengono riportati i dati ottenuti nel controllo.

*Tabella 17: risultati restituiti dal controllo per il test con R. auricularia (Linnaeus, 1758), ottenuti verificando il raggiungimento dello stadio di sviluppo embrionale corretto in organismi a contatto con il solo "Medium Radix", senza l'inserimento di alcun tossico. Nella prima colonna sono indicate le repliche, a cui è associato il numero di uova conteggiato al momento dell'inizio del test. In terza e quarta colonna sono riportate le uova che si trovano allo stadio di shell formation all'ottavo giorno, con la corrispondente % sul totale. Analogamente viene fatto per lo stadio di capsule rupture in quinta e sesta colonna.*

<b>Controllo negativo</b>		<b>Shell formation</b>		<b>Capsule rupture</b>	
Replica	N° uova	8° giorno	%	13° giorno	%
1	54	54	100	46	85
2	44	44	100	38	86
3	65	64	98	54	83

Si prosegue col riportare i dati ottenuti con il test vero e proprio nelle Tablelle 18, 19 e 20, partendo dalla concentrazione più elevata, di 10 mg/L, per finire con quella più bassa, di 0,1 mg/L.

*Tabella 18: risultati restituiti dal test con R. auricularia (Linnaeus, 1758), ottenuti verificando il raggiungimento dello stadio di sviluppo embrionale corretto in organismi a contatto con una soluzione di "Medium Radix", al cui interno sono presenti 10 mg/L di Pappetta AB57. Nella prima colonna sono indicate le repliche, a cui è associato il numero di uova conteggiato al momento dell'inizio del test. In terza e quarta colonna sono riportate le uova che si trovano allo stadio di shell formation all'ottavo giorno, con la corrispondente % sul totale. Analogamente viene fatto per lo stadio di capsule rupture in quinta e sesta colonna.*

<b>Pappetta AB57 10 mg/L</b>		<b>Shell formation</b>		<b>Capsule rupture</b>	
Replica	N° uova	8° giorno	%	13° giorno	%
1	46	46	100	44	96
2	18	17	94	17	94
3	19	19	100	19	100

*Tabella 19: risultati restituiti dal test con R. auricularia (Linnaeus, 1758), ottenuti verificando il raggiungimento dello stadio di sviluppo embrionale corretto in organismi a contatto con una soluzione di "Medium Radix", al cui interno è presente 1 mg/L di Pappetta AB57. Nella prima colonna sono indicate le repliche, a cui è associato il numero di uova conteggiato al momento dell'inizio del test. In terza e quarta colonna sono riportate le uova che si trovano allo stadio di shell formation all'ottavo giorno, con la corrispondente % sul totale. Analogamente viene fatto per lo stadio di capsule rupture in quinta e sesta colonna.*

<b>Pappetta AB57 1 mg/L</b>		<b>Shell formation</b>		<b>Capsule rupture</b>	
-----------------------------	--	------------------------	--	------------------------	--

Replica	N° uova	8° giorno	%	13° giorno	%
1	43	42	98	41	95
2	21	21	100	19	90
3	32	32	100	32	100

Tabella 20: risultati restituiti dal test con *R. auricularia* (Linnaeus, 1758), ottenuti verificando il raggiungimento dello stadio di sviluppo embrionale corretto in organismi a contatto con una soluzione di "Medium Radix", al cui interno sono presenti 0,1 mg/L di Pappetta AB57. Nella prima colonna sono indicate le repliche, a cui è associato il numero di uova conteggiato al momento dell'inizio del test. In terza e quarta colonna sono riportate le uova che si trovano allo stadio di shell formation all'ottavo giorno, con la corrispondente % sul totale. Analogamente viene fatto per lo stadio di capsule rupture in quinta e sesta colonna.

Pappetta AB57 0,1 mg/L		Shell formation		Capsule rupture	
Replica	N° uova	8° giorno	%	13° giorno	%
1	42	42	100	40	95
2	31	31	100	29	94
3	32	32	100	20	63

L'analisi statistica dei dati, come indicato nel paragrafo di "Materiali e metodi", viene svolta utilizzando il primo metodo dei due proposti, effettuando un'analisi dell'uguaglianza delle varianze, con il software "Past" (sviluppato dal Museo di Storia Naturale dell'Università di Oslo, <https://www.nhm.uio.no/english/research/infrastructure/past/>), tra il controllo negativo e dati restituiti dalle varie concentrazioni di tossico. I risultati ottenuti si possono vedere in Allegato 13 sia per la prima fase, di *shell formation* che per quella di *capsule rupture*. Nel primo caso, il valore del parametro statistico  $F$ , ottenuto con un'analisi ANOVA a una via, è pari a 0,437 e il  $p$  (same) risulta di 0,7326; per quanto riguarda il secondo stadio,  $F = 1,456$  mentre  $p$  (same) risulta essere 0,2975. Di conseguenza, le distribuzioni non presentano differenze statisticamente significative, com'è intuibile anche dall'osservazione degli istogrammi in Figura 30 e 31.

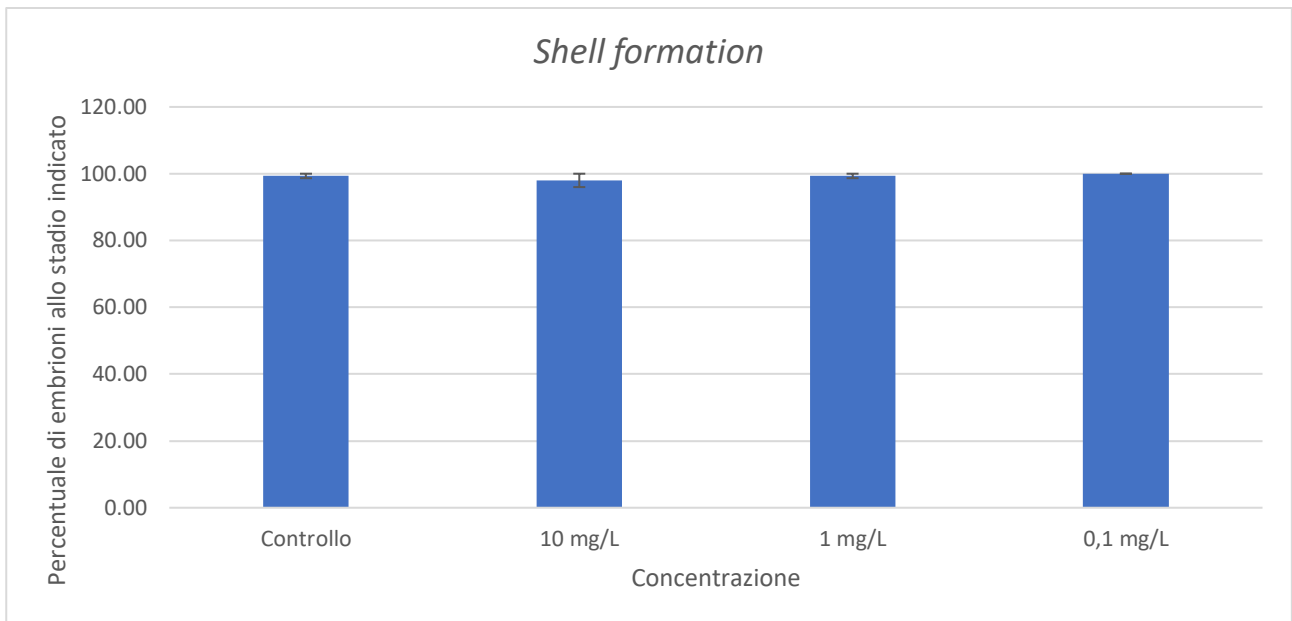


Figura 30: istogramma che riporta per percentuali di effetto (in ordinata) corrispondenti al controllo e alle tre concentrazioni testate con *R. auricularia* (Linnaeus, 1758), per quanto riguarda il raggiungimento dello stadio di shell formation durante l'ottavo giorno, da parte degli embrioni sottoposti a test. In cima a ogni colonna compare la barra d'errore, calcolata utilizzando l'errore standard.

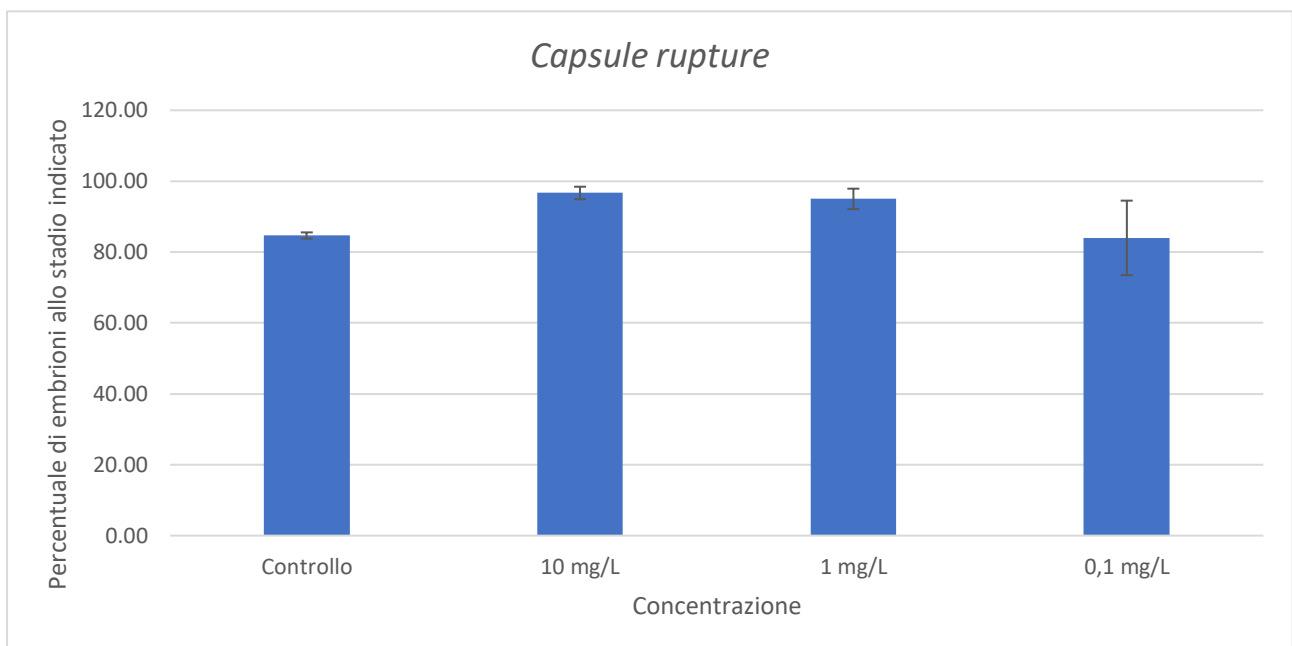


Figura 31: istogramma che riporta per percentuali di effetto (in ordinata) corrispondenti al controllo e alle tre concentrazioni testate con *R. auricularia* (Linnaeus, 1758), per quanto riguarda il raggiungimento dello stadio di capsule rupture durante il tredicesimo giorno, da parte degli embrioni sottoposti a test. In cima a ogni colonna compare la barra d'errore, calcolata utilizzando l'errore standard.

#### Test cronico di riproduzione con *Daphnia magna* (Straus, 1820)

Si conclude la parte di risultati relativi al livello II della procedura ITS riportando gli esiti del test cronico effettuato su *D. magna* (Straus, 1820) (Tabella 21). Per una presentazione dei dati per esteso, si rimanda all'Allegato 14.

Tabella 21: risultati ottenuti con il test cronico di produzione con *Daphnia magna* (Straus, 1820). La prima colonna elenca i parametri d'interesse che sono stati rilevati: "Sopravvivenza osservata" riporta la percentuale di individui ancora vivi alla fine dei 21 giorni di test, rispetto a quelli utilizzati all'inizio (non considera la prole), l'area dei "Piccoli prodotti" riporta la media, con rispettive deviazioni standard e coefficiente di variazione, del numero di giovanili prodotti da ciascun individuo. Il "Numero di eventi riproduttivi" indica per quante volte sono stati ritrovati dei nuovi piccoli nel becher, per ciascun individuo.

Parametro		Controllo	1 mg/L	0,1 mg/L
<b>Sopravvivenza osservata</b>		100	100	100
<b>Piccoli prodotti</b>	<b>Media</b>	30,8	24,8	26,2
	<b>Deviazione standard</b>	4,803	5,308	6,779
	<b>Coefficiente di variazione</b>	0,156	0,214	0,259
<b>Numero medio di eventi riproduttivi</b>		3,8	3,4	3,8

Sottostando a quanto già riportato nel paragrafo di "Materiali e metodi" (Figura 19), viene per prima cosa verificata la normalità dei dati ottenuti con il test di Shapiro-Wilk, tramite il software "Past" (sviluppato dal Museo di Storia Naturale dell'Università di Oslo, <https://www.nhm.uio.no/english/research/infrastructure/past/>): i parametri che vengono calcolati dal software sono riportati in Allegato 15.

Dato che per almeno una delle distribuzioni il parametro soglia  $p$  (normal) (0,05) non viene superato, viene verificata la non-normalità dei dati e seguendo ancora quanto assunto in Figura 19, si procede con un'analisi della varianza attraverso il test di Kruskal-Wallis (basato sull'uguaglianza delle mediane dei dati). I parametri che il software "Past" calcola vengono riportati in Allegato 15.

Dato che il valore di  $p$  (same) è maggiore della soglia arbitraria di 0,05, si afferma che le varianze non hanno differenze statisticamente significative e che dunque i risultati ottenuti nei tre casi esaminati sono da ritenersi uguali.

Seguendo le linee guida protocollari, il test cronico con *Daphnia magna* (Straus, 1820), tra le altre cose, viene definito accettabile quando nel controllo avviene una produzione di prole maggiore o uguale ai 60 individui, cosa che non avviene mai in questo particolare caso.

Ciò viene in qualche modo giustificato se si considera che il test è stato ripetuto due volte, utilizzando organismi provenienti da più colture, che hanno rispettato i criteri di accettabilità previsti dal test acuto con la stessa specie. Il risultato ottenuto nel controllo del test cronico è probabilmente da attribuirsi alla bassa capacità riproduttiva del ceppo commerciale impiegato. Infatti, seppure gli organismi vengano allevati in maniera indipendente e autonoma, per allestire le colture si è dovuti partire da materiale fornito da

rivenditori autorizzati che probabilmente presentano delle forme di resistenza. Ragion per cui si è comunque ritenuto opportuno accettare i risultati del test in questione.

## Discussione

In linea generale, prima di andare ad approfondire i risultati ottenuti per ciascun test, è utile ricordare le soglie del regolamento *CLP*, cui si è già spesso fatto riferimento, seguendo quanto viene riportato in [Figura 32](#), per visualizzare al meglio il procedimento. Per cominciare, questa normativa impone come limite per classificare una sostanza come tossica a livello acuto la concentrazione di  $EC_{50} < 1 \text{ mg/L}$ ; se  $EC_{50} > 1 \text{ mg/L}$ , non è necessaria una classificazione per la tossicità acuta. In nessuno dei casi presi in esame avviene il superamento di tale soglia e dunque la Pappetta AB57 pare classificabile come sostanza che non provoca tossicità di tipo acuto.

Per quanto riguarda le soglie di tossicità cronica indicate dal *CLP*, considerando quella più alta tra le tre categorie proposte ("*Chronic 3*"), non avviene nemmeno in queste occasioni il superamento del valore limite di *NOEC* ( $1 \text{ mg/L}$ ) e dunque, a maggior ragione, non avverrà per le categorie inferiori. Conseguentemente, la sostanza non necessita nemmeno di una classificazione a livello cronico.

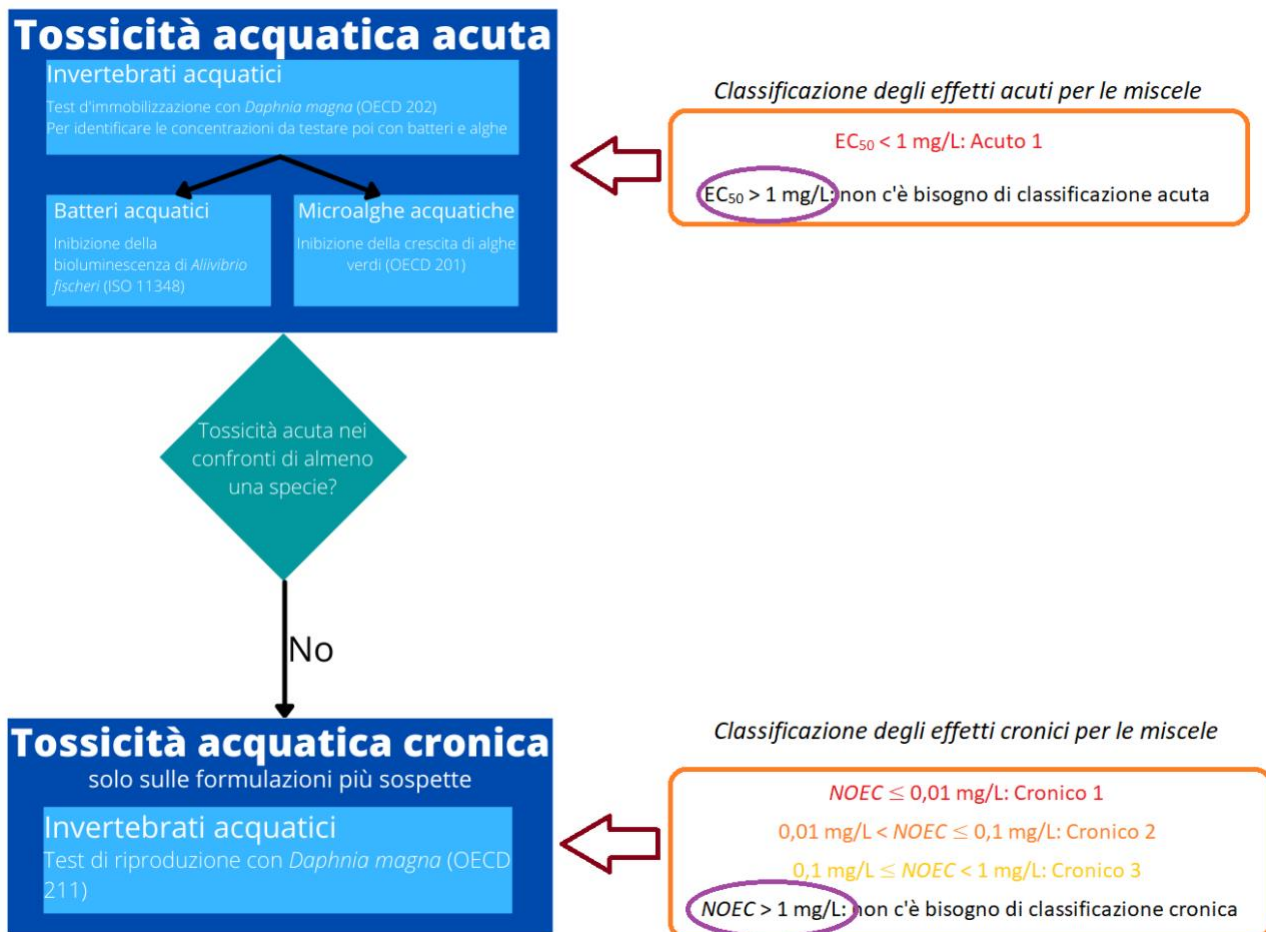


Figura 32: rappresentazione schematica della procedura seguita per indagare la tossicità della Pappetta AB57. Vengono riportate solo le alternative che di volta in volta, alla luce dei risultati, sono state perseguite. Non presentando inizialmente tossicità acuta (ovale viola in alto,  $EC_{50} > 1 \text{ mg/L}$  per tutti i test considerati) si sono messe in pratica le analisi indaganti tossicità cronica. Anche per le situazioni a lungo termine la soglia non viene superata (ovale viola in basso,  $NOEC > 1 \text{ mg/L}$  per tutti i test considerati) e dunque la sostanza può venire definita come non pericolosa per l'ambiente, secondo i limiti del regolamento *CLP* (Commissione Europea, 2008).

## Discussione per il livello I – tossicità acuta

### Livello I – discussione per le acque dolci

#### *Test di crescita algale con P. subcapitata ((Korshikov) F.Hindák 1990)*

Nello specifico, il test acuto sulla microalga di acqua dolce *Pseudokirchneriella subcapitata* ((Korshikov) F.Hindák 1990) porta una prima conferma riguardo la bassa tossicità della sostanza, visto che le concentrazioni di effetto per la Pappetta AB57 nella sua interezza sono di due ordini di grandezza maggiori rispetto a quelle che si ottengono col controllo positivo di bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ). Per visualizzare quanto appena affermato, si prendano in considerazione le Tabelle 5 e 6, dalle quali è facile confrontare i valori di  $EC_{50}$  per il bicromato di potassio, pari a 0,99 mg/L, con quello della Pappetta AB57, di 49,1 mg/L. Questa è, fra tutte, la concentrazione più bassa che si ottiene e dunque pare che la specie *P. subcapitata* ((Korshikov) F.Hindák 1990) sia quella più sensibile all'agente.

A una prima occhiata i valori possono sembrare rassicuranti ma non vanno considerati subito tali se si tiene presente il fatto che il prodotto viene utilizzato massivamente, siccome le sue istruzioni per l'uso prevedono che l'intera superficie da pulire venga attentamente ricoperta con uno strato di qualche millimetro. Si evince che sia facile adoperare grandi quantità di agente pulente, soprattutto per lavori importanti.

#### *Test di immobilizzazione con D. magna (Straus, 1820)*

Il test acuto di mortalità con *D. magna* (Straus, 1820) si sposta su un ordine di grandezza ancora superiore, dato che il valore di  $EC_{50}$  ricade su 316,23 mg/L (Tabella 7); ulteriore testimonianza a supporto della tesi iniziale sulla bassa tossicità del prodotto complessivo. È interessante anche il confronto con la tossicità indotta dal rame, nel controllo positivo, dove il valore di  $EC_{50}$  si attesta sui 71  $\mu g/L$ , di molti ordini di grandezza al di sotto rispetto alla soglia rilevata per la Pappetta AB57, che risulta dunque molto meno tossica per quest'organismo.

### Livello I – discussione per le acque salate

#### *Test Microtox® su bioluminescenza del batterio Aliivibrio fischeri (Beijerinck, 1889)*

Il test esplorativo Microtox® fornisce subito una prima idea relativa al fatto che la sostanza, nel suo complesso, non sia particolarmente tossica nemmeno per il comparto delle acque salate, dato che le concentrazioni di effetto tangibile ( $EC_{20}$ ) vengono registrate poco al di sotto all'ordine di grandezza di 1 g/L (Tabella 10). Si segnala che non è stato possibile calcolare il valore di  $EC_{50}$ , in quanto questa soglia non è mai stata raggiunta durante i saggi con la sostanza completa.

Inoltre, l'ordine di grandezza non è nemmeno paragonabile, se si tenta di mettere in pratica un confronto tra il controllo positivo con solfato di zinco ( $ZnSO_4$ ), dove la soglia di  $EC_{20}$  è pari a 0,898 mg/L (Tabella 9).

#### *Test di crescita algale con D. tertiolecta (Butcher, 1959) e P. tricornutum (Bohlin, 1898)*

Tali saggi, da ricordare che sono stati messi in pratica con la sostanza nella sua interezza, forniscono valori estremamente alti per *D. tertiolecta* (Butcher, 1959) (Tabella 12,  $EC_{50}$  relativo alla Pappetta: 1872 mg/L), da confrontare con il valore di  $EC_{50}$  ottenuto nel controllo positivo a base di bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ), pari



a 13,78 mg/L. Questa differenza, nonostante i limiti di confidenza al 95% siano molto ampi per il polimero oggetto di studio, è da considerarsi significativa e si può affermare con sicurezza che la sostanza non pare risultare tossica.

I dati rilevati con *P. tricornutum* (Bohlin, 1898) sono passibili di un'interpretazione analoga ai precedenti. La Pappetta AB57 non risulta tossica per questa specie, come evidenzia il confronto tra gli EC<sub>20</sub> calcolati per il controllo positivo, pari a 11,05 mg/L per il controllo positivo e quello ben più alto, uguale a 733 mg/L calcolato per il prodotto (Tabella 13).

È inoltre interessante osservare, sempre facendo riferimento al confronto dei dati ecotossicologici ottenuti con il test Microtox® e con le due microalghe d'acqua salata, che i valori di EC<sub>20</sub> si mantengono simili in tutti e tre i casi (rispettivamente: 678 mg/L, 602 mg/L e 733 mg/L). Considerando che l'orizzonte temporale massimo coperto dal test coi batteri è di 30 minuti e che invece quello microalgale si prolunga per 72 ore, si può affermare che la sostanza, nella sua interezza, abbia un rilascio costante, almeno entro l'arco di tempo considerato e che non ci siano picchi all'inizio o alla fine.

#### *Test di mortalità con Acartia (Acanthacartia) tonsa (Dana, 1849)*

Continuano sulla falsariga tutti di tutti i risultati ottenuti in precedenza quelli che vengono restituiti dal test acuto di 48 ore sul copepode *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849). Infatti, anche in questo caso, la soglia di tossicità acuta riportata dal regolamento CLP di EC<sub>50</sub> pari a 1 mg/L non viene superata e anzi ci si mantiene addirittura due ordini di grandezza al di sopra, visto che le elaborazioni statistiche sui dati del test restituiscono un valore di EC<sub>50</sub> uguale a 145,03 mg/L (Tabella 16). A ulteriore conferma, il confronto coi dati di EC<sub>50</sub> ottenuti nel controllo positivo, a base di 3,5-DCP (diclorofenolo), che restituiscono un valore di 0,5 mg/L, di gran lunga al di sotto rispetto a quello rilevato nel caso della sostanza oggetto d'indagine.

Nella loro totalità, i test acuti del livello I della procedura ITS messa in atto, restituiscono risultati confortanti, indicando una complessivamente bassa tossicità del prodotto in alte concentrazioni somministrate nel breve termine. Le concentrazioni indicate dalle linee guida europee (Commissione Europea, 2011) classificano una sostanza come pericolosa a breve termine per l'ambiente acquatico (Categoria "Acuto 1") quando il valore di EC<sub>50</sub> è minore o uguale di 1 mg/L, cosa che non succede mai nell'indagine relativa alla Pappetta AB57 completa.

#### *Discussione per il livello II – tossicità a lungo termine (sub-cronica e cronica)*

I risultati dei test incentrati su un orizzonte temporale più lungo, che prendono quindi in considerazione la tossicità cronica, di sviluppo larvale con *Radix auricularia* (Linnaeus, 1758) e di riproduzione con *Daphnia magna* (Straus, 1820) sostanzialmente confermano la bassa tossicità del prodotto, nel suo complesso.

#### *Test di sviluppo larvale con Radix auricularia (Linnaeus, 1758)*

Prolungando il periodo di tempo di esposizione e riducendo parallelamente le concentrazioni, il test sub-cronico con *R. auricularia* (Linnaeus, 1758) mette in luce che, fino alla concentrazione di 10 mg/L di tossico presente in soluzione, non sono rilevabili effetti tangibili, dato che l'analisi delle varianze non rileva differenze rispetto al controllo negativo (Allegato 13). Di conseguenza, si può affermare che la *NOEC (No Observable Effect Concentration)* sia maggiore di 10 mg/L e dunque che, per questo test, la sostanza in esame non raggiunga gli estremi per essere classificata come tossica a livello cronico, secondo quanto riportato dal regolamento CLP (Commissione Europea, 2008).

#### *Test cronico di riproduzione con Daphnia magna (Straus, 1820)*

Per concludere con le acque dolci, dal test cronico su *D. magna* (Straus, 1820), dopo l'elaborazione dei dati (Tabella 21), si può rilevare come sembra che sia presente un certo effetto sia alla concentrazione più alta di 1 mg/L che a quella più bassa di 0,1 mg/L; l'analisi statistica della varianza, effettuata col metodo di Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ), porta però ad affermare che le tre distribuzioni di dati avute come risultato siano statisticamente uguali e che dunque non sia possibile registrare un vero e proprio effetto sul crostaceo. Non si può dunque escludere che, in generale, la sostanza considerata non induca una situazione di stress sugli organismi ma è altrettanto vero che le soglie indicate nei regolamenti *REACH* e *CLP* non vengono mai superate, visto che il valore di *NOEC* calcolato è  $> 1$  mg/L. In base al regolamento *CLP*, non è dunque necessaria la classificazione come prodotto che determina tossicità cronica. Dal punto di vista ambientale questo dato indica che è molto improbabile rilevare effetti tossici in ambiente legati alla presenza della Pappetta AB57.

#### *Valutazione comparativa della Pappetta AB57 rispetto alla tossicità del cloruro di benzalconio*

I dati raccolti forniscono una prima indicazione di come il materiale, nella sua interezza, non sia particolarmente tossico per l'ambiente. È comunque noto dalla bibliografia che il cloruro di benzalconio, contenuto in quantità non indifferenti nella ricetta della Pappetta AB57, possiede delle importanti caratteristiche da biocida (Herruzo, Yela, & Vizcaino, 2015) e venga utilizzato in ambito medico per mantenere la sterilità dei medicinali (Domnina, Suslov, Kedik, Vorfolomeeva, & Meleshko, 2020). Rivedendo i dati riportati nel paragrafo 2 ("Materiali e metodi"), si ricorda che a ogni grammo di polimero corrispondono circa 0,85 mg di puro cloruro di benzalconio. Le successive analisi con la metodologia Microtox® vengono dunque messe in pratica sul solo biocida in acqua "ASTM" (Allegato 4) e dimostrano come effettivamente questo adempia con successo alla sua funzione, dato che le concentrazioni di effetto sono dell'ordine del decimo di milligrammo (Tabella 10).

Per visualizzare al meglio questo risultato, è utile osservare il grafico sottostante (Figura 33), che riporta un confronto tra gli effetti di tossicità rilevati con il test Microtox® per l'intera Pappetta AB57 e per il solo cloruro di benzalconio, entrambi in acqua ASTM. Da tener presente che la quantità di Pappetta è stata convertita in effettiva massa di biocida contenuta. Si può in prima analisi dedurre che, a parità di concentrazione di biocida,

se questo è presente all'interno dell'intera formulazione del prodotto, risulta meno tossico che quando libero in soluzione. È quindi probabile che il benzalconio cloruro sia mantenuto isolato e che non ci siano rilevanti rilasci, se viene utilizzato nella Pappetta AB57.

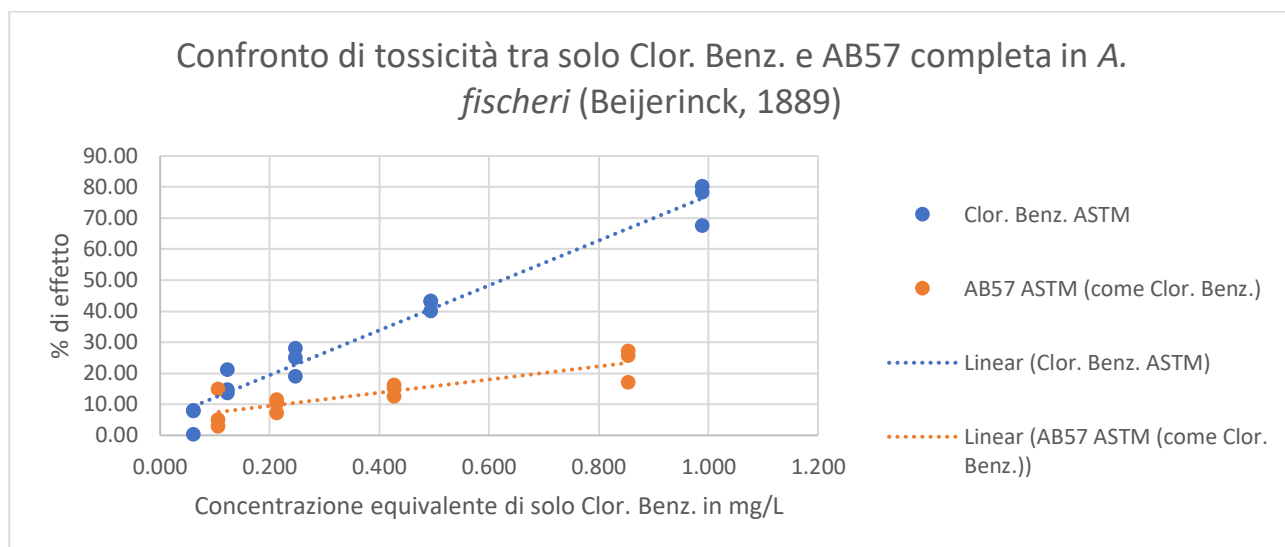


Figura 33: grafico a dispersione XY di confronto tra la tossicità acuta rilevata con il test Microtox® sui batteri bioluminescenti *Aliivibrio fischeri* (Beijerinck, 1889). In ascissa vengono riportate le concentrazioni, convertite tenendo conto della sola massa effettiva di cloruro di benzalconio presente nella formulazione, in modo che i dati fossero confrontabili. In ordinata sono presenti le percentuali di effetto, qui definite come inibizione della bioluminescenza dei microrganismi rispetto un bianco di riferimento costituito dal solo medium (acqua "ASTM" [Allegato 4], indicato in legenda). Per visualizzare al meglio la differenza di tossicità, vengono disegnate anche le rette di correlazione lineare tra le due serie di dati. Risulta evidente come la tossicità del puro cloruro di benzalconio sia più alta, dato che la sua retta resta sempre al di sopra di quella che considera la Pappetta AB57 nella sua interezza.

Si può osservare dai risultati ottenuti col test Microtox® in soluzione di cloruro di sodio (NaCl) al 20%, che la concentrazione di EC<sub>50</sub>, relativa al solo biocida (cloruro di benzalconio) si mantiene, anche in questo caso, nell'ordine dei decimi di milligrammo (Tabella 10). Non si può dunque escludere un effetto anche sulla componente salmastra degli ecosistemi acquatici e si procede perciò con la disamina dei risultati avuti dai test acuti microalgali.

Interessante è il risultato del test, effettuato sulla microalga *P. tricornutum* (Bohlin, 1898) ma utilizzando come tossico il solo biocida di cloruro di benzalconio. Il confronto può essere fatto solo con il valore di EC<sub>20</sub> (visto che nel controllo positivo non si raggiunge l'EC<sub>50</sub>), che in questo caso risulta essere ben più basso di quello del controllo positivo (11,05 mg/L), ovvero pari a 0,244 mg/L.

Si propone la stessa comparazione già vista precedentemente con il test Microtox®, tra i dati di tossicità relativi all'intera Pappetta AB57 (convertita in massa equivalente di biocida contenuto) e il solo cloruro di benzalconio, riportati in (Figura 34).

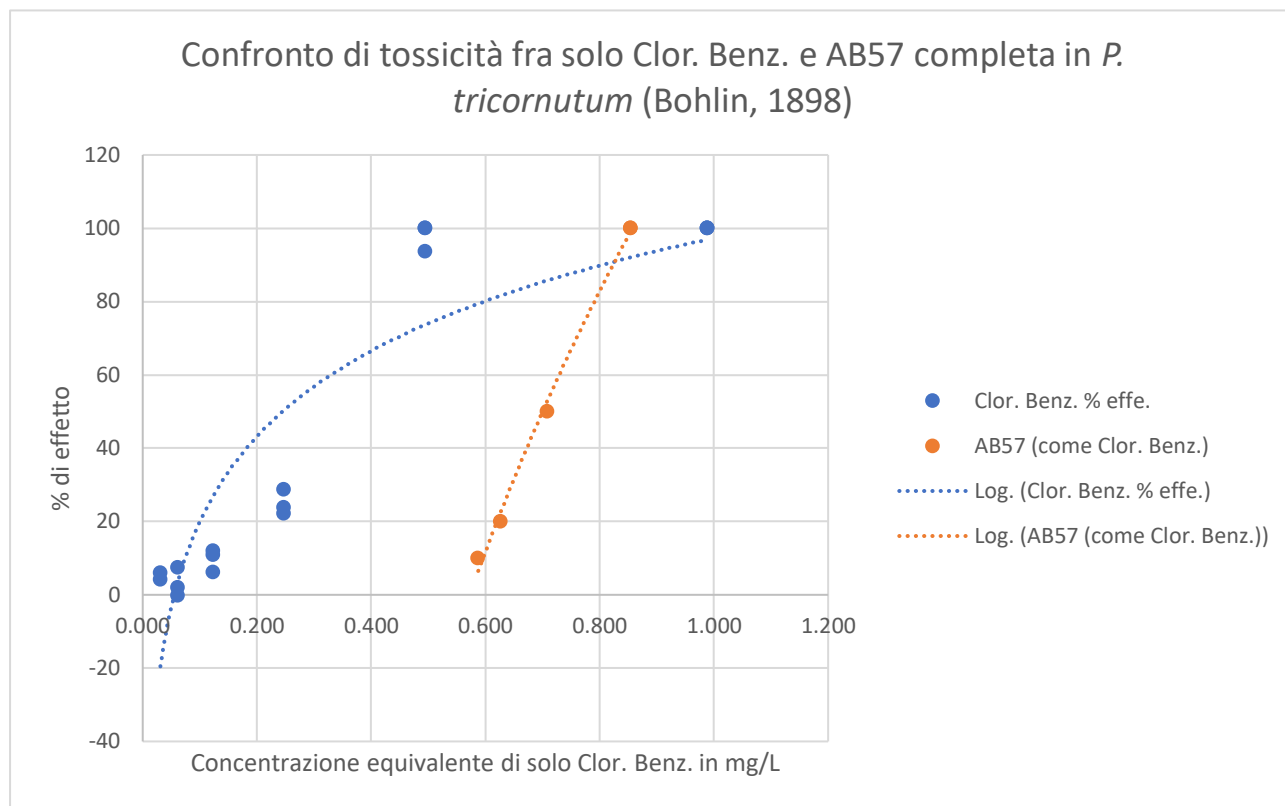


Figura 34: grafico a dispersione XY che riporta il confronto di tossicità tra l'agente biocida cloruro di benzalconio quando sottoposto a *P. tricornutum* (Bohlin, 1898) come sostanza pura contro quando il contatto avviene mediato dalla Pappetta AB57. In ascissa sono presenti le concentrazioni di cloruro di benzalconio in mg/L, convertite, quando è stato necessario, in sola massa del biocida, in modo da poter avere una comparazione diretta. In ordinata vengono indicate le percentuali di effetto, corrispondenti a un'inibizione del tasso di crescita algale. Per visualizzare al meglio il raffronto, si disegnano le linee di tendenza logaritmiche per le due serie di dati. La tossicità, quando il cloruro di benzalconio si trova libero in soluzione (medium "f/2", [Allegato 5]) è più alta rispetto a quando presente nella formulazione della Pappetta AB57. La curva di colore blu, che modella i dati ottenuti col puro biocida si mantiene sempre al di sopra di quella arancione, relativa all'intera Pappetta AB57. Il superamento che avviene a un certo punto non è da considerarsi significativo ma solo come un artefatto del modello utilizzato, che in qualche modo deve semplificare le distribuzioni: infatti, si osserva come l'effetto del 100% venga raggiunto già alla penultima concentrazione per il cloruro di benzalconio, che è più bassa di tutte quelle relative alla Pappetta AB57, per la quale viene coperto un range di concentrazioni minore.

Ciò conferma quanto supposto e poi osservato in precedenza col test Microtox® sui batteri bioluminescenti, ovvero che il biocida contenuto nella formulazione della Pappetta AB57, se viene considerato singolarmente, risulta più nocivo e dunque efficace, superando la soglia indicata dalla Comunità Europea per considerare una sostanza pericolosa a livello acuto, pari a 1 mg/L (Commissione Europea, 2011), qui utilizzata per estensione, dato che la normativa fa riferimento solo ed esclusivamente alle acque dolci, perciò la soglia di 1 mg/L non è da considerarsi perentoria.

Dunque, sebbene il cloruro di benzalconio sia decisamente tossico, la formulazione della Pappetta AB57 è tale per cui il prodotto finale, pur mantenendo le sue caratteristiche di efficacia per la pulitura dei manufatti, rappresenta per l'ambiente un rischio decisamente più basso rispetto a quanto non lo sia il biocida primario presente nella sua formulazione.

## Conclusione

Oramai da almeno un secolo ci si è resi conto come la salvaguardia e il restauro del patrimonio artistico e culturale mondiale debbano essere una priorità (Jokilehto, 1999; Choay, 2001; Smith L. , 2006; Waterton, Smith, & Campbell, 2006; Ott, Dagnino, & Pozzi, 2015). Proprio per questo si sono venute a creare nuove figure professionali (Smith J. , 2015) e c'è stato, soprattutto a partire dagli anni '80 del Novecento, un crescente interesse anche per quanto riguarda il campo accademico e della ricerca (Von Droste, Plachter, & Rossler, 1995; Munjeri, 2004; Chung & Kim, 2010).

Proprio in quest'ambito, sempre nuovi prodotti vengono immessi nel mercato e le formulazioni di quelli già esistenti vengono aggiornate, considerando anche che i crescenti problemi relativi al cambiamento climatico e all'inquinamento globale stanno presentando sfide sempre più grandi cui i restauratori devono far fronte. Nel particolare caso di studio, viene considerato l'agente di pulitura "Pappetta AB57", sintetizzata dall'Istituto Superiore per la Conservazione e il Restauro (ISCR) di Roma, utilizzata principalmente per la rimozione di croste nere, che si creano sugli esterni a causa delle deposizioni di particolato atmosferico (Pozo-Antonio, Rivas, López, Fiorucci, & Ramil, 2016) ma anche per altre coperture, come quella biologica.

Questo materiale, una volta applicato, rischia di finire nell'ecosistema. Si decide di indagare il particolare caso di Venezia dove il prodotto, spesso impiegato, può facilmente venire rilasciato nei canali della Laguna.

La valutazione della compatibilità ambientale condotta utilizzando un approccio *ITS* comprendente diversi *endpoint* e diversi tempi di esposizione ha confermato che il formulato non supera mai le soglie indicate dalla direttiva Europea *CLP 1272/2008* (Commissione Europea, 2008; Commissione Europea, 2011) e si attesta su concentrazioni di effetto che non sono preoccupanti. Dunque, pare possibile affermare che il prodotto nel suo complesso non sia pericoloso per l'ambiente. La Pappetta AB57 contiene un biocida che, nonostante da solo sia estremamente efficace, pare perdere il suo effetto tossico quando inserito all'interno della composizione, che probabilmente lo mantiene sequestrato, riducendone le interazioni con l'ambiente.

## Bibliografía

- Al-Agha, M. R. (2006). Weathering of building stones and its relationship to the sustainable management of the aggregate resources in Gaza Strip, Palestine. *Building and environment*, 676-686.
- Alonso, D. L., Belarbi, E.-H., Rodríguez-Ruiz, J., Segura, C. I., & Giménez, A. (1998). Acyl lipids of three microalgae. *Phytochemistry (Oxford)*, 1473-1481.
- Asmus, J. F., Murphy, C. G., & Munk, W. H. (1974). Studies On The Interaction Of Laser Radiation With Art Artifacts. *Proceedings Volume 0041, Developments in Laser Technology II* (p. 19-30). San Diego: Wuerker, R.F.
- ASTM. (1998). *ASTM E724-98, Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs*. West Conshohocken: ASTM International.
- Azua-Bustos, A., Gonzalez-Silva, C., Salas, L., Palma, R. E., & Vicuna, R. (2010). A novel subaerial *Dunaliella* species growing on cave spiderwebs in the Atacama Desert. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 443-452.
- Baglioni, P., & Chelazzi, D. (2013). *Nanoscience for the conservation of works*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Baker, F. (1902). *The Mollusca of the Chicago area*. Chicago: The Chicago Academy of Sciences.
- Balliana, E., Ricci, G., Pesce, C., & Zendri, E. (2016). Assessing the value of Green Conservation for Cultural Heritage: positive and critical aspects of already available methodologies. *International Journal Of Conservation Science*, 185-202.
- Benavente, D., Martinez-Martinez, J., Cueto, N., Ordoñez, S., & Garcia-del-Cura, M. (2018). Impact of salt and frost weathering on the physical and durability properties of travertines and carbonate tufas used as building material. *Environmental Earth Sciences*, 1-13.
- Benzie, J. A. (2005). Cladocera: The Genus *Daphnia* (including *Daphniopsis*) (*Anomopoda: Daphniidae*). Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World, Volume 21. *The Quarterly Review of Biology*, 491.
- Bi, L., Vanneste, D., & Van Der Borg, J. (2016). Cultural Heritage Development in China: A Contextualized Trajectory or a Global-Local Nexus? *International Journal of Cultural Property*, 191-207.
- Bielmyer, G. K., Bullington, J. B., Decarlo, C. A., Chalk, S. J., & Smith, K. (2012). The Effects of Salinity on Acute Toxicity of Zinc to Two Euryhaline Species of Fish, *Fundulus heteroclitus* and *Kryptolebias marmoratus*. *Integrative and comparative biology*, 753-750.
- Bohlin, K. (1898). *Zur Morphologie und Biologie einzelliger Algen*. Stoccolma: Vetenskademiens Förhänligar.
- Brimblecombe, P., & Grossi, C. M. (2007). Damage to Buildings from Future Climate and Pollution. *APT Bulletin*, 13-18.
- Brock, T. (1975). Salinity and the ecology of *Dunaliella* from Great Salt Lake. *Microbiology*, 285-292.
- Buchheim, M., Kirkwood, A., Buchheim, J., Verghese, B., & Henley, W. (2010). Hypersaline soil supports a diverse community of *Dunaliella* (*Chlorophyceae*). *Journal of Phycology*, 1038-1047.

- Butcher, R. (1959). Part I: Introduction and *Chlorophyceae*. In R. Butcher, *An introductory account of the smaller algae of British coastal waters*. (p. 1-74). Londra: Fisheries Investigations.
- Buttino, I., Vitiello, V., Macchia, S., Scuderi, A., & Pellegrini, D. (2018). Larval development ratio test with the calanoid copepod *Acartia tonsa* as a new bioassay to assess marine sediment quality. *Ecotoxicology and environmental safety*, 1-9.
- Carbonara, G. (2012). An Italian contribution to architectural restoration. *Frontiers of architectural research*, 2-9.
- Cervetto, G., Pagano, M., & Gaudy, R. (1995). Feeding behaviour and migrations in a natural population of the copepod *Acartia tonsa*. *Hydrobiologia*, 237-248.
- Chen, Y., Geurts, M., Sjollem, S., Kramer, N., Hermens, J., & Droge, S. (2014). Acute toxicity of the cationic surfactant C12-benzalkonium in different bioassays: how test design affects bioavailability and effect concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 606-615.
- Choay, F. (2001). *The Invention of the Historic Monument*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Christensen, E. R., Kusk, K. O., & Nyholm, N. (2009). Dose-response regressions for algal growth and similar continuous endpoints: Calculation of effective concentrations. *Environmental toxicology and chemistry*, 826-835.
- Chung, S.-J., & Kim, C.-S. (2010). The Development of Attitudes to Historic Conservation. *Architectural Research* 12, 25-32.
- Clarens, A., Resurreccion, E., White, M., & Colosi, L. (2010). Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feed stocks. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1813-1819.
- Colston, B. J., Watt, D. S., & Munro, H. L. (2001). Environmentally-induced stone decay: the cumulative effects of crystallization–hydration cycles on a Lincolnshire oopelsparite limestone. *Journal of cultural heritage*, 297-307.
- Commissione Europea. (2006). *Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency*. European Union.
- Commissione Europea. (2008). *Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC)*. European Commission.
- Commissione Europea. (2011, marzo 10). Regolamento (UE) n. 286/2011 della Commissione. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, p. L83/1-L83/53.
- Cordellier, M., Pfenninger, A., Streit, B., Pfenninger, M., Bauer, B., Winder, M., . . . Adrian, R. (2012). Assessing the effects of climate change on the distribution of pulmonate freshwater snail biodiversity. *Marine biology*, 2519-2531.
- Crispim, C. A., Gaylarde, P. M., & Gaylarde, C. C. (2003). Algal and Cyanobacterial Biofilms on Calcareous Historic Buildings. *Current Microbiology*, 79-82.
- Cui, Y., Thomas-Hall, S. R., Chua, E. T., & Schenk, P. M. (2021). Development of High-Level Omega-3 Eicosapentaenoic Acid (EPA) Production from *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of phycology*, 258-268.

- D'Angelo, R., Cimino, L., & Accardo, G. (2012). La Sicurezza Nei Cantieri Di Restauro. *III Conference "Diagnosis, Conservation and Valorization of Cultural Heritage"*, (p. 1-7). Napoli.
- Deutschle, T., Porkert, U., Reiter, R., Keck, T., & Riechelmann, H. (2006). In vitro genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride. *Toxicology in Vitro*, 1472-1477.
- Doe, K., Jackman, P., Scroggins, R., McLeay, D., & Wohlgeschaffen, G. (2005). Solid-Phase Test for Sediment Toxicity Using the Luminescent Bacterium, *Vibrio Fischeri*. *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*, 107-136.
- Doehne, E., & Price, C. A. (2010). *Stone Conservation: An Overview of Current Research (Second Edition)*. Los Angeles: The Getty Conservation Institute.
- Dolan, L. C., Wheeler, J. A., & Burdock, G. A. (2013). Safety studies conducted on a sanitizing agent containing benzalkonium chloride. *Journal of Food Science*, 119-127.
- Domnina, Y., Suslov, V., Kedik, S., Vorfolomeeva, E., & Meleshko, A. (2020). Quantitative Determination of Benzalconium Chloride in the Naltrexone Hydrochloride Nasal Spray. *Разработка и регистрация лекарственных средств*, 121-127.
- Ebert, D. (2005). *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US).
- Elkington, J. (1999). *Cannibals with Forks: The Triple Bottom Line of 21st Century Business*. Oxford: Capstone.
- Fajardo, A., Cerdan, L., Medina, A., Fernandez, F., Moreno, P., & Grima, E. (2007). Lipid extraction from the microalgae *Phaeodactylum tricornutum*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120-126.
- Falniowski, A. (1980). Pigmentation of the mantle border in Polish representatives of the subgenus *Radix* (*Lymnaeidae*, *Basommatophora*, *Gastropoda*). *Basteria*, 3-8.
- Fazlara, A., & Ekhtelat, M. (2012). The disinfectant effects of benzalkonium chloride on some important foodborne pathogens. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 23-29.
- Ferk, F., Mišić, M., Hoelzl, C., Uhl, M., Fuerhacker, M., Grillitsch, B., . . . Knasmüller, S. (2007). Benzalkonium chloride (BAC) and dimethyldioctadecyl-ammonium bromide (DDAB), two common quaternary ammonium compounds, cause genotoxic effects in mammalian and plant cells at environmentally relevant concentrations. *Mutagenesis*, 363-370.
- Ferrer, I., & Furlong, E. (2002). Accelerated solvent extraction followed by on-line solid-phase extraction coupled to ion trap LC/MS/MS for analysis of benzalkonium chlorides in sediment samples. *Analytical Chemistry*, 1275-1280.
- Flores, M., Lorenzo, J., & Gomez-Alarcon, G. (1997). Algae and bacteria on historic monuments at Alcalá de Henares, Spain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 241-246.
- Franzoni, E., Volpi, L., Bonoli, A., Spinelli, R., & Gabrielli, R. (2018). The environmental impact of cleaning materials and technologies in heritage buildings conservation. *Energy and Buildings*, 165-182.
- Fryer, G. (1991). Functional Morphology and the Adaptive Radiation of the *Daphniidae* (*Branchiopoda: Anomopoda*). *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 1-99.



- Gaylarde, C., Ortega-Morales, B., & Bartolo-Pérez, P. (2007). Biogenic Black Crusts on Buildings in Unpolluted Environments. *Current Microbiology*, 162-166.
- Genot, I., Yang, D. A., Martin, E., Cartigny, P., Legendre, E., & de Raféllis, M. (2020). Oxygen and sulfur mass-independent isotopic signatures in black crusts: the complementary negative  $\Delta^{33}\text{S}$  reservoir of sulfate aerosols? *Atmospheric Chemistry and Physics*, 4255-4273.
- Gherardi, M., Gordiani, A., & Proietto, A. (2006). Chemical risk of exposure to volatile organic compounds in the field of restoration of art objects. *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia*, 195-197.
- Gorbi, G., Invidia, M., Savorelli, F., Faraponova, O., Giacco, E., Cigar, M., . . . Sei, S. (2012). Standardized methods for acute and semichronic toxicity tests with the copepod *Acartia tonsa*. *Environmental toxicology and chemistry*, 2023-2028.
- Grant, C. (1982). Fouling of terrestrial substrates by algae and implications for control - a review. *International biodeterioration bulletin*, 57-65.
- Guillard, R. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals*, 29-60.
- Guillard, R., & Ryther, J. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 229-239.
- Hall, K. (2011). Natural building stone composed of light-transmissive minerals: impacts on thermal gradients, weathering and microbial colonization. A preliminary study, tentative interpretations, and future directions. *Environmental Earth Sciences*, 289-297.
- Hallgren, P., Sorita, Z., Berglund, O., & Persson, A. (2012). Effects of 17[alpha]-ethinylestradiol on individual life-history parameters and estimated population growth rates of the freshwater gastropods *Radix balthica* and *Bithynia tentaculata*. *Ecotoxicology (London)*, 803.
- Hansen, B. W., Buttino, I., Cunha, M. E., & Drillet, G. (2016). Embryonic cold storage capability from seven strains of *Acartia spp.* isolated in different geographical areas. *Aquaculture*, 131-139.
- Hatchfield, P. B., & Carpenter, J. M. (1986). The problem of formaldehyde in museum collections. *The International journal of museum management and curatorship*, 183-188.
- Heijerick, D., De Schamphelaere, K., & Janssen, C. (2002). Biotic ligand model development predicting Zn toxicity to the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: possibilities and limitations. *Comparative biochemistry and physiology*, 207-218.
- Hengstler, J., Foth, Kahl, Kramer, P.-J., Lilienblum, Schulz, & Schweinfurth. (2006). The REACH concept and its impact on toxicological sciences. *Toxicology (Amsterdam)*, 232-239.
- Henley, W. J., Cobbs, M., Novoveská, L., Buchheim, M. A., & Graham, L. (2018). Phylogenetic analysis of *Dunaliella* (*Chlorophyta*) emphasizing new benthic and supralittoral isolates from Great Salt Lake. *Journal of phycology*, 483-493.
- Herruzo, R. M., Yela, R., & Vizcaino, M. J. (2015). Lasting hand self-disinfection: A backup for hospital hand hygiene? *American journal of infection control*, 697-701.
- Hikiba, H., Watanabe, E., Barrett, J. C., & Tsutsui, T. (2005). Ability of fourteen chemical agents used in dental practice to induce chromosome aberrations in Syrian Hamster embryo cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 146-152.

- Hindark, F. (1990). *Studies on the chlorococcal algae* (Chlorophyceae). V. Bratislava: House of the Slovak Academy of Sciences.
- Hopkins, W., Staub, B., Snodgrass, J., Taylor, B., DeBiase, A., Roe, J., . . . Congdon, J. (2004). Responses of benthic fish exposed to contaminants in outdoor microcosms—examining the ecological relevance of previous laboratory toxicity tests. *Aquatic toxicology*, 1-12.
- Hueck, H. (1965). The biodeterioration of materials as part of hylobiology. *Material und Organismen*, 5-34.
- Huys, R., & Boxshall, G. (1991). *Copepod Evolution*. Londra: Boxshall, G.A.
- ICOMOS. (1964). *Venice Charter for the Conservation and Restoration of Monuments and Sites*. Venezia: International Council on Monuments and Sites.
- ISO. (1999). Water quality — Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (*Copepoda*, *Crustacea*). In I. O. Standardization, *ISO 14669*. Ginevra: International Organization for Standardization.
- ISO. (2000). Water quality — Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*). In I. O. Standardization, *ISO 10706*. Ginevra: International Organization for Standardization.
- ISO. (2007). Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria. In I. O. Standardization, *ISO 11348-3*. Ginevra: International Organization for Standardization.
- ISO. (2012). Water quality — Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. In I. O. Standardization, *ISO 8692*. Ginevra: International Organization for Standardization.
- ISO. (2015). Water Quality-Calanoid Copepod Development Test with *Acartia Tonsa*. ISO/FDIS 16778. Calanoid Copepod Early-life Stage Test with *Acartia Tonsa*. In I. O. Standardization, *ISO 16778*. Ginevra: International Organization for Standardization.
- Ivanković, T., & Hrenović, J. (2010). Surfactants in the environment. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 95-110.
- Jackiewicz, M., & Buksalewicz, R. (1998). Diversity in tentacle shape of European lymnaeid species (*Gastropoda, pulmonata: Basommatophora*). *Biological Bulletin of Poznan*, 131-136.
- Jaworska, J., Gabbert, S., & Aldenberg, T. (2010). Towards optimization of chemical testing under REACH: A Bayesian network approach to Integrated Testing Strategies. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 157-167.
- Jing, Z. (1983). Anatomy of the circulatory system of *Radix auricularia*. *Acta Zoologica Sinica*, 133-140.
- Jokilehto, J. (1999). *A History of Architectural Conservation*. Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Karasov, W. H., & Martínez del Rio, C. (2007). *Physiological ecology: how animals process energy, nutrients, and toxins*. Princeton: Princeton University Press.
- Kjørboe, T., Møhlenberg, F., & Hamburger, K. (1985). Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. *Marine ecology. Progress series (Halstenbek)*, 85-97.
- Kirkwood, A., & Henley, W. (2006). Algal community dynamics and halotolerance in a terrestrial, hypersaline environment. *Journal of Phycology*, 537-547.

- Krienitz, L., Bock, C., Nozaki, H., & Wolf, M. (2011). SSU rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to the bioassay alga "*Selenastrum capricornutum*" recovered the polyphyletic origin of crecent-shaped Chlorophyta. *Journal of phycology*, 880-893.
- Kwok, K., Souissi, S., Dur, G., Won, E.-J., & Lee, J.-S. (2015). Copepods as references species in estuarine and marine waters. In J.-C. Amiard, & C. Mouneyrac, *Aquatic Ecotoxicology* (p. 281-308). Cambridge: Academic Press.
- Lampert, W. (2006). *Daphnia*: Model herbivore, predator and prey. *Polish Journal of Ecology*, 607-620.
- Lavorgna, M., Russo, C., D'Abrosca, B., Parrella, A., & Isidori, M. (2016). Toxicity and genotoxicity of the quaternary ammonium compound benzalkonium chloride (BAC) using *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* as model systems. *Environmental pollution (1987)*, 34-39.
- Lazzarini, L., & Tabasso Laurenzi, M. (1986). *Il restauro della pietra*. Padova: CEDAM.
- Linnaeus, C. (1758). *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Stoccolma.
- Loupa, G., Charpantidou, E., Karageorgos, E., & Rapsomanikis, S. (2007). The chemistry of gaseous acids in medieval churches in Cyprus. *Atmospheric environment*, 9018-9029.
- Macedo, M., Miller, A., Dionisio, A., & Saiz-Jimenez, C. (2009). Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview. *Microbiology-Sgm*, 3476-3490.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2016). *Brock - Biologia dei microrganismi*. Milano - Torino: Pearson.
- Mariani, L., De Pascale, D., Faraponova, O., Tornambè, A., Sarni, A., Giuliani, S., . . . Magaletti, E. (2006). The use of a test battery in marine ecotoxicology: The acute toxicity of sodium dodecyl sulfate. *Environmental Toxicology*, 373-379.
- Martino, A. D., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K., & Bowler, C. (2007). Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. *Journal of phycology*, 992-1009.
- McAlister, J., Smith, B., & Török, A. (2008). Transition metals and water-soluble ions in deposits on a building and their potential catalysis of stone decay. *Atmospheric environment*, 7657-7668.
- McFall-Ngai, M. J. (2014). The Importance of Microbes in Animal Development: Lessons from the Squid-Vibrio Symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, 177-194.
- McNab, B. K. (2002). *The Physiological Ecology of Vertebrates: a View from Energetics*. New York: Cornell University Press.
- Meester, L. D. (1993). Genotype, Fish-Mediated Chemical, and Phototactic Behavior in *Daphnia Magna*. *Ecology*, 1467-1474.
- Miller, A., Sanmartín, P., Pereira-Pardo, L., Dionísio, A., Saiz-Jimenez, C., Macedo, M., & Prieto, B. (2012). Bioreceptivity of building stones: A review. *The Science of the total environment*, 1-12.
- Mohammadi, P., & Krumbein, W. (2008). Biodeterioration of ancient stone materials from the Persepolis monuments (Iran). *Aerobiologia*, 27-33.
- Mora, P., Mora, L., & Philippot, P. (1984). *The conservation of wall paintings*. Sevenoaks: Butterworth & Co.

- Morabito, E., Zendri, E., Piazza, R., Ganzerla, R., Montalbani, S., Marcoloni, E., . . . Gambaro, A. (2013). Deposition in St. Mark's Basilica of Venice. *Environmental Science and Pollution Research*, 2579-2592.
- Mróz, P., & Mucha, M. (2018). Hydroxyethyl methyl cellulose as a modifier of gypsum properties. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 1083-1089.
- Munjeri, D. (2004). Tangible and Intangible Heritage: From Difference to Convergence. *Museum International* 56, 12-20.
- Narváez, C., Ríos, J. M., Píriz, G., Sanchez-Hernandez, J. C., & Sabat, P. (2016). Subchronic exposure to chlorpyrifos affects energy expenditure and detoxification capacity in juvenile Japanese quails. *Chemosphere (Oxford)*, 775-784.
- Norwich, J. J. (1991). Tourist pollution: The future's most pervasive problem. *Museum management and curatorship*, 45-52.
- Nugari, M., Pietrini, A., Caneva, G., Imperi, F., & Visca, P. (2009). Biodeterioration of mural paintings in a rocky habitat: The Crypt of the Original Sin (Matera, Italy). *International biodeterioration & biodegradation*, 705-711.
- Nye, J. F. (1972). *Physical Properties of Crystals*. Londra: Oxford University Press.
- OECD. (2004). Test No. 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test. In OECD, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. Parigi: OECD Publishing.
- OECD. (2011). Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. In OECD, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. Parigi: OECD Publishing.
- OECD. (2012). Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. In OECD, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. Parigi: OECD Publishing.
- Oomen, A., Bos, P., Fernandes, T., Hund-Rinke, K., Boraschi, D., Byrne, H., . . . Landsiedel, R. (2014). Concern-driven integrated approaches to nanomaterial testing and assessment - report of the NanoSafety Cluster Working Group 10. *Nanotoxicology*, 334-348.
- Ott, M., Dagnino, F. M., & Pozzi, F. (2015). Intangible Cultural Heritage: Towards collaborative planning of educational interventions. *Computers in human behavior*, 1314-1319.
- Ozga, I., Bonazza, A., Bernardi, E., Tittarelli, F., Favoni, O., Ghedini, N., . . . Sabbioni, C. (2011). Diagnosis of surface damage induced by air pollution on 20th-century concrete buildings. *Atmospheric environment*, 4986-4995.
- Pane, L., Giacco, E., Corrà, C., Greco, G., Mariottini, G. L., Varisco, F., & Faimali, M. (2008). Ecotoxicological evaluation of Harbour sediments using marine organisms from different trophic levels. *Journal of soils and sediments*, 74-79.
- Patil, V., Tran, K., & Giselrod, H. (2008). Toward sustainable production of biofuels from microalgae. *International Journal of Molecular Sciences*, 1188-1195.
- Pérez, P., Fernández, E., & Beiras, R. (2009). Toxicity of benzalkonium chloride on monoalgal cultures and natural assemblages of marine phytoplankton. *Water, Air, & Soil Pollution*, 319-330.
- Post, F. (1977). The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microbial Ecology*, 143-165.

- Pozo-Antonio, J. S., Rivas, T., López, A. J., Fiorucci, M. P., & Ramil, A. (2016). Effectiveness of granite cleaning procedures in cultural heritage: A review. *The Science of the total environment*, 1017-1028.
- Pozo-Antonio, J., Ramil, A., Rivas, T., López, A., & Fiorucci, M. (2016). Effectiveness of chemical, mechanical and laser cleaning methods of sulphated black crusts developed on granite. *Construction & building materials*, 682-690.
- Prieto, B., & Silva, B. (2005). Estimation of the potential bioreceptivity of granitic rocks from their intrinsic properties. *International biodeterioration & biodegradation*, 206-215.
- Raimondo, S., Rowe, C. L., & Congdon, J. D. (1998). Exposure to coal ash impacts simmng performance and predator avoidance in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *South American Journal of Herpetology*, 289-291.
- Razouls, C., de Bovée, F., Kouwenberg, J., & Desreumaux, N. (2015). *Diversity and Geographic Distribution of Marine Planktonic Copepods*. Parigi: Sorbonne Université, CNRS.
- Ricci, C., Gambino, F., Nervo, M., Piccirillo, A., Scarcella, A., Zenucchini, F., & Pozo-Antonio, J. S. (2020). Developing New Cleaning Strategies of Cultural Heritage Stones: Are Synergistic Combinations of a Low-Toxic Solvent Ternary Mixtures Followed by Laser the Solution? *Coatings*, 466-488.
- Rivas, T., Pozo, S., & Paz, M. (2014). Sulphur and oxygen isotope analysis to identify sources of sulphur in gypsum-rich black crusts developed on granites. *The Science of the total environment*, 137-147.
- Romero, P. E., Pfenninger, M., Kano, Y., & Klussmann-Kolb, A. (2016). Molecular phylogeny of the *Ellobiidae* (*Gastropoda: Panpulmonata*) supports independent terrestrial invasions. *Molecular phylogenetics and evolution*, 43-54.
- Romero, P. E., Weigand, A. M., & Pfenninger, M. (2016). Positive selection on panpulmonate mitogenomes provide new clues on adaptations to terrestrial life. *BMC evolutionary biology*, 164.
- Russo, M., Bizzotto, C., Distefano, G. G., Marchetto, D., Picone, M., & Volpi Ghirardini, A. (2021, settembre 14). *Saggi di embriotossicità con il gasteropode polmonato Lymnaea (Radix) auricularia*. Tratto da Ecotox: <https://www.ecotox.it/wp-content/uploads/2020/11/SAGGI-DI-EMBRIOTOSSICITA-CON-IL-GASTEROPODE-POLMONATO-LYMNAEA-RADIX-AURICULARIA-Russo.pdf>
- Sarmidi, A. (2009). Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management*, 1834-1840.
- Schell, T., Feldmeyer, B., Schmidt, H., Greshake, B., Tills, O., Truebano, M., . . . Pfenninger, M. (2017). An annotated draft genome for *Radix auricularia* (*Gastropoda, Mollusca*). *Genome biology and evolution*, 585-592.
- Schiavon, N. (2000). Granitic building stone decay in an urban environment: A case of authigenic kaolinite formation by heterogenous sulphur dioxide attack. *Proceedings of the 9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone* (p. 411-421). Venezia: Vasco Fassina.
- Segovia, M., Mata, T., Palma, A., García-Gómez, C., Lorenzo, R., Rivera, A., & Figueroa, F. L. (2015). *Dunaliella tertiolecta (Chlorophyta)* Avoids Cell Death Under Ultraviolet Radiation By Triggering Alternative Photoprotective Mechanisms. *Photochemistry and photobiology*, 1389-1402.
- Semenzin, E., Giubilato, E., Badetti, E., Picone, M., Volpi Ghirardini, A., Hristozov, D., . . . Marcomini, A. (2019). Guiding the development of sustainable nano-enabled products for the conservation of

works of art: proposal for a framework implementing the Safe by Design concept. *Environmental Science and Pollution Research*, 26146-26158.

- Siehoff, S., Hammers-Wirtz, M., Strauss, T., & Ratte, H. T. (2009). Periphyton as alternative food source for the filter-feeding cladoceran *Daphnia magna*. *Freshwater biology*, 15-23.
- Sijiang, W., Chongyang, W., Yushun, Y., & Meng, W. (2020). Physical and Mechanical Properties of Gypsum-Like Rock Materials. *Advances in Civil Engineering*, 1-17.
- Silva, B., Aira, N., Martínez-Cortizas, A., & Prieto, B. (2009). Chemical composition and origin of black patinas on granite. *The Science of the total environment*, 130-137.
- Simão, J., Ruiz-Agudo, E., & Rodriguez-Navarro, C. (2006). Effects of particulate matter from gasoline and diesel vehicle exhaust emissions on silicate stones sulfation. *Atmospheric environment*, 6905-6917.
- Smith, B., Gomez-Heras, M., & McCabe, S. (2008). Understanding the decay of stone-built cultural heritage. *Progress in physical geography*, 439-461.
- Smith, J. (2015). Applying a Cultural Landscape Approach to the Urban Context. *Conserving Cultural Landscapes: Challenges and New Directions*, 182–197.
- Smith, L. (2006). *Uses of Heritage*. New York: Routledge.
- Sommer, U., Adrian, R., Bauer, B., & Winder, M. (2012). The response of temperate aquatic ecosystems to global warming: novel insights from a multidisciplinary project. *Marine biology*, 2367-2377.
- Sørensen, T. F., Drillet, G., Engell-Sørensen, K., Hansen, B. W., & Ramløv, H. (2007). Production and biochemical composition of eggs from neritic calanoid copepods reared in large outdoor tanks (Limfjord, Denmark). *Aquaculture*, 84-96.
- Stavroudis, C., & Doherty, T. W. (2005). A New Approach to Cleaning I: Using Mixtures of Concentrated Stock Solutions and a Database to Arrive at an Optimal Aqueous Cleaning System. *WAAC Newsletter*, 17-28.
- Støttrup, J., Bell, J., & Sargent, J. (1999). The fate of lipids during development and cold-storage of eggs in the laboratory-reared calanoid copepod, *Acartia tonsa* Dana, and in response to different algal diets. *Aquaculture*, 257-269.
- Sütterlin, H., Alexy, R., & Kümmerer, K. (2008). The toxicity of the quaternary ammonium compound benzalkonium chloride alone and in mixtures with other anionic compounds to bacteria in test systems with *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas putida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 498-505.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., . . . Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 206-221.
- Tills, O., Rundle, S. D., & Spicer, J. I. (2013). Parent–offspring similarity in the timing of developmental events: an origin of heterochrony? *Proceedings of the Royal Society. B, Biological sciences*, 1-8.
- Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J., & Dunlap, P. V. (2007). Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2823-2829.

- US - Environmental Protection Agency. (2002). *EPA/600/490/027 - Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. Cincinnati: US - Environmental Protection Agency.
- van Leeuwen, C., Patlewicz, G., & Worth, A. (2007). Intelligent Testing Strategies. In C. van Leeuwen, G. Patlewicz, & A. Worth, *Risk assessment of chemicals* (p. 467–509). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Vázquez de Aldana, J. R., Moreno, P., & Roso, L. (2012). Ultrafast lasers: A new frontier for optical materials processing. *Optical materials*, 572-578.
- Vitiello, V., Zhou, C., Scuderi, A., Pellegrini, D., & Buttino, I. (2016). Cold storage of *Acartia tonsa* eggs: a practical use in ecotoxicological studies. *Ecotoxicology (London)*, 1033-1039.
- Von Droste, B., Plachter, H., & Rossler, M. (1995). *Cultural Landscapes of Universal Value: Components of a Global Strategy*. Jena: Fischer Verlag.
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 319-346.
- Waterton, E., Smith, L., & Campbell, G. (2006). The Utility of Discourse Analysis to Heritage Studies: The Burra Charter and Social Inclusion. *International journal of heritage studies*, 339-355.
- Weiner, J. (1992). Physiological limits to sustainable energy budgets in birds and mammals: Ecological implications. *Trends in Ecology & Evolution*, 384-388.
- Wu, H., Zhang, H., Wang, C., Wu, Y., Xie, J., Jin, X., . . . Ye, J. (2011). Genoprotective effect of hyaluronic acid against benzalkonium chloride-induced DNA damage in human corneal epithelial cells. *Molecular Vision*, 3364-3370.
- Yu, G., Zhang, Y., Schideman, L., Funk, T., & Wang, Z. (2011). Distributions of carbon and nitrogen in the products from hydrothermal liquefaction of low-lipid microalgae. *Energy & environmental science*, 4587.
- Yu, T., Deng, Y., Zhang, J., & Duan, L. (2016). Size-assortative copulation in the simultaneously hermaphroditic pond snail *Radix auricularia* (Gastropoda: Pulmonata). *Animal Biology*, 239-247.
- Zhou, C., Carotenuto, Y., Vitiello, V., Wu, C., Zhang, J., & Buttino, I. (2018). De novo transcriptome assembly and differential gene expression analysis of the calanoid copepod *Acartia tonsa* exposed to nickel nanoparticles. *Chemosphere (Oxford)*, 163-172.
- Zou, S., Wu, Y., Yang, M., Li, C., & Tong, J. (2010). Pyrolysis characteristics and kinetics of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* using thermogravimetric analyzer. *Bioresource technology*, 359-365.
- Zuin, S., Gaiani, M., Ferrari, A., & Golanski, L. (2014). Leaching of nanoparticles from experimental water-borne paints under laboratory test conditions. *Journal of Nanoparticle Research*, 1-17.

## Allegati

### Allegato 1 – medium acquoso ricostruito per *P. subcapitata* ((Korshikov) F.Hindák 1990)

Per effettuare il test di tossicità con la microalga *P. subcapitata* ((Korshikov) F.Hindák 1990), viene utilizzato il medium suggerito nella direttiva OECD 201 (OECD, 2011), un'acqua dolce ricostruita secondo le proporzioni indicate in Tabella 22.

Da tener presente che, per la preparazione di questo medium, vanno utilizzati reagenti e prodotti chimici di precisione analitica, insieme ad acqua deionizzata.

*Tabella 22: composizione dell'acqua dolce ricostruita utilizzata per il test ecotossicologico con P. subcapitata ((Korshikov) F.Hindák 1990), come indicata dalla direttiva OECD 201 (OECD, 2011). La prima colonna della tabella riporta il sale che viene fatto sciogliere, la seconda la massa dello stesso da utilizzare in 1 L di acqua deionizzata e nella terza colonna è visibile la corrispondente concentrazione in mM.*

Componente	Concentrazione mg/L	Concentrazione mM
NaHCO <sub>3</sub>	50,0	0,595
NH <sub>4</sub> Cl	15,0	0,280
MgCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	12,0	0,0590
CaCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O	18,0	0,122
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	15,0	0,0609
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,60	0,00919
FeCl <sub>3</sub> ,6H <sub>2</sub> O	0,0640	0,000237
Na <sub>2</sub> EDTA,2H <sub>2</sub> O	0,100	0,000269*
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,185	0,00299
MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	0,415	0,00210
ZnCl <sub>2</sub>	0,00300	0,0000220
CoCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	0,00150	0,00000630
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	0,00700	0,0000289
CuCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O	0,00001	0,00000006
pH	8,1	

\*il rapporto molare tra EDTA e ferro eccede leggermente l'unità. Questo previene la precipitazione del ferro stesso e in contemporanea l'effetto chelante sugli ioni di metalli pesanti e minimizzato.

Il pH del medium è ottenuto stimando un equilibrio tra i carbonati nel sistema e la pressione parziale di CO<sub>2</sub> in aria. Una relazione approssimativa tra il pH a 25 °C e la concentrazione molare del bicarbonato è:

$$pH_{eq} = 11,30 + \log[HCO_3^-]$$

Dunque, per la composizione che si realizza, con 50 mg(NaHCO<sub>3</sub>)/L, sarà pH<sub>eq</sub> = 8,1.



Allegato 2 – mantenimento delle colture di *P. subcapitata* ((Korshikov) F.Hindák 1990) da utilizzare come alimento per *D. magna* (Straus, 1820)

La coltura di *P. subcapitata* ((Korshikov) F.Hindák 1990) da somministrare come alimento a *D. magna* (Straus, 1820) viene mantenuta in un medium ricostruito preparato secondo quanto riportato nella Tabella 23. Si costituiscono quattro soluzioni stock diluendo i sali in acqua distillata: una di macronutrienti, una di Fe-EDTA, una di micronutrienti e l'ultima di bicarbonato. Da queste si prelevano delle aliquote (rispettivamente 10, 1, 1 e 1 mL) e si pongono in un matraccio da 1000 mL, portato a volume con acqua distillata.

Nel medium che si costituisce in questo modo, si inoculano le alghe verdi. La coltura va dunque posta in una camera climatizzata, mantenuta alla temperatura di  $20 \pm 2$  °C, all'illuminazione di circa 4000 lux data da lampade fluorescenti *cool-white* con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio. Questa soluzione viene mantenuta in agitazione continua insufflando aria filtrata. Dopo 5 o 6 giorni d'incubazione, la coltura raggiunge solitamente una densità algale prossima ai 9-10 milioni di cellule per mL ed è pronta perché venga sia utilizzata come alimento che come inoculo per nuove colture.

*Tabella 23: composizione delle quattro soluzioni stock da aggiungere secondo le proporzioni indicate in quarta colonna a 1 L di acqua distillata per ottenere il medium di crescita adatto a P. subcapitata ((Korshikov) F.Hindák 1990). La prima colonna riporta il nome delle quattro soluzioni, la seconda i componenti, intesi come nutrienti, che costituiranno le quattro soluzioni, da disciogliere secondo quanto indicato nella terza colonna.*

Stock	Nutriente	Concentrazione (mg/L) in stock	mL/L di acqua
<b>Macronutrienti</b>	NH <sub>4</sub> Cl	1500	10
	MgCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	1200	
	CaCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O	1800	
	MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	1500	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	160	
<b>Fe-EDTA</b>	FeCl <sub>3</sub> ,6H <sub>2</sub> O	64	1
	Na <sub>2</sub> -EDTA,2H <sub>2</sub> O	100	
<b>Micronutrienti</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185	1
	MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	415	
	ZnCl <sub>2</sub>	3	
	CoCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	1,5	
	CuCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O	0,01	
	Na <sub>2</sub> Mo <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	7	
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	NaHCO <sub>3</sub>	50000	1

Allegato 3 – composizione acqua dolce ricostruita “M7” per test con *D. magna* (Straus, 1820)

Composizione della soluzione per gli elementi in tracce (Tabella 24), che andrà poi aggiunta al medium finale (OECD, 2012):

Tabella 24: composizione di elementi in tracce che andranno a costituire la soluzione stock da utilizzare per realizzare il medium “M7” completo. Nella prima colonna vengono riportati i sali, nella seconda le corrispondenti masse da far sciogliere in 1 L per ottenere la soluzione e della terza i mL da prelevare da ciascuna soluzione appena realizzata per costituire lo stock.

Composti di oligoelementi	g/L	Per soluzione stock, (mL/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	14,2975	1
MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	1,8025	1
LiCl	1,53	1
RbCl	0,355	1
SrCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	0,76	1
NaBr	0,08	1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	0,315	1
CuCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O	0,08375	1
ZnCl <sub>2</sub>	0,26	1
CoCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	0,2	1
KI	0,065	1
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,0438	1
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,0115	1
<b>Soluzione combinata di Fe-EDTA</b>		
Na <sub>2</sub> EDTA,2H <sub>2</sub> O	0,625	20
FeSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0,25	

Medium M7 finale (Tabella 25), costituito aggiungendo altri sali alla soluzione di oligoelementi, in acqua distillata:

Tabella 25: descrizione sintetica per la realizzazione del medium “M7” completo. Nella prima colonna vengono riportati i macronutrienti e nella seconda le varie masse da utilizzare per andare a realizzare le rispettive soluzioni stock. In terza e ultima colonna figurano i mL da prelevare da ciascuna soluzione stock e da aggiungere ad acqua distillata per costruire il medium “M7” definitivo.

Soluzione di oligoelementi		50 mL/L di M7
Macronutrienti	Per soluzione stock, g/L	Per M7, mL/L
CaCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O	29,38	10
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	24,66	5
KCl	5,8	1

NaHCO <sub>3</sub>	64,8	1
NaSiO <sub>3</sub> ,9H <sub>2</sub> O	10	1
NaNO <sub>3</sub>	2,74	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,43	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,84	0,1
<b>Vitamine combinate</b>		
Cloridrato di tiamina	0,75	0,1
Cianocobalamina	0,01	
Biotina	0,0075	

#### Allegato 4 – composizione acqua salata ricostruita “ASTM”

Per realizzare un litro di soluzione a 34 g/kg, i sali (Tabella 26) vanno sciolti in 890 mL di acqua deionizzata e poi il tutto va portato a volume di 1 L. Ogni sale deve essere aggiunto dopo che il precedente si è completamente sciolto. Per costituire invece 5 L di soluzione, sciogliere allo stesso modo i sali, in successione ma in 4450 mL e portare poi a volume (ASTM, 1998).

*Tabella 26: composizione dell'acqua ricostruita “ASTM”. Nella prima e seconda colonna figurano le masse dei vari sali da aggiungere a 890 mL di acqua distillata, poi da portare a volume a 1 L. Le ultime due colonne sono in analogia ma presentano le masse moltiplicate per 5, per una maggiore comodità, andando a realizzare direttamente 5 L di soluzione, partendo da 4450 mL e poi portando a volume una volta disciolti i sali.*

Sale	mg	g	mg per 5 L	g per 5 L
SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	20	0,02	100	0,10
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30	0,03	150	0,15
KBr	100	0,10	500	0,50
KCl	700	0,70	3500	3,50
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1470	1,47	7350	7,35
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4000	4,00	20000	20,00
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10780	10,78	53900	53,90
NaCl	23500	23,50	117500	117,50
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	20	0,02	100	0,10
NaHCO <sub>3</sub>	200	0,20	1000	1,00
Acqua (mL)	890,00		4450,00	

## Allegato 5 – composizione acqua ricostruita “f/2”

Questo medium consiste in un'acqua di mare arricchita molto comune e largamente utilizzata, ideata appositamente per la crescita di alghe marine costiere, specialmente diatomee. Le concentrazioni della formulazione originale, denominata “f Medium” (Guillard & Ryther, Studies of marine planktonic diatoms. I. Cyclotella nana Hustedt, and Detonula confervacea (Cleve) Gran, 1962), sono state dimezzate (Guillard, Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates, 1975).

Per preparare la soluzione, utilizzare 950 mL di acqua marina filtrata e aggiungere in sequenza i componenti nella Tabella 27. Portare poi a volume di 1 L con altra acqua marina filtrata. Se le alghe che si vogliono far crescere non richiedono silicio, si raccomanda di omettere l'aggiunta dei composti che lo contengono perché quest'elemento favorisce i fenomeni di precipitazione.

*Tabella 27: ricetta per la realizzazione dell'acqua ricostruita “f/2” utilizzata per i test con microalghe d'acqua salata. I componenti vengono indicati in prima colonna, accompagnati dalle rispettive masse da usare per costruire le soluzioni stock. In terza colonna sono riportati i volumi da prelevare dalle soluzioni stock e aggiungere a 950 mL d'acqua marina filtrata; nell'ultima colonna le corrispondenti concentrazioni molari.*

Componente	Soluzione stock	Quantità	Concentrazione molare nel medium finale
NaNO <sub>3</sub>	75 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	8,82·10 <sup>-4</sup> M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	5 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	3,62·10 <sup>-5</sup> M
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	30 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	1,06·10 <sup>-4</sup> M
Soluzione di metalli in tracce	(si veda la ricetta a seguire)	1 mL	---
Soluzione di vitamine	(si veda la ricetta a seguire)	0,5 mL	---

Per preparare la soluzione di metalli in tracce, si parta con 950 mL di acqua distillata, a cui si aggiungano in sequenza i componenti della Tabella 28 e si porti infine al volume di 1 L, sempre con acqua distillata. Si segnala che la soluzione originale di (Guillard & Ryther, Studies of marine planktonic diatoms. I. Cyclotella nana Hustedt, and Detonula confervacea (Cleve) Gran, 1962) contiene sequestrene ferrico, qui sostituito con Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O e FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O.

*Tabella 28: composizione di sali da utilizzare per costituire la “Soluzione di metalli in tracce” utilizzata nell'acqua ricostruita “f/2”. I componenti e le rispettive masse da usare per realizzare le soluzioni stock sono indicati nelle prime due colonne. In terza colonna le quantità da prelevare o da far disciogliere in 950 mL d'acqua distillata; con le rispettive concentrazioni molari in ultima colonna.*

Componente	Soluzione stock primaria	Quantità	Concentrazione molare nel medium finale
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	---	3,15 g	1,17·10 <sup>-5</sup> M
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	---	4,36 g	1,17·10 <sup>-5</sup> M
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	9,8 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	3,93·10 <sup>-8</sup> M
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6,3 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	2,60·10 <sup>-8</sup> M
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	22,0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	7,65·10 <sup>-8</sup> M

$\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	10,0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	$4,20 \cdot 10^{-8}$ M
$\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$	180,0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	$9,10 \cdot 10^{-7}$ M

Allegato 6 – composizione acqua ricostruita “Medium al 20%” per test con *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849)

La soluzione d’acqua salata ricostruita e utilizzata per il test con *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849) viene realizzata aggiungendo a 4 L di medium “M7”, 1 L della soluzione che viene di seguito descritta in Tabella 29 (ISO, 2015).

*Tabella 29: sali (prima colonna) e corrispettive masse (seconda colonna) in grammi da far sciogliere in sequenza in 1 L di acqua distillata. Questa soluzione andrà poi miscelata con 4 L di medium “M7” (Allegato 3) in modo da costituire il “Medium al 20%” completo.*

Sostanza	g/L
NaCl	70,100
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	11,700
KCl	2,030
KBr	0,293
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ,10H <sub>2</sub> O	0,113
MgCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	31,700
CaCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	6,600
SrCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	0,066

A questa miscela va poi addizionata anche la soluzione stock di bicarbonato per le acque salate (Tabella 30).

*Tabella 30: massa di NaHCO<sub>3</sub> da disciogliere in 1 L di acqua distillata per ottenere la soluzione stock di bicarbonato. In terza colonna il volume di questa soluzione stock da prelevare e aggiungere alla miscela indicata appena sopra.*

	g/L	mL stock / L
NaHCO <sub>3</sub>	2,83	1,0

### Allegato 7 – composizione acqua ricostruita “Medium Radix”

Nella Tabella 31, le quantità di sali da far sciogliere in 1 L di acqua distillata, per il mantenimento e l’esecuzione dei test su *R. auricularia* (Linnaeus, 1758), secondo quanto indicato da (US - Environmental Protection Agency, 2002) per il mantenimento di colture di *D. magna* (Straus, 1820). Vengono distinte quattro alternative sulla base della durezza dell’acqua che si produce e tra queste viene preferita quella indicata come “Hard”, caratterizzata da valori di pH, durezza e alcalinità compatibili per la sopravvivenza dell’organismo.

*Tabella 31: masse di sali, in mg, da far sciogliere in 1 L di acqua distillata per ottenere il medium di mantenimento e test adatto a R. auricularia (Linnaeus, 1758), seguendo le indicazioni (US - Environmental Protection Agency, 2002).*

Sale	mg/L di acqua
NaHCO <sub>3</sub>	282
CaSO <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	176
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	362
KCl	12



Allegato 8 – curve d’inibizione relative al test con l’alga *Pseudokirchneriella subcapitata* ((Korshikov) F.Hindák 1990)

Si presentano per primi i grafici calcolati con il controllo a base di bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ). In [Figura 35](#) viene riportato il tasso di crescita corrispondente alle varie concentrazioni testate mentre in [Figura 36](#) la curva degli effetti calcolata col metodo LogNorm, che interpola il maggior numero di dati possibile.

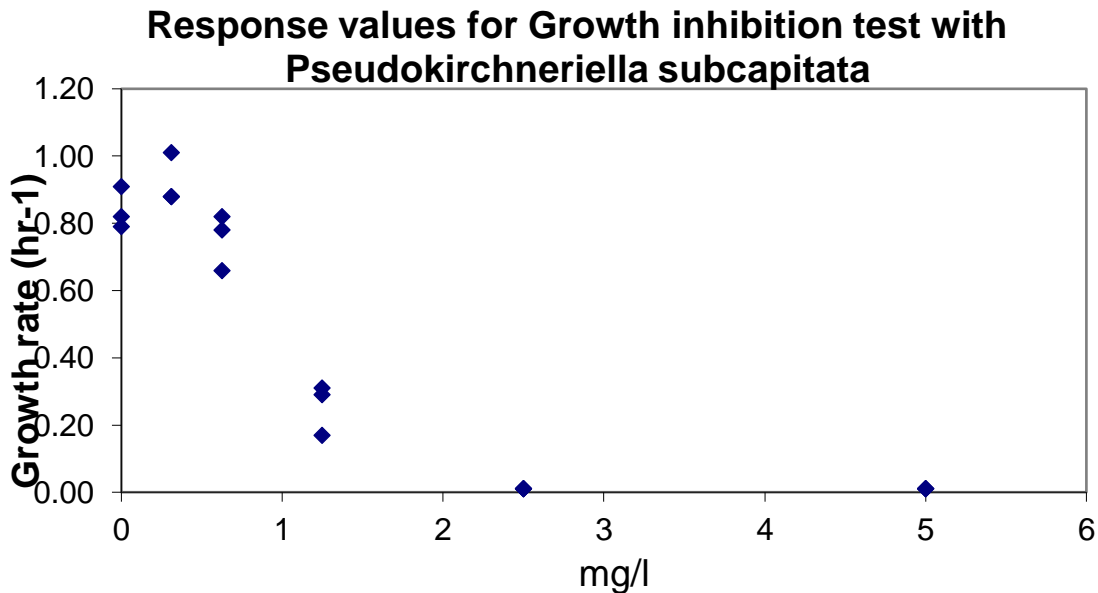


Figura 35: grafico restituito dal software “LWL” danese che rappresenta la risposta dei valori del tasso di crescita (in ordinata), dipendentemente dalla concentrazione di tossico, in questo caso bicromato di potassio,  $K_2Cr_2O_7$ , riportate in ascissa in mg/L.

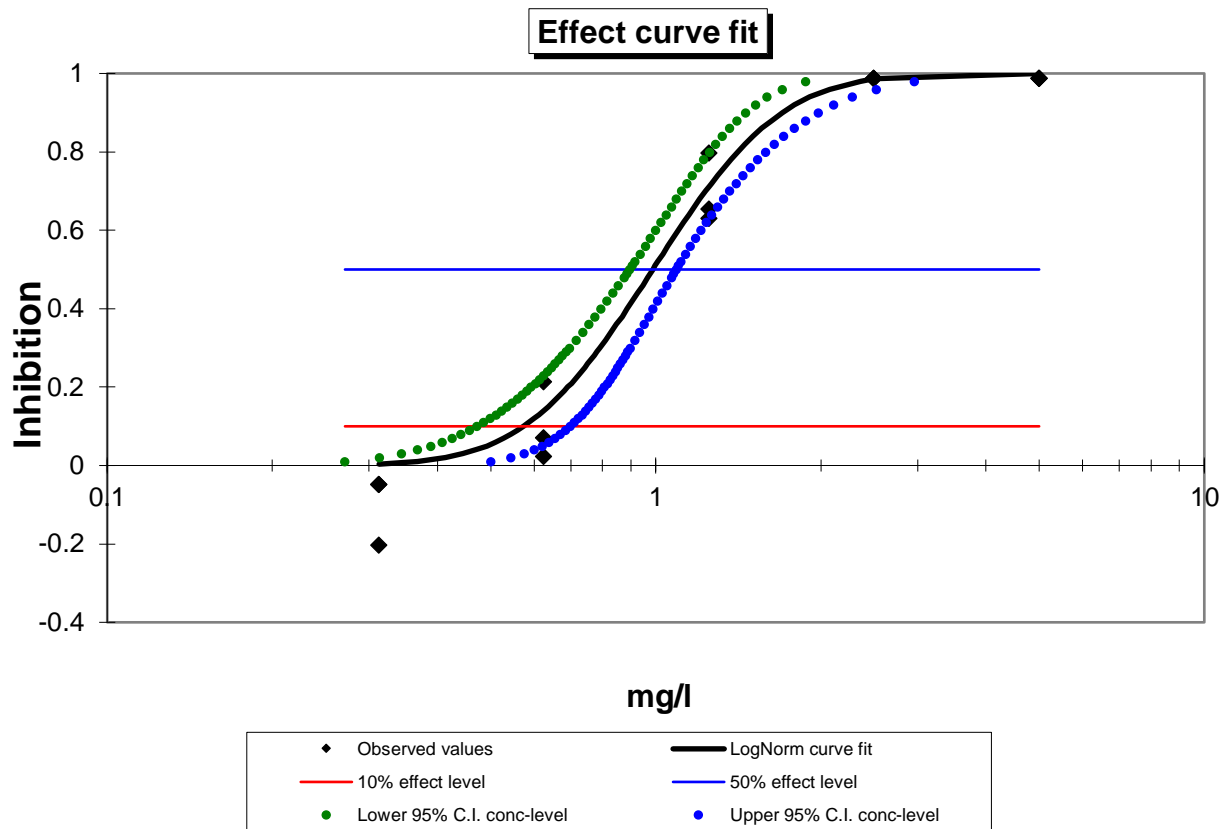


Figura 36: rappresentazione grafica della curva di effetto, dato da bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ), calcolata interpolando i dati ottenuti praticamente con il metodo statistico LogNorm, restituita dal software "LWL" danese. In basso è presente la legenda.

Seguono gli stessi grafici ottenuti per il test con la sostanza oggetto di studio, la Pappetta AB57, in [Figure 37](#) e [38](#).

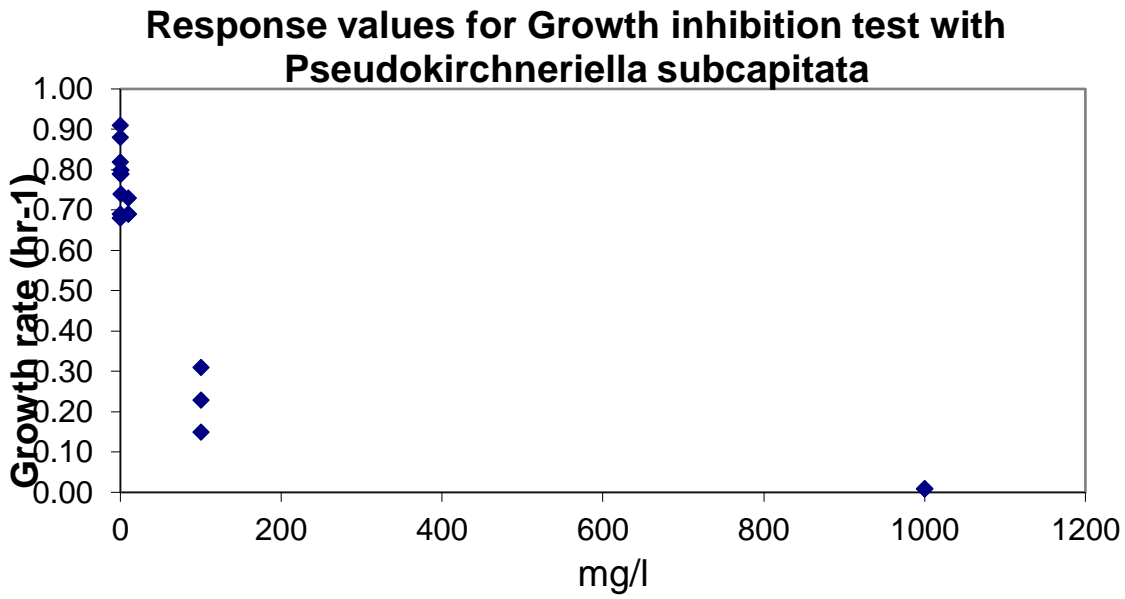


Figura 37: grafico restituito dal software "LWL" danese che rappresenta la risposta dei valori del tasso di crescita (in ordinata), dipendentemente dalla concentrazione di tossico, in questo caso la Pappetta AB57, riportate in ascissa in mg/L.

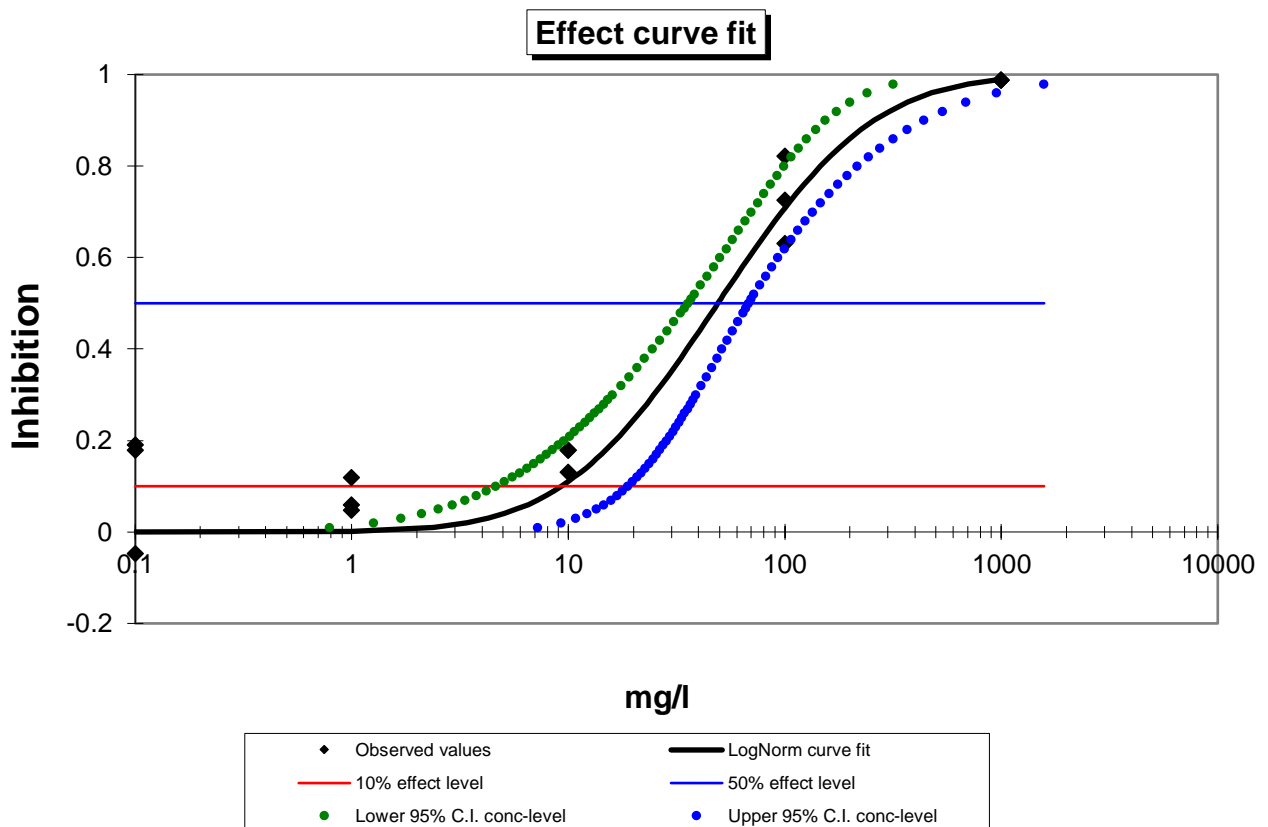


Figura 38: rappresentazione grafica della curva di effetto, dato dalla Pappetta AB57, calcolata interpolando i dati ottenuti praticamente con il metodo statistico LogNorm, restituita dal software "LWL" danese. In basso è presente la legenda.

Allegato 9 – risultati del test di tossicità acuta su *D. magna* (Straus, 1820)

Di seguito (Figura 39) si riporta la schermata DOS restituita dal software EPA Trimmed Spearman Karber, v3.1 dopo che questo ha elaborato i dati.

```
DATE:                                TEST NUMBER:                          DURATION:  24 h
TOXICANT :  AB57
SPECIES:  Daphnia magna

RAW DATA:  Concentration              Number              Mortalities
--- ----  (ug L-1)                    Exposed
          .00                          20                  2
          1.00                          20                  3
          10.00                         20                  3
          100.00                         20                  0
          1000.00                        20                  20

SPEARMAN-KARBER TRIM:                  .00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:             EC50:                316.23
                                         95% CONFIDENCE LIMITS
                                         ARE NOT RELIABLE.

NOTE:  MORTALITY PROPORTIONS WERE NOT MONOTONICALLY INCREASING.
       ADJUSTMENTS WERE MADE PRIOR TO SPEARMAN-KARBER ESTIMATION.
```

Figura 39: schermata restituita dal software EPA Trimmed Spearman Karber, v3.1 dopo che questo ha elaborato i dati ottenuti nel test acuto di 48 ore con *D. magna* (Straus, 1820). Da tener presente che l'unità di misura delle concentrazioni è sempre mg/L e non µg/L, come erroneamente riportato dal software. La stima calcolata col metodo di Spearman-Kraber è di 316,23 mg/L, non è possibile calcolare dei limiti di confidenza dato che la curva che modella i dati è troppo ripida. Si fa notare che, visto che le proporzioni di mortalità non erano monotonicamente crescenti, sono stati utilizzati degli aggiustamenti prima di calcolare la stima.

Allegato 10 – curve d’inibizione relative al test con l’alga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher, 1959)

Si presentano per primi i grafici calcolati con il controllo a base di bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ). In [Figura 40](#) viene riportato il tasso di crescita corrispondente alle varie concentrazioni testate mentre in [Figura 41](#) la curva degli effetti calcolata col metodo LogNorm, che interpola il maggior numero di dati possibile.

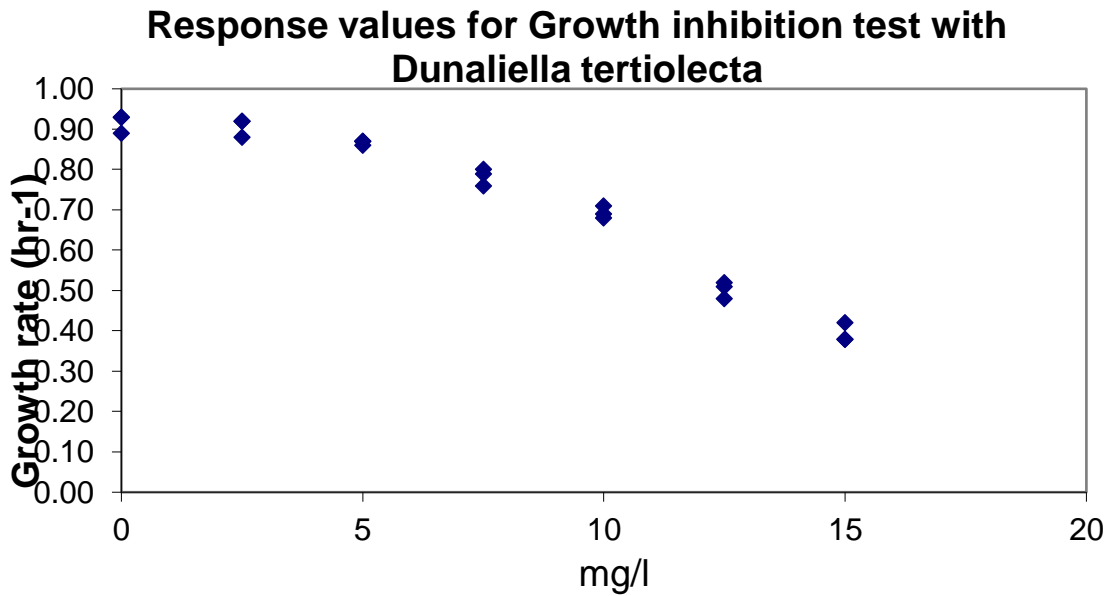


Figura 40: grafico restituito dal software “LWL” danese che rappresenta la risposta dei valori del tasso di crescita (in ordinata), dipendentemente dalla concentrazione di tossico, in questo caso bicromato di potassio,  $K_2Cr_2O_7$ , riportate in ascissa in mg/L.

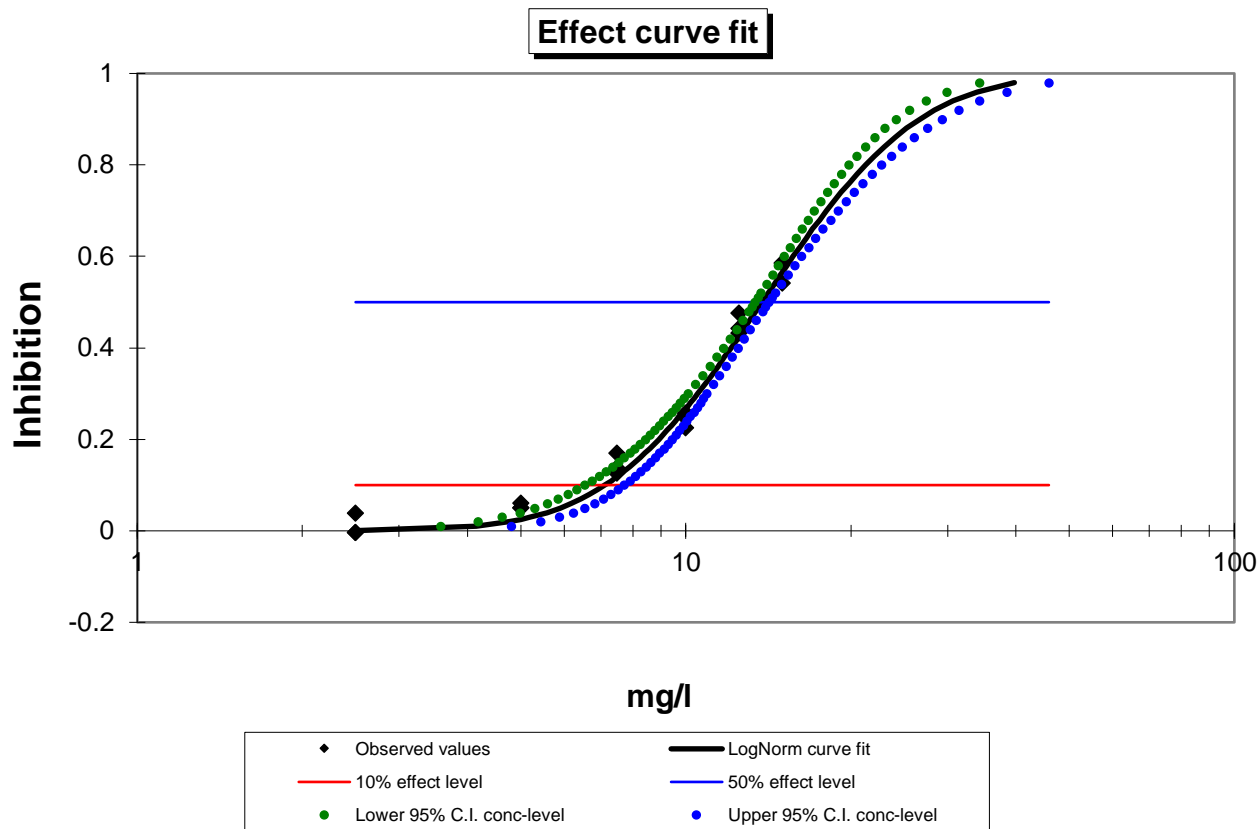


Figura 41: rappresentazione grafica della curva di effetto, dato da bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ), calcolata interpolando i dati ottenuti praticamente con il metodo statistico LogNorm, restituita dal software "LWL" danese. In basso è presente la legenda.

Seguono gli stessi grafici ottenuti per il test con la sostanza oggetto di studio, la Pappetta AB57, in [Figure 42](#) e [43](#).

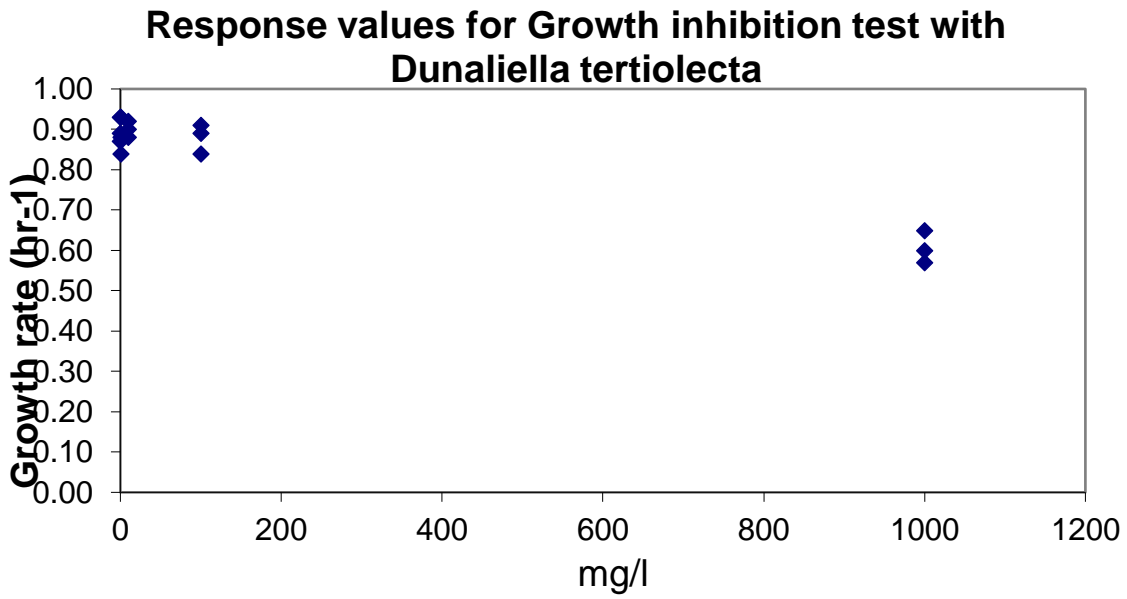


Figura 42: grafico restituito dal software "LWL" danese che rappresenta la risposta dei valori del tasso di crescita (in ordinata), dipendentemente dalla concentrazione di tossico, in questo caso Pappetta AB57, riportate in ascissa in mg/L.

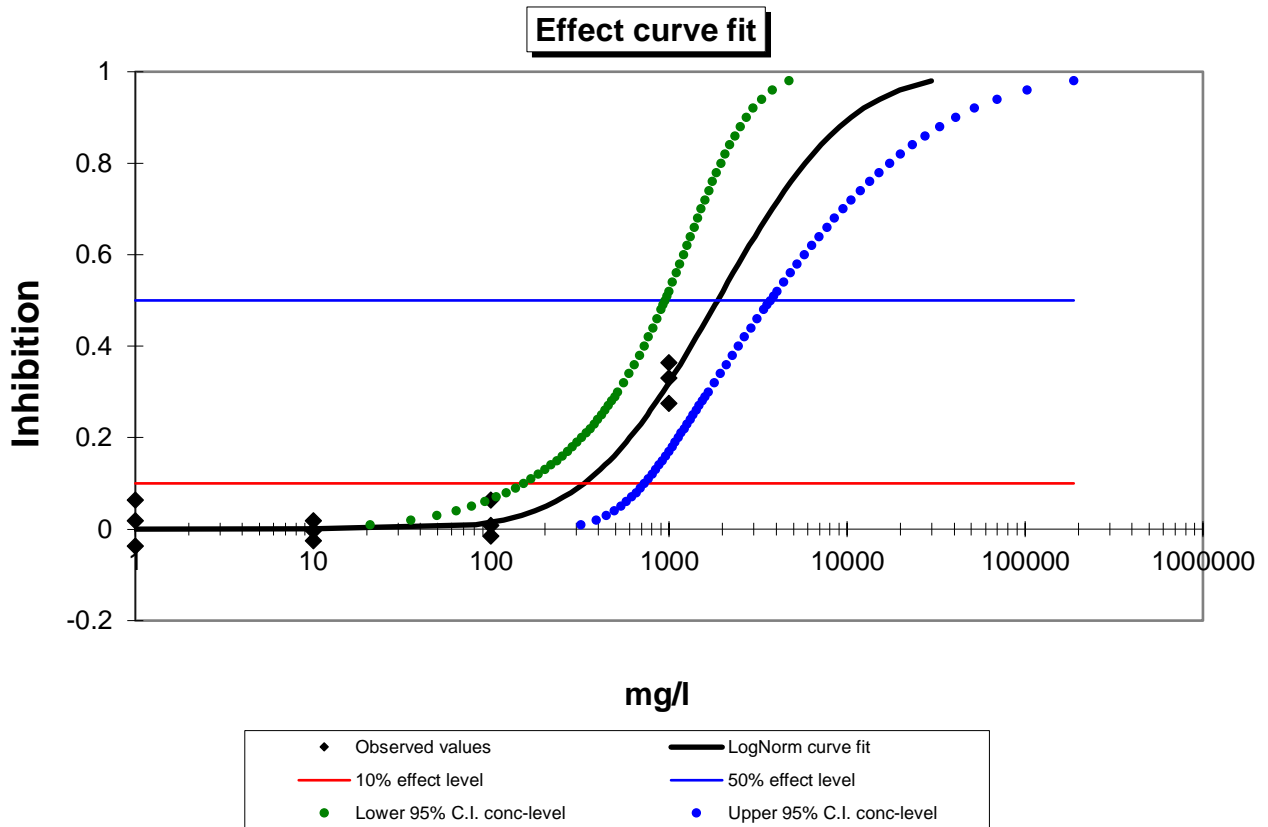


Figura 43: rappresentazione grafica della curva di effetto, dato dalla Pappetta AB57, calcolata interpolando i dati ottenuti praticamente con il metodo statistico LogNorm, restituita dal software "LWL" danese. In basso è presente la legenda.

Allegato 11 – curve d’inibizione relative al test con l’alga *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1898)

Con questa specie non si è raggiunta la concentrazione soglia per realizzare delle elaborazioni apprezzabili con il controllo positivo basato sul bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ). Si presentano dunque per primi i grafici calcolati con la Pappetta AB57. In [Figura 44](#) viene riportato il tasso di crescita corrispondente alle varie concentrazioni testate mentre in [Figura 45](#) la curva degli effetti calcolata col metodo LogNorm, che interpola il maggior numero di dati possibile.

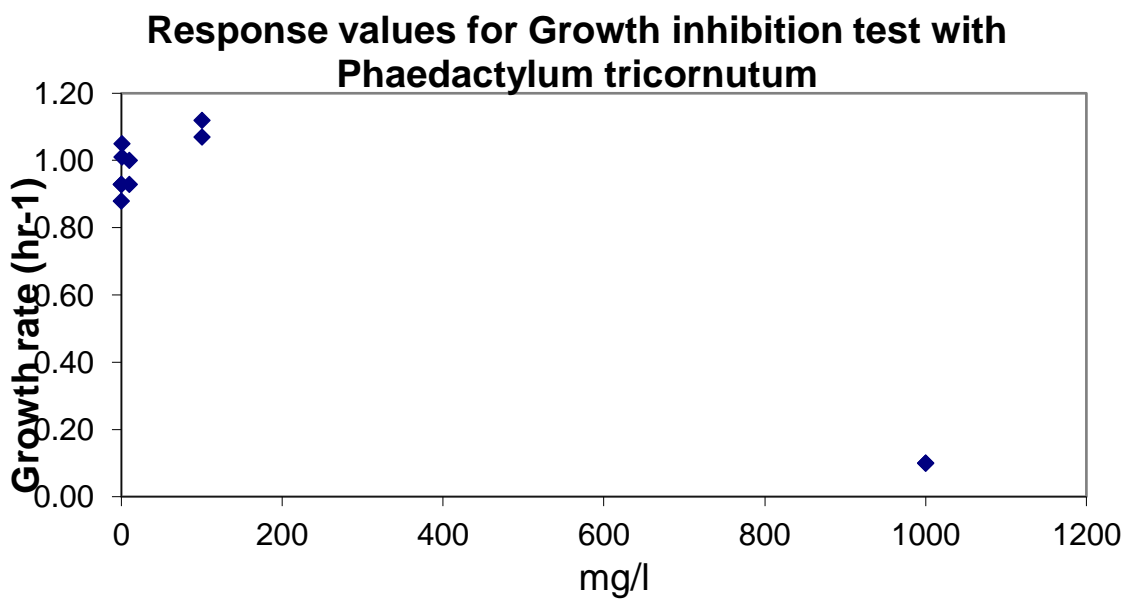


Figura 44: grafico restituito dal software "LWL" danese che rappresenta la risposta dei valori del tasso di crescita (in ordinata), dipendentemente dalla concentrazione di tossico, in questo caso Pappetta AB57, riportate in ascissa in mg/L.



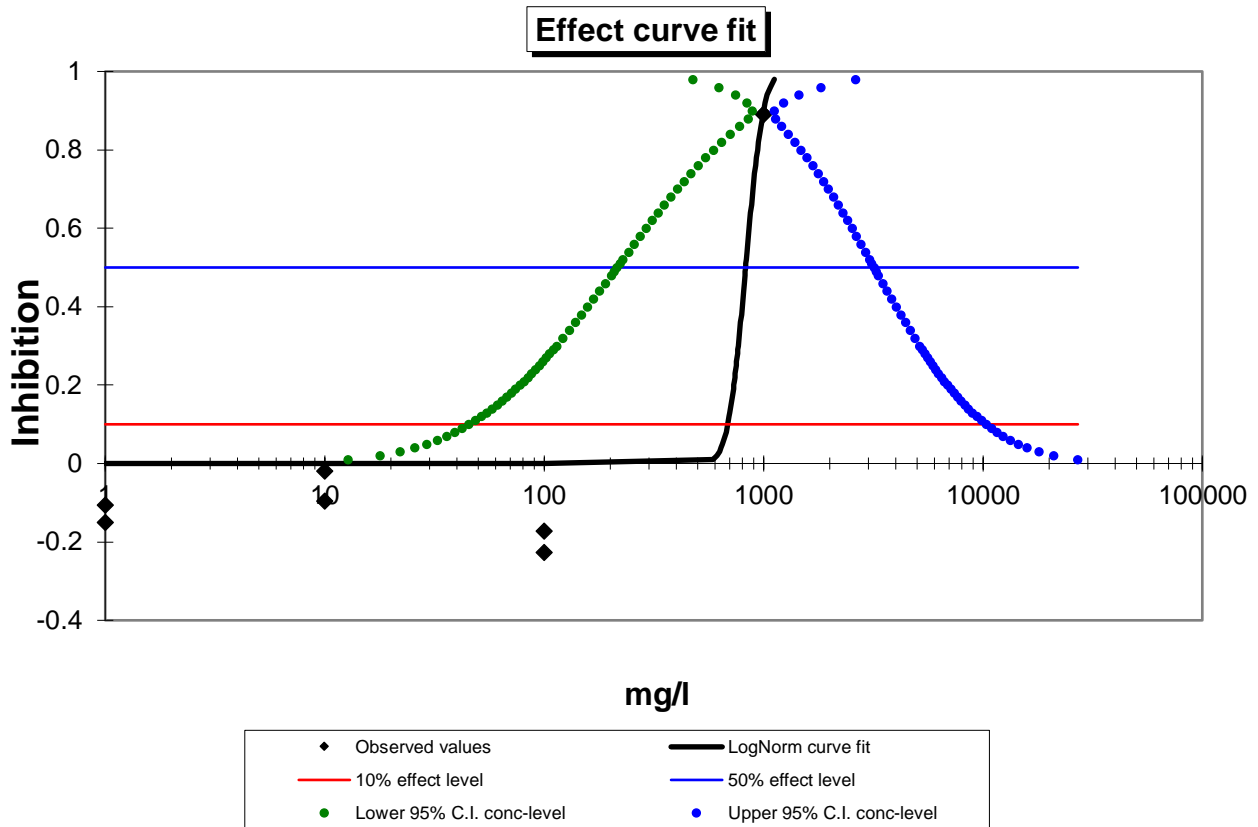


Figura 45: rappresentazione grafica della curva di effetto, dato dalla Pappetta AB57, calcolata interpolando i dati ottenuti praticamente con il metodo statistico LogNorm, restituita dal software "LWL" danese. In basso è presente la legenda. Visto il bassissimo effetto rilevato, presente solo alla concentrazione più alta (quella successiva presenta un tasso di crescita addirittura superiore al normale) e la gran variabilità dei dati, le soglie di confidenza non risultano credibili, com'è deducibile dal grafico.

Con la microalga in questione lo studio viene approfondito considerando anche il biocida cloruro di benzalconio singolarmente, per il quale si riportano gli stessi grafici a seguire, in [Figura 46](#) e [47](#).

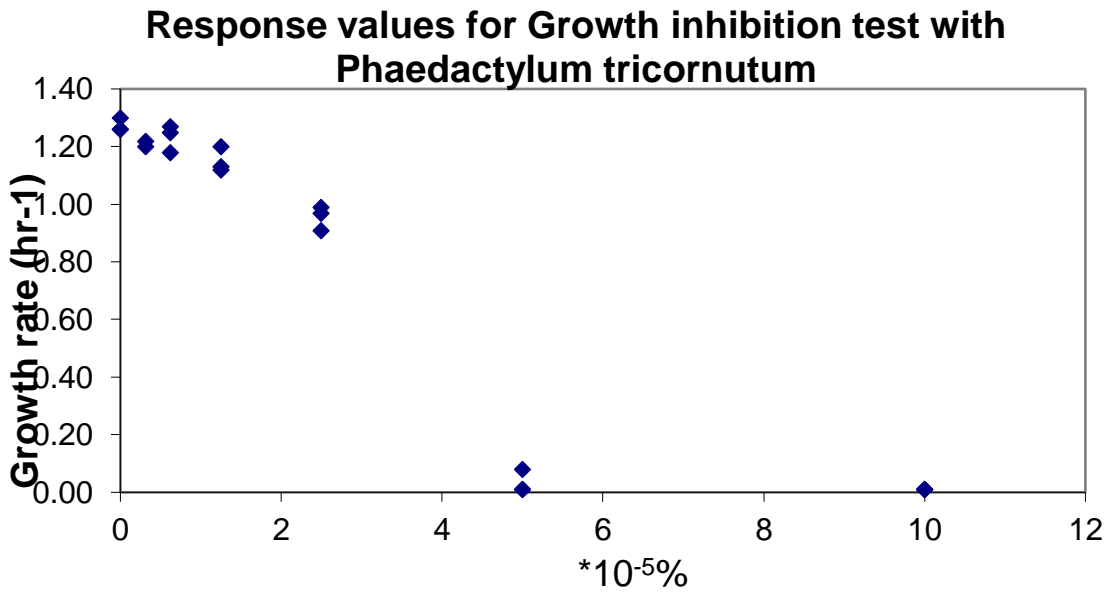


Figura 46: grafico restituito dal software "LWL" danese che rappresenta la risposta dei valori del tasso di crescita (in ordinata), dipendentemente dalla concentrazione di tossico, in questo caso cloruro di benzalconio, riportate in ascissa in  $\cdot 10^{-5}\%$ , cioè come frazione sul totale di composizione rispetto all'intera Pappetta AB57. Per la conversione in mg/L si rimanda al paragrafo contenente i "Materiali e metodi".

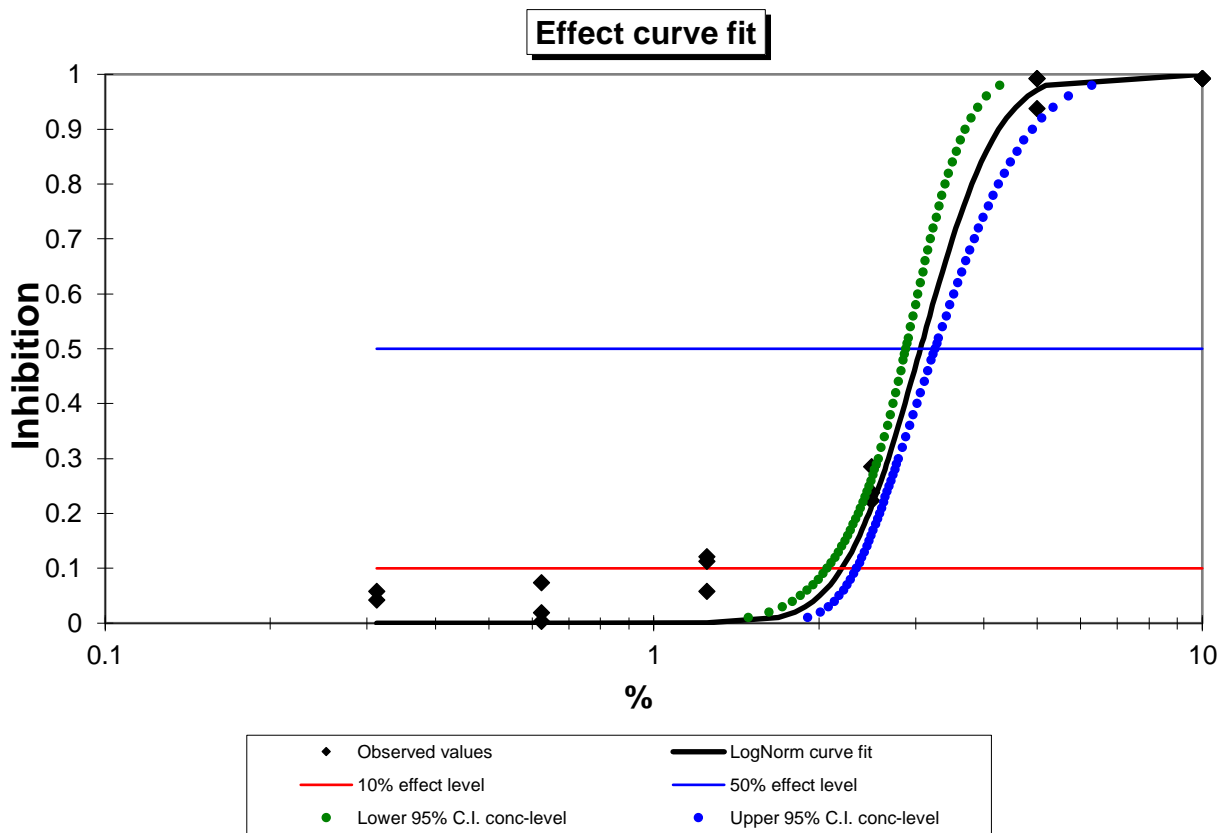


Figura 47: rappresentazione grafica della curva di effetto, dato dal cloruro di benzalconio, calcolata interpolando i dati ottenuti praticamente con il metodo statistico LogNorm, restituita dal software "LWL" danese. I valori dell'ascissa sono riportati in  $\cdot 10^{-5}\%$ , cioè

*come frazione sul totale di composizione rispetto all'intera Pappetta AB57. Per la conversione in mg/L si rimanda al paragrafo contenente i "Materiali e metodi". In basso è presente la legenda.*

Allegato 12 – dati estesi relativi al test di tossicità acuta su *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849)

Schermata restituita dal programma di elaborazione dati con interfaccia DOS EPA Trimmed Spearman Karber, v3.1, riportata in [Figura 48](#), per il test acuto con su *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849).

```

DATE: 6 settem          TEST NUMBER: n.1          DURATION: 48 H
TOXICANT : AB57
SPECIES: Acartia tonsa

RAW DATA: Concentration      Number      Mortalities
----- (mg/L)      Exposed
.00          100          0
1.00        100          17
10.00       100          17
100.00      100          33
1000.00     100          100

SPEARMAN-KARBER TRIM:          17.00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:    EC50:          145.03
                              95% LOWER CONFIDENCE: 102.87
                              95% UPPER CONFIDENCE: 204.48
-----
WOULD YOU LIKE TO HAVE A COPY SENT TO THE PRINTER(Y/N)?

```

Figura 48: schermata restituita dal software EPA Trimmed Spearman Karber, v3.1 dopo che questo ha elaborato i dati ottenuti nel test acuto di 48 ore con *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849). La stima calcolata col metodo di Spearman-Kraber è di 145,03 mg/L, con i limiti di confidenza evidenti subito a seguire.

Di seguito vengono riportati per esteso i dati rilevati con il test di tossicità acuta di 48 ore su *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849) ([Tabella 32](#)).

Tabella 32: rappresentazione estesa dei dati ottenuti con il test acuto su *Acartia (Acanthacartia) tonsa* (Dana, 1849). Le concentrazioni testate sono visibili in prima colonna. Seguono le tre repliche, per le quali viene riportato il valore come numero decimale, in cui 1 corrisponde al 100% di sopravvissuti e 0,5 al 50%. In ultima colonna la media delle tre repliche.

Concentrazione	Sopravvissuti			
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Media
1000 mg/L	0	0	0	0,00
100 mg/L	1	0,5	0,5	0,67
10 mg/L	0,5	1	1	0,83
1 mg/L	1	1	0,5	0,83

Allegato 13 – risultati estesi dati dall’elaborazione statistica ANOVA a una via per il test con *R. auricularia* (Linnaeus, 1758)

Di seguito, in Tabella 33, figura la schermata con tutti i parametri riportati dal software “Past” una volta effettuata l’analisi della varianza a una via per i risultati ottenuti al primo stadio (*shell formation*) alle varie concentrazioni con il test di tossicità sub-cronica con *R. auricularia* (Linnaeus, 1758).

*Tabella 33: risultati restituiti dall’elaborazione con il software “Past”, per quanto riguarda l’analisi delle varianze relativa allo stadio di shell formation. Si può osservare in ultima colonna come il valore di “p (same)” superi la soglia arbitraria di 0,05 e dunque le distribuzioni di dati possono venire considerate assimilabili.*

	<b>Somma dei quadrati</b>	<b>df</b>	<b>Quadrato medio</b>	<b>F</b>	<b>p (same)</b>
<b>Tra gruppi:</b>	4,91667	3	1,63889	0,437	0,7326
<b>All’interno dei gruppi:</b>	30	8	3,75		
<b>Totale:</b>	34,9167	11			
<b>omega<sup>2</sup>:</b>	-0,1638				
Test di Levene per l’omogeneità della varianza, dalle medie				p (same)	0,01261
Test di Levene, dalle mediane				p (same)	0,7326
Test F di Welch nel caso le varianze non siano uguali			F=0,2322	df=4,028	p=0,8699

Si continua, in Tabella 34, con le variabili statistiche restituite, sempre a seguito di un’analisi della varianza a una via, questa volta per il secondo stadio di sviluppo, definito *capsule rupture*.

*Tabella 34: risultati restituiti dall’elaborazione con il software “Past”, per quanto riguarda l’analisi delle varianze relativa allo stadio di capsule rupture. Si può osservare in ultima colonna come il valore di “p (same)” superi la soglia arbitraria di 0,05 e dunque le distribuzioni di dati possono venire considerate assimilabili.*

	<b>Somma dei quadrati</b>	<b>df</b>	<b>Quadrato medio</b>	<b>F</b>	<b>p (same)</b>
<b>Tra gruppi:</b>	401,583	3	133,861	1,456	0,2975
<b>All’interno dei gruppi:</b>	735,333	8	91,9167		
<b>Totale:</b>	1136,92	11			
<b>omega<sup>2</sup>:</b>	0,1024				
Test di Levene per l’omogeneità della varianza, dalle medie				p (same)	0,006227
Test di Levene, dalle mediane				p (same)	0,5715
Test F di Welch nel caso le varianze non siano uguali			F=10,95	df=3,865	p=0,02306

## Allegato 14 – dati estesi relativi al test di tossicità cronica su *D. magna* (Straus, 1820)

Vengono presentati per primi i valori relativi al controllo negativo (Tabella 35).

*Tabella 35: dati relativi al controllo (assenza di tossico nella soluzione) per il test cronico su D. magna (Straus, 1820). La prima colonna riporta l'identificativo dell'individuo, la seconda il totale di figli prodotti e la terza il numero di eventi riproduttivi avvenuti dei 21 giorni protocollari per quell'individuo. Le ultime tre righe presentano, nell'ordine, i valori di media, deviazione standard e coefficiente di variazione del numero di piccoli prodotti e degli eventi riproduttivi.*

Individuo	Totale	Eventi riproduttivi
1	23	4
2	33	4
3	35	4
4	29	4
5	37	4
6	36	4
7	31	4
8	24	3
9	28	3
10	32	4
<b>Media:</b>	<b>30,8</b>	<b>3,8</b>
<b>Deviazione standard:</b>	<b>4,803</b>	<b>0,422</b>
<b>Coefficiente di variazione:</b>	<b>0,156</b>	<b>0,111</b>

Seguono quelli ottenuti per la concentrazione più alta, di 1 mg/L (Tabella 36).

*Tabella 36: dati relativi alla concentrazione di 1 mg/L di Pappetta AB57, per il test cronico su D. magna (Straus, 1820). La prima colonna riporta l'identificativo dell'individuo, la seconda il totale di figli prodotti e la terza il numero di eventi riproduttivi avvenuti dei 21 giorni protocollari per quell'individuo. Le ultime tre righe presentano, nell'ordine, i valori di media, deviazione standard e coefficiente di variazione del numero di piccoli prodotti e degli eventi riproduttivi.*

Individuo	Totale	Eventi riproduttivi
1	32	4
2	27	3
3	27	4
4	18	3
5	23	3
6	27	4
7	25	4
8	23	4

9	31	3
10	15	2
<b>Media:</b>	<b>24,8</b>	<b>3,4</b>
<b>Deviazione standard:</b>	<b>5,308</b>	<b>0,699</b>
<b>Coefficiente di variazione:</b>	<b>0,214</b>	<b>0,206</b>

E si conclude con i risultati per la concentrazione di 0,1 mg/L (Tabella 37).

*Tabella 37 dati relativi alla concentrazione di 0,1 mg/L di Pappetta AB57, per il test cronico su D. magna (Straus, 1820). La prima colonna riporta l'identificativo dell'individuo, la seconda il totale di figli prodotti e la terza il numero di eventi riproduttivi avvenuti dei 21 giorni protocollari per quell'individuo. Le ultime tre righe presentano, nell'ordine, i valori di media, deviazione standard e coefficiente di variazione del numero di piccoli prodotti e degli eventi riproduttivi.*

<b>Individuo</b>	<b>Totale</b>	<b>Eventi riproduttivi</b>
1	31	4
2	16	3
3	31	4
4	27	4
5	30	4
6	33	4
7	26	4
8	31	4
9	13	3
10	24	4
<b>Media:</b>	<b>26,2</b>	<b>3,8</b>
<b>Deviazione standard:</b>	<b>6,779</b>	<b>0,422</b>
<b>Coefficiente di variazione:</b>	<b>0,259</b>	<b>0,111</b>

Allegato 15 – elaborazione statistica estesa per i dati relativi al test cronico con *D. magna* (Straus, 1820)

Di seguito, in Tabella 38, vengono riportati i valori restituiti dal software “Past” dopo aver verificato l’eventuale normalità delle tre distribuzioni di dati. La distribuzione ottenuta alla concentrazione di 0,1 mg/L risulta non normale, visto che il suo valore “*p* (normal)” è inferiore alla soglia arbitraria di 0,05.

*Tabella 38: parametri ottenuti dopo aver applicato il test di Shapiro-Wilk, tramite il software “Past”, per verificare la distribuzione normale dei dati relativi al test cronico con D. magna (Straus, 1820). “N” riporta il numero di repliche effettuate per la concentrazione in esame, nel particolare caso sono sempre 10. “Shapiro-Wilk W” indica il parametro restituito dal test. Perché i dati seguano una distribuzione normale, il valore “*p* (normal)” non deve superare la soglia di 0,05. Per la concentrazione di 0,1 mg/L la soglia viene superata e dunque i dati non seguono una distribuzione normale.*

	<b>Controllo</b>	<b>1 mg/L</b>	<b>0,1 mg/L</b>
<b>N</b>	10	10	10
<b>Shapiro-Wilk W</b>	0,946	0,942	0,840
<b><i>p</i> (normal)</b>	0,617	0,579	0,046

Si conclude con le variabili statistiche date dal test sulla varianza di Kruskal-Wallis, messo in pratica seguendo quanto assunto in Figura 19, che vengono riportate in Tabella 39.

*Tabella 39: risultati restituiti dopo l’analisi della varianza effettuata con il metodo di Kruskal-Wallis, dal software “Past”. Il parametro d’interesse viene riportato nella terza riga, “*p* (same)” ed è quello che costituisce la soglia discriminante tra un’effettiva differenza di varianze o meno. Dato che il valore è > 0,05, le varianze risultano uguali e dunque si può affermare che anche le distribuzioni di dati non abbiano differenze significative.*

<b>H (chi<sup>2</sup>)</b>	5,734
<b>H<sub>c</sub> (tie corrected)</b>	5,781
<b><i>p</i> (same)</b>	0,0556