



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI SCIENZE E TECNOLOGIE

Corso di Laurea Triennale
in Scienze Biologiche

INTERAZIONI
ANIMALI-AMBIENTE

Relatore
Prof.ssa Michela Sugni

Laureanda
Flavia Leotta

Anno Accademico 2022/2023

Sommario

Risposta comportamentale di <i>Asellus aquaticus</i> (Isopoda, Crustacea) in presenza del predatore <i>Procambarus clarkii</i> (Decapoda, Crustacea)	3
0. Riassunto	4
1. Introduzione	4
2. Materiali, Metodi e Tecniche	5
3. Risultati e Discussione	6
4. Conclusione	9
Valutazione della qualità delle acque del fiume Magra (Italia centro-settentrionale) attraverso indici biologici (IBE, NISECI)	10
1. Riassunto	11
2. Introduzione	11
3. Materiali, Metodi e Tecniche	13
3. Risultati e Discussione	14
3.1 Campionamento di macroinvertebrati per il calcolo dell'Indice Biotico Esteso (IBE)	14
3.2 Campionamento delle specie ittiche per il calcolo del NISECI	15
4. Conclusione	18
L'azione di inquinanti fisici (nanoplastiche) e chimici (glifosate) sul comportamento e la rigenerazione di <i>Ophiactis virens</i> (Ophiuridea: Echinodermata)	19
0. Riassunto	20
1. Introduzione	20
2. Materiali, Metodi e Tecniche	23
2.1 Test comportamentale: il tempo di ribaltamento	25
2.2 Morfologia macroscopica	25
2.3 Allestimento di campioni istologici	25
2.4 Allestimento di campioni per Microscopio elettronico a scansione (SEM)	26
2.5 Allestimento di campioni per microscopia confocale	26
3. Risultati e Discussione	27
4. Conclusione	34
Bibliografia	35
Ringraziamenti	43

Corso di laurea triennale in Scienze Biologiche

Anno Accademico 2022/2023

Tirocinio interno presso laboratori universitari

Percorso n° 7

Titolo: Interazioni animali-ambiente

Risposta comportamentale di *Asellus aquaticus* (Isopoda, Crustacea) in presenza del predatore *Procambarus clarkii* (Decapoda, Crustacea)

Flavia Leotta

928239

0. Riassunto

Lo studio svolto durante questo tirocinio pone attenzione sulla specie *Asellus aquaticus* e sul suo comportamento. Si è ipotizzato che in presenza di segnali chimici provenienti dal suo naturale predatore, la specie alloctona *Procambarus clarkii*, *Asellus aquaticus* attuasse strategie anti-predatorie, rappresentate da un aumento o diminuzione di movimento. I risultati ottenuti hanno mostrato un'assenza di cambiamenti nel comportamento: la motilità degli individui non presenta particolari variazioni se esposti ai segnali chimici di *Procambarus clarkii* o alla soluzione di controllo. Le similitudini di comportamento sembrano statisticamente più attribuibili al sito di campionamento che alla presenza o meno di segnali chimici nell'ambiente.

1. Introduzione

Asellus aquaticus, della famiglia Asellidae (Linnaeus 1758, *Oniscus aquaticus*), è un crostaceo isopode d'acqua dolce distribuito in tutta Europa (Elvira Lafuente *et al.*, 2021), dal Mediterraneo alla Scandinavia (L. Maltby, 1991). Si nutre principalmente di vegetazione in decomposizione, alghe microscopiche e piccoli invertebrati (Irene O'Callaghan *et al.*, 2019). Presenta un evidente dimorfismo sessuale già nelle dimensioni, in quanto il maschio è più grande della femmina (Jonathan Adams *et al.*, 1984). Inoltre, in questa specie l'accoppiamento è preceduto da un periodo chiamato "guardia del compagno", durante il quale il maschio trasporta la femmina fino a quando questa non può essere fecondata. Per permettere ciò gli individui maschi di *A. aquaticus* hanno delle apofisi sul primo paio di parapodi e, similmente, il quarto paio è ridotto e curvo, per potersi aggrappare alla femmina (Angéline Bertin *et al.*, 2002). I macroinvertebrati acquatici sono tra gli indicatori più usati per valutare lo stato ecologico di sorgenti e fiumi, per la loro abbondanza e per la loro diversa tolleranza ai cambiamenti ambientali (Leonard Sandin & Richard K. Johnson, 2000; Ben Mcfarland, 2010) e *Asellus aquaticus* non è un'eccezione (T. Akyüz *et al.*, 2001; H.J. De Lange *et al.*, 2005), per questo è una delle specie maggiormente descritta e studiata. Oltre ad essere un organismo robusto, tollerante a fluttuazioni di pH e della concentrazione di ossigeno (Maja Plahuta *et al.*, 2017), è anche un importante anello della catena alimentare dei suoi habitat, in quanto preda di molti animali diversi, ad esempio pesci come *Perca fluviatilis* (Martti Rask & Christa Hiisivuori, 1985) e planarie come *Dendrocoelum lacteum* (Turbellaria; Tricladida) (Mirco Bundschuh *et al.*, 2012). La letteratura descrive le interazioni con questi predatori e pone attenzione anche sull'interazione combinata tra predatori e inquinamento (Mirco Bundschuh *et al.*, 2012). Scarseggia però, materiale sul comportamento in presenza di *Procambarus clarkii*, un predatore alloctono molto diffuso negli ambienti in cui è possibile trovare *A. aquaticus*. È originario del sud degli Stati Uniti e Messico del Nord (Francisco J. Oficialdegui *et al.*, 2019), arrivato in Spagna nel 1973 e che si è distribuito molto

velocemente e uniformemente in tutta l'Europa Occidentale (A. Kouba *et. al.*, 2014). Si è ritenuto interessante studiare il comportamento di *Asellus aquaticus* in presenza di segnali chimici provenienti da *Procambarus clarkii*, per valutare se *A. aquaticus* adottasse delle strategie anti-predatorie come altre specie in presenza dei segnali chimici dei loro predatori (Charles W. Martin, 2014). Esempi di possibili strategie che si possono osservare in una preda sono una minore attività per diminuire la possibilità di essere individuati oppure un suo aumento per una migliore valutazione del rischio e come evitarlo (Kovalenko K. E. *et al.*, 2010).

2. Materiali, Metodi e Tecniche

Gli esemplari di *Asellus aquaticus* sono stati prelevati da tre siti di campionamento: Erba2 (CO), Brongio (LC), Merone1 (CO) il giorno 3 Maggio 2023 nelle omonime località. Sono stati lasciati acclimatare in laboratorio fino al giorno dopo in vaschette ossigenate contenenti acqua e substrato prelevati dai rispettivi siti di campionamento. L'esemplare di *Procambarus clarkii* è stato prelevato dal lago di Pusiano (tra Como e Lecco) lo stesso giorno. L'esperimento è stato svolto il giorno 4 Maggio 2023: ogni studente ha prelevato da un minimo di 4 a un massimo di 5 esemplari casualmente dalle vaschette, annotandone provenienza, lunghezza e sesso, che poteva essere quindi maschio, femmina o giovanile se troppo giovane da determinare attraverso l'osservazione di caratteri di dimorfismo sessuale (Figura 1).



Figura 1: Maschio, femmina e giovanile di *Asellus aquaticus*. Carta millimetrata come riferimento. Il quarto paio di parapodia nei maschi è più corto, per permetter loro di aggrapparsi alla femmina durante l'accoppiamento (Vandel, 1926.) Foto personale.

Il test è stato svolto ponendo l'individuo in un contenitore di forma quadrata, posizionato su un foglio in cui un disegno delimitava un'area quadrata divisa in 8 settori, 4 interni e 4 esterni (Figura 2). L'individuo è stato lasciato acclimatare per 2 minuti in acqua, per poi aggiungere 3 mL di soluzione contenenti i segnali chimici del predatore (acqua proveniente dalla vaschetta in cui era posto

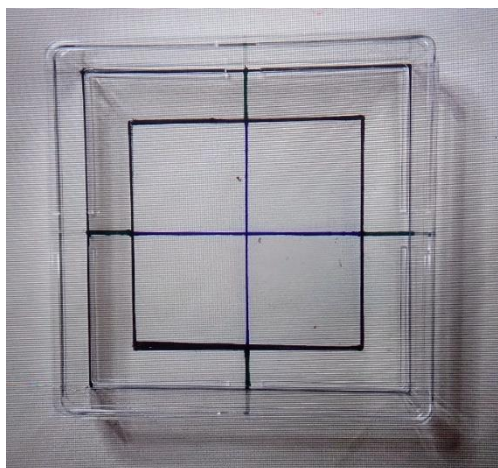


Figura 2: Contenitore di forma quadrata in plastica.
Foto personale.

l'individuo di *Procambarus clarkii*) o 3 mL di controllo (acqua). Ne è stato osservato il comportamento per 4 minuti. Sia dei segnali chimici che del controllo sono state ripetute 2 repliche, e sono stati annotati tutti i cambi di settore da parte di *Asellus aquaticus*.

Tutti i dati sono infine stati analizzati mediante opportuni test statistici tramite l'ausilio del programma RStudio.

3. Risultati e Discussione

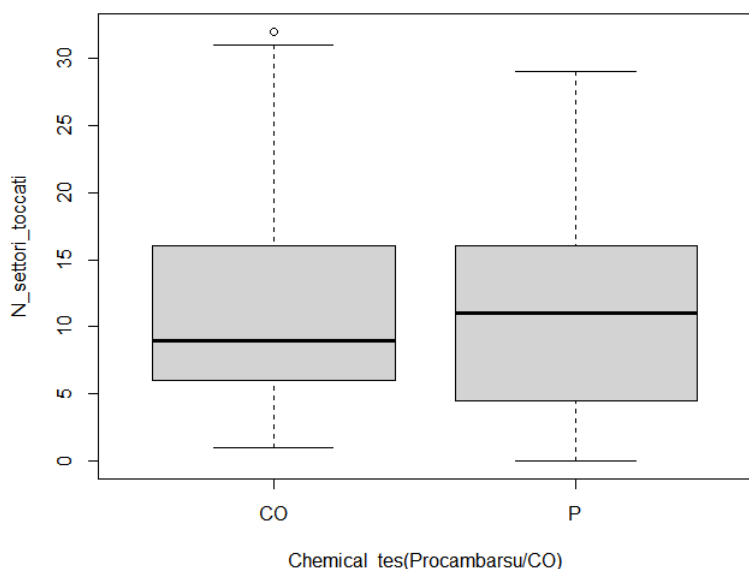


Grafico 1: Numero totale di settori toccati in presenza di controllo (CO) e segnale chimico (P).

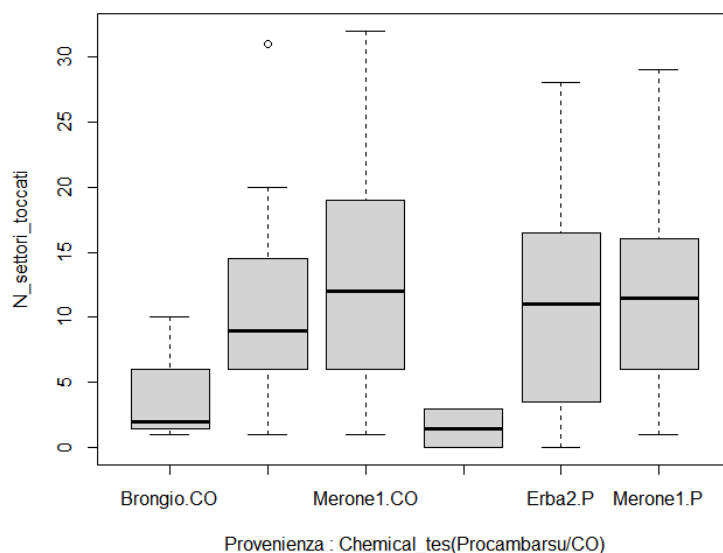


Grafico 2: Numero totale di settori toccati in presenza di controllo (CO) e segnale chimico (P) in base al sito di campionamento (Brongio, Erba, Merone).

I risultati ottenuti mostrano una completa assenza di cambiamento di movimento sia nel caso della soluzione di controllo ($11,45 \pm 0,97$) sia in presenza dei segnali chimici provenienti da *P. clarkii* ($11,34 \pm 0,99$) (Grafico 1). Prendendo in considerazione la sorgente di provenienza (Grafico 2) si possono visualizzare meglio le leggere variazioni osservate. Mentre in Brongio ($4,33 \pm 2,85$ con controllo; $1,50 \pm 1,50$ in presenza di segnali chimici) e in Merone ($12,88 \pm 1,43$ con controllo; $11,85 \pm 1,17$ con segnali chimici) il movimento è mediamente diminuito, in Erba ($10,46 \pm 1,31$ con controllo; $11,43 \pm 1,70$ in presenza di segnali chimici) è aumentato. Il motivo di questa variazione può essere ricercato nella tipologia di sorgente da cui gli individui sono stati prelevati. Brongio e

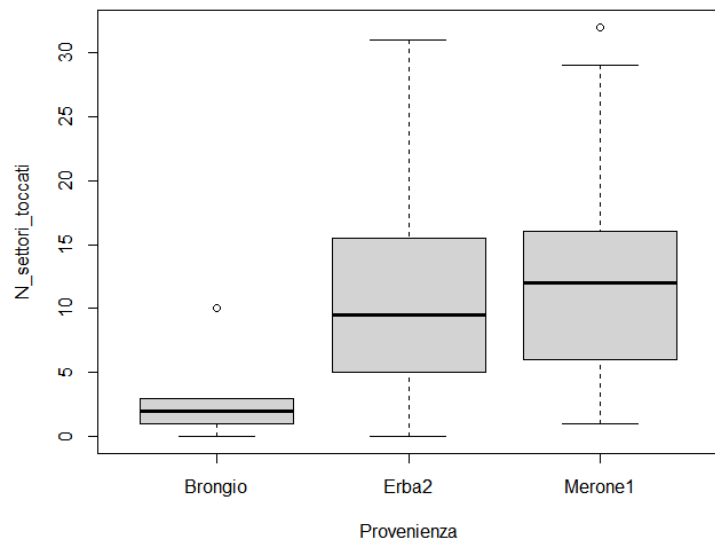


Grafico 3: Numero totale di settori toccati in funzione del sito di campionamento.

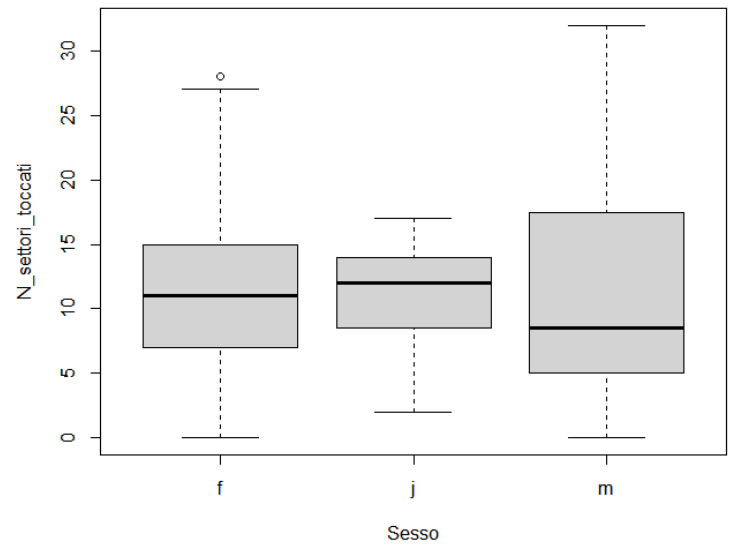


Grafico 4: Numero totale di settori toccati in funzione del sesso (f: femmina, m: maschio, j: giovanile).

Merone1, infatti, sono due sorgenti perenni, con un substrato molto fangoso. Brongio è inoltre ricco di foglie ed ombra, mentre il secondo sito è molto profondo. Erba2 è, invece, una sorgente temporanea con substrato sassoso. Una sorgente temporanea è un ecosistema lotico che può andare incontro a periodi di prosciugamento parziale o totale (Stubbington *et al.*, 2017): gli animali presenti in questo particolare tipo di ambiente si trovano periodicamente in condizioni diverse di luce, velocità di corrente, disponibilità di cibo e pressione predatoria. In superficie *A. aquaticus* è estremamente tigmotattico, preferendo spazi stretti e crepe, mentre in caverne e quindi ambienti coperti, rimane solitamente esposto e si aggrappa sulle pietre (Žiga Fišer *et al.*, 2019): questo potrebbe giustificare l'aumento di movimento nel caso degli individui provenienti da Erba, che potrebbero ricercare delle rocce a cui aggrapparsi, mentre gli esemplari di Merone1 e Brongio potrebbero diminuire l'attività per non essere individuati. Quest'ipotesi, però, non è supportata da una sufficiente valenza statistica in quanto le differenze di movimento non sono abbastanza evidenti. La provenienza è risultato essere l'unico dato statisticamente rilevante che influisce sul cambiamento di comportamento in *Asellus aquaticus*, a differenza della presenza o meno di segnali chimici e del sesso dell'individuo. Infatti, il movimento in generale degli individui di un dato sito di campionamento (Grafico 3) mostra che i crostacei prelevati da Merone si muovono, mediamente, di più ($12,37 \pm 0,92$) rispetto agli individui di Erba ($10,95 \pm 1,07$) e sicuramente rispetto a quelli provenienti da Brongio ($3,20 \pm 1,77$). Non sono state, inoltre, notate grandi differenze tra il movimento di maschi ($11,33 \pm 1,08$), femmine ($11,57 \pm 1,01$) e individui giovani ($10,91 \pm 1,51$) (Grafico 4). Gli esemplari non hanno avuto il tempo necessario per acclimatarsi in laboratorio (il tempo trascorso tra il prelievo dal sito e l'esperimento non raggiunge le 24 ore), ed essendo *Asellus aquaticus* sensibile alle alte temperature (Irene O'Callaghan *et al.*, 2019) il comportamento degli individui potrebbe averne risentito, soprattutto

quello degli individui giovani che hanno mediamente toccato meno settori. Tuttavia, la differenza di movimento non è significativa. In presenza di segnali chimici sia le femmine (da $10,93 \pm 1,22$ del controllo, a $12,22 \pm 1,62$) che i giovanili (da $10,67 \pm 2,25$ a $11,20 \pm 2,22$) si sono mossi mediamente di più, mentre i maschi (da $12,03 \pm 1,64$ a $10,63 \pm 1,41$) di meno (Grafico 5). Neanche questi dati, però, sono statisticamente rilevanti. Per quanto riguarda gli individui femmine, è stato ritenuto interessante osservare le differenze tra femmine gravide e non, condizione che potrebbe influenzare il loro comportamento (Grafico 6). Le femmine non gravide hanno seguito la tendenza generale di comportamento delle femmine, avendo un leggero aumento di movimento (da $9,83 \pm 1,13$ a $11,87 \pm 1,83$) in assenza e in presenza di segnali chimici da parte del predatore. Le femmine gravide, invece, hanno mostrato una leggera diminuzione (da $17,25 \pm 4,21$ a $14,25 \pm 3,07$). Anche in questo caso i dati non sono statisticamente rilevanti. Eseguendo test statistici su RStudio, si è notato che il parametro

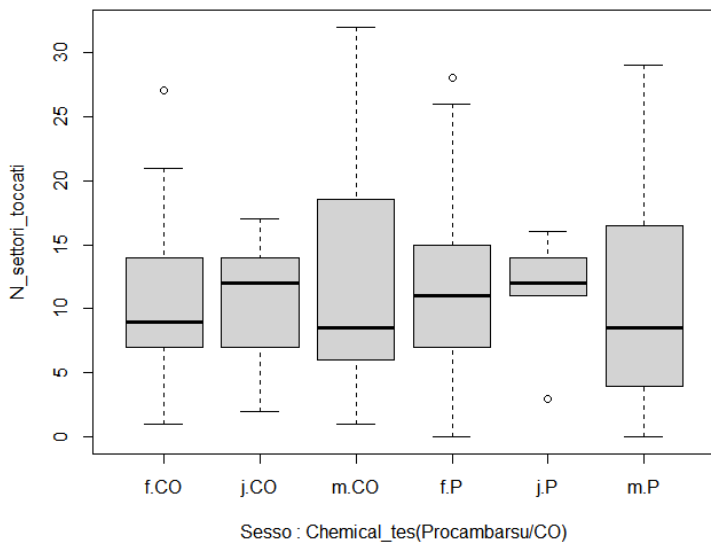


Grafico 5: Numero totale dei settori toccati in controllo (CO) e in presenza di segnali chimici (P), in base al sesso (f: femmina, m: maschio, j: giovanile)

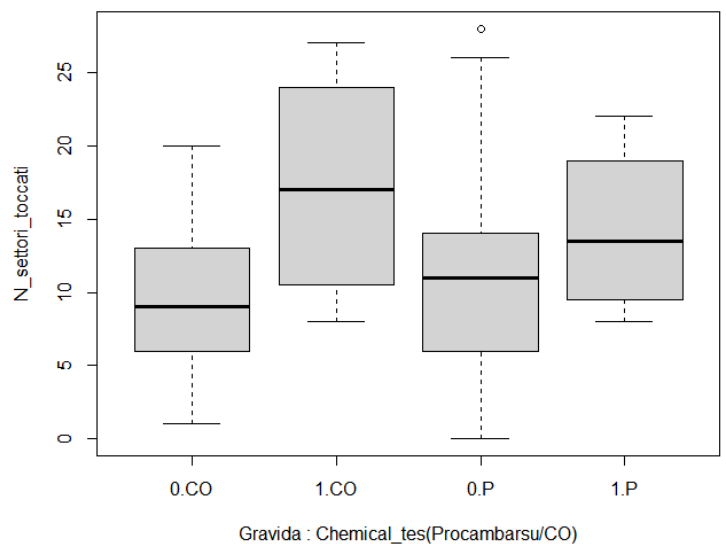


Grafico 6: Numero totale dei settori toccati in controllo (CO) e in presenza di segnali chimici (P) in femmine gravide (1) e non (0).

che influenza maggiormente i dati ottenuti è l'individualità, la risposta del singolo individuo alla presenza del segnale chimico. La grande variabilità individuale e quindi la mancanza di una risposta omogenea, potrebbe consentire alla specie di rispondere alla presenza del predatore in maniera differente e ciò permetterebbe alla popolazione di non risentire di una forte selezione quando si sposta da un ambiente all'altro, come nel caso di una zona di transizione quali sono le sorgenti. Quest'ipotesi, però, richiede studi più approfonditi: un secondo esperimento svolto con un maggior numero di individui potrebbe chiarire quanto la variabilità individuale abbia un certo impatto sui risultati ottenuti o se la sua influenza sui dati raccolti dipende solo da un campione non adeguatamente ampio. Per ripetere questo studio andrebbero, inoltre, seguite alcune accortezze in più: la mancata attenzione ad alcuni dettagli potrebbe aver influenzato i risultati ottenuti. *A. aquaticus* è, infatti, un ospite intermedio di alcuni parassiti che possono alterarne il comportamento (Žiga Fišer et al., 2019), quindi

gli individui andrebbero controllati attentamente prima di essere soggetti di un esperimento. Anche le condizioni in cui esso è stato svolto sono importanti: è riportato in letteratura che il non offrire un substrato adatto per le zampe dei crostacei bentonici causa stress durante gli esperimenti sul comportamento e non permette una performance realistica (Žiga Fišer *et al.*, 2019). Il substrato preferito da *A. aquaticus* è ruvido, ben diverso dalla superficie liscia del contenitore di plastica utilizzato in questo caso, e questo potrebbe aver generato bias o alterato il normale comportamento degli esemplari, che non sanno nuotare (Irene O'Callaghan *et al.*, 2019) e che quindi dipendono dalla presenza di un sedimento per spostarsi.

4. Conclusione

L'esperimento svolto mostra una completa assenza di cambiamenti comportamentali in presenza del predatore *Procambaeus clarkii*. L'attività di *Asellus aquaticus* non è né aumentata né diminuita, e ciò porterebbe all'esclusione di una qualsiasi strategia anti-predatoria, che sia essa di evitamento o di aumento della vigilanza. Come descritto in letteratura, una preda che non riconosce e non risponde ai segnali di un predatore subisce maggiore predazione: questo fenomeno è chiamato prey naiveté (Charles W. Martin, 2014). La prey naiveté di *Asellus aquaticus* potrebbe essere erroneamente attribuita alla mancata esposizione al predatore in quanto specie alloctona come *Procambarus clarkii*, ma è stato dimostrato in letteratura che le prede riescono a riconoscere predatori autoctoni ed alloctoni allo stesso modo (Kovalenko K. E. *et al.*, 2010). La mancanza di una storia co-evolutiva tra le due specie non è la causa dell'assenza di risposta al predatore. La risposta ad esso, qualora ci fosse, potrebbe essere sia innata che acquisita (Charles W. Martin, 2014) in seguito ad esposizione in natura ai segnali chimici o fisici del predatore. La seconda tipologia di risposta, o meglio, la mancanza d'essa, potrebbe spiegare il motivo del minore movimento negli individui provenienti dalla sorgente di Brongio ma non è una conclusione attendibile poiché non solo sono stati studiati solo due esemplari prelevati da tale sito di campionamento, ma gli *A. aquaticus* provenienti da Merone hanno mostrato un comportamento simile nonostante la convivenza con *Procambarus clarkii*. L'esperimento andrebbe ripetuto con un maggior numero di individui prelevati da molti più siti di campionamento. In conclusione, quindi, lo studio offre spazio a diverse riflessioni e rappresenta un buon punto di partenza per un esperimento su più larga scala che potrà sicuramente portare a nuovi risultati, siano essi simili o meno, ma sicuramente statisticamente più attendibili.

Corso di laurea triennale in Scienze Biologiche

Anno Accademico 2022/2023

Tirocinio interno presso laboratori universitari

Percorso n° 7

Titolo: Interazioni animali-ambiente

Valutazione della qualità delle acque del fiume Magra (Italia centro- settentrionale) attraverso indici biologici (IBE, NISECI)

Flavia Leotta

928239

1. Riassunto

L'oggetto di studio di questo tirocinio didattico è stata la qualità dell'acqua del fiume Magra, più precisamente del tratto che scorre nella regione Toscana. Sono stati raccolti due tipi diversi di bioindicatori, pesci e macroinvertebrati, per il calcolo di due differenti indici previsti dalla legislazione italiana: rispettivamente l'indice biotico esteso (IBE) e il Nuovo indice dello stato ecologico delle comunità ittiche (NISECI). I campionamenti sono stati svolti in due siti distinti (Grondola, a monte, ed Aulla, a valle) per poter, inoltre, osservare il concetto di River Continuum applicandolo ai risultati ottenuti dall'analisi dello stato ecologico. La poca quantità di specie ittiche raccolte non ha permesso il calcolo del NISECI, ma dall'analisi dell'IBE è stata ottenuta un'ottima valutazione della qualità delle acque, valutate di classe II a monte e di classe I a valle seguendo la conversione dei valori di IBE in classi di qualità.

2. Introduzione

Il bacino d'utenza del fiume Magra è localizzato nella Toscana settentrionale e in Liguria (Figura 1), possiede un'area di circa 1700 km² (B. Belletti *et al.*, 2015) e la sua lunghezza totale ammonta a 70 km (Massimo Rinaldi *et al.*, 2009).

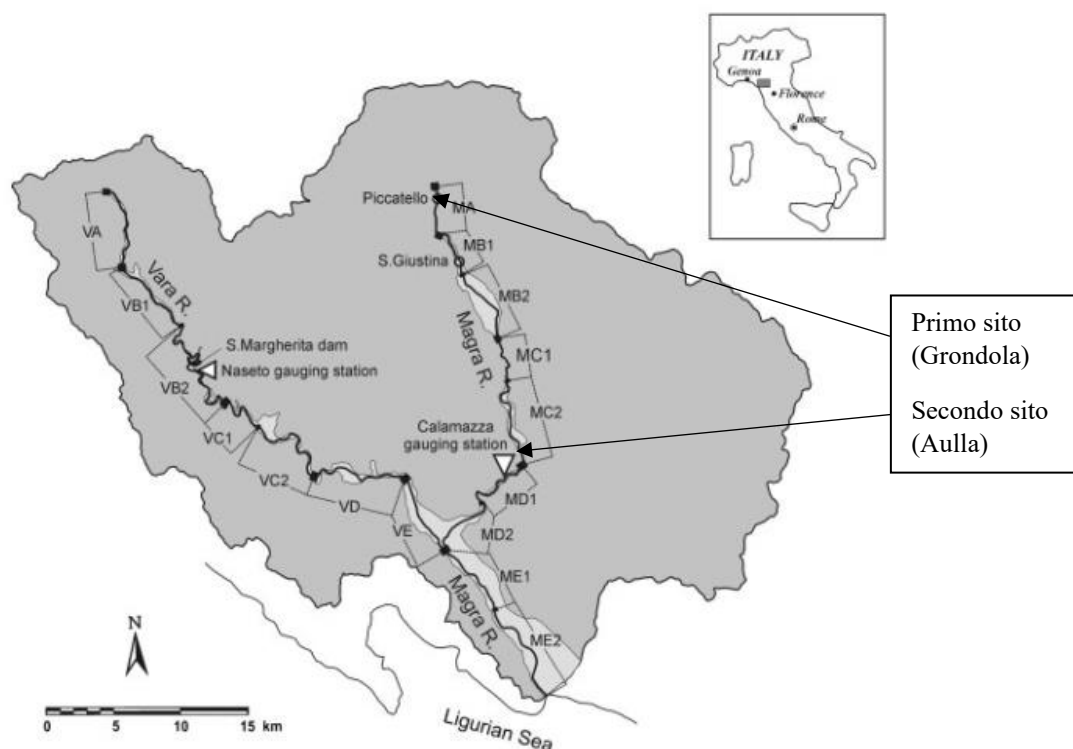


Figura 1: Bacino d'utenza del fiume Magra (a sinistra il Vara, il maggiore affluente). Immagine di Massimo Rinaldi *et al.*, 2009.

In generale, la maggior parte degli studi sul fiume Magra si concentra sul suo stato geo-fisico, con particolare attenzione sulle condizioni dei suoi sedimenti (Massimo Rinaldi *et al.*, 2009) e dalla sua morfologia che è stata parzialmente alterata da elementi artificiali, attività minerarie di estrazione della ghiaia e pratiche agricole e di allevamento (Simon Dufour *et al.*, 2015). Una buona parte della letteratura è stata pubblicata a partire dal 2011, in seguito all'alluvione del 25 ottobre (Laura Nardi & Massimo Rinaldi, 2015), ma anche questi studi fanno riferimento alle caratteristiche idrologiche del corso: di conseguenza ben poco si sa delle sue condizioni ecologiche e sullo stato di salute delle comunità presenti.

L'uso di macroinvertebrati bentonici come indicatori biologici è stato proposto più di 60 anni fa (Hynes, 1959; Alberto Sorace *et al.*, 2002) e rappresentano un modello ben consolidato, utilizzato in Italia e in altri paesi (John H. Olive *et al.*, 1988), per valutare variazioni ambientali causati dal cambiamento climatico (K. Khamis *et al.*, 2014) e dall'inquinamento (Marina Isidori *et al.*, 2004). Esistono diversi indici che utilizzano i macroinvertebrati come indicatori, come ad esempio il Biological Monitoring Working Party System usato in Gran Bretagna, il Belgian Biotic Index Method, utilizzato in Belgio (J. L. Metcalfe, 1989) e lo Slovak Saprobic Index in Slovacchia (Bruno Pennelli *et al.*, 2006): sono tutti metodi molto validi, ma in Italia è comunemente impiegato l'Indice Biotico Esteso (o IBE) (Marina Isidori *et al.*, 2004). L'Indice Biotico Esteso (IBE) si basa sull'analisi delle comunità di macroinvertebrati, che vivono associate al substrato e che posseggono diversa sensibilità ai cambiamenti nell'ambiente (ISPRES). I valori che IBE può assumere vanno da 0 (assenza completa di bioindicatori) a 14 (presenza di due o più generi di Plecotteri a 36 o più unità tassonomiche raccolte): i valori più alti sono indicativi di una buona qualità dell'acqua. Tiene in considerazione sia fattori chimici che fisici, integrandone i segnali tra di loro ed offrendone una valutazione qualitativa: conseguentemente, non permette di individuare l'azione dei singoli fattori né la loro rilevanza, ed è quindi più indicato da usare come metodo complementare ad altre analisi. È stato scelto come uno degli indici da calcolare in questo studio sia per il suo diffuso utilizzo per le indagini di altri fiumi italiani (A. Testi *et al.*, 2012) sia perché col decreto legislativo 152 dell'11 maggio 1999 (Marina Isidori *et al.*, 2004) è stato inserito tra le analisi obbligatorie di base per il monitoraggio dei corsi d'acqua. Un altro indice molto utilizzato in Italia è Il Nuovo indice dello stato ecologico delle comunità ittiche (NISECI), un indice biologico individuato dal DM 260/2010 in applicazione del D. Lgs 152/2006 come metodo ufficiale per l'analisi della componente ittica nella classificazione dello stato ecologico dei corpi idrici fluviali. Utilizza come principali criteri per la valutazione la composizione della comunità ittica; quindi, la presenza o meno di specie indigene attese (Macchio *et al.*, 2017). La condizione di riferimento è rappresentata da una comunità in cui siano presenti tutte le specie autoctone attese (Zerunian, 2004), in buona condizione biologica (quindi

ne si misurano le dimensioni e l'età degli individui), e siano assenti specie aliene o ibridi. Il territorio nazionale è quindi diviso in tre regioni ittiogeografiche (Zerunian, 2002): Regione Padana, Regione Italico-peninsulare e Regione delle Isole, all'interno delle quali si distinguono tre zone ittiche, ovvero Zona dei Salmonidi, Zona dei Ciprinidi a deposizione litofila e Zona dei Ciprinidi a deposizione fitofila. Per ciascuna delle nove zone è definita una comunità ittica attesa. Nei fiumi si possono trovare zone relativamente invariate ed altre molto alterate in modo naturale, in concordanza col Concetto di River Continuum (RCC) che intende lo scorrere di un fiume come un naturale e continuo susseguirsi di gradienti di condizioni fisiche: larghezza, profondità, velocità, portata, temperatura ed entropia (Robin L. Vannote *et al.*, 1980). Seguendo tale concetto ci si aspetta, quindi, che i fiumi o le parti di esso in successione, possano essere raggruppati in sorgenti (ordine 1-3), corsi d'acqua di medie dimensioni (4-6) e grandi fiumi (>6), con diversi apporti di sostanza organica lungo il corso. Queste condizioni, quindi, produrrebbero una risposta a livello della composizione delle popolazioni che vivono nel fiume: man mano che ci si sposta verso valle, ci si aspetta la presenza di specie sempre più resistenti alla mancanza di ossigeno e all'aumento degli inquinanti. L'obiettivo di questo studio è quello di valutare la qualità dell'acqua del fiume attraverso i due indici menzionati (IBE e NISECI), ed integrarli all'interno del concetto di River Continuum.

3. Materiali, Metodi e Tecniche

Il fiume selezionato per questo studio è il Magra, fiume che scorre sia in Toscana che in Liguria. Sono stati campionati due siti nella regione Toscana (Figura 1) il giorno 26 Aprile 2023: a Grondola (MS) (Immagine 2), vicino alla sorgente (N 44°25'29.064" E 9°50'21.84") e ad Aulla (MS) (Immagine 3), vicino alla foce (N 44°12'50.5548" E 9°57'58.896"). La fauna ittica è stata prelevata nei due siti da 4 operatori mediante utilizzo di elettrostorditore. I pesci, attratti dal campo creato dallo strumento, sono stati catturati con retino e sedati per qualche minuto attraverso un'appropriata quantità di olio di semi di garofano. Ne sono state raccolte le misure di peso e lunghezza totale, alla furca e standard, per poi essere liberati, previo un breve periodo in acqua pulita, per permettere lo smaltimento del sedativo. I macroinvertebrati acquatici sono invece stati raccolti con un retino



Immagine 2: sito di campionamento di Grondola.
Immagine personale.



Immagine 3: sito di campionamento di Aulla.
Operatori con elettrostorditore. Immagine personale.

immanicato per un campionamento prettamente qualitativo: l'operatore ha sollevato leggermente il substrato con i piedi per qualche secondo perché gli organismi si separassero da esso e venissero trascinati dalla corrente nel retino e infine in un contenitore di plastica a forma di bottiglia. Sono stati così riempiti 12 contenitori, 6 a monte e 6 a valle, e lo stesso giorno l'acqua è stata sostituita con etanolo al 100% per permettere la conservazione degli organismi raccolti. Questi sono poi stati conservati a 4°C fino al giorno 15 Maggio 2023, quando si è proceduto al riconoscimento dei taxa mediante ausilio di tavole dicotomiche (Ghetti Pier Francesco & Giuseppe Sansoni, 2005), classificazione e conteggio.

3. Risultati e Discussione

3.1 Campionamento di macroinvertebrati per il calcolo dell'Indice Biotico Esteso (IBE)

I macroinvertebrati acquatici sono stati riconosciuti alla più bassa categoria tassonomica possibile, e i dati sono stati riportati in Tabella 1, seguendo specifiche guide riportate sul sito dell'ISPRA.

Tabella 1 – Organismi bentonici raccolti a monte (Grondola) e a valle (Aulla)		
Organismi	Genere/famiglia	
	Monte (Grondola)	Valle (Aulla)
Plecotteri	<i>Capnia</i>	<i>Capnia</i> <i>Isoperla</i>
Efemerotteri	<i>Ephenera</i> <i>Rithrogena</i> <i>Baetis</i> <i>Ephemerella</i> <i>Ephoron</i> <i>Procleon</i> <i>Heptagenidae</i> <i>Ecdyonurus</i> <i>Habrophlebia</i> <i>Habroleptoides</i>	<i>Ephenera</i> <i>Rithrogena</i> <i>Baetis</i> <i>Ephemerella</i> <i>Ecdyonurus</i> <i>Habroleptoides</i> <i>Acentrella-sinaica</i>
Tricotteri	Hydropsychidae Rhyacophilidae Philopotamidae Odontoceridae	Hydropsychidae Rhyacophilidae Philopotamidae Odontoceridae
Coleotteri		Gyrinidae
Odonati		Anisotteri
Ditteri	Anthomydidae Chironomidae Tipulidae	Chironomidae Tipulidae Limonidae
Eterotteri		<i>Micronecta</i>
Oligocheti		Lumbricidae
Totale	18	20

Nonostante le leggere differenze di substrato tra i due siti (ghiaia più grossolana a Grondola e più fine ad Aulla), non si notano forti differenze di popolazioni, anche se la maggior ricchezza tassonomica trovata da Aulla è concorde con le previsioni del RCC per un corso d'acqua di medie dimensioni (Xiaoming Jiang *et al.*, 2011). Il sito di Aulla presenta un numero maggiore di taxa meno sensibili all'impoverimento di ossigeno (Coleotteri, Odonati, Eterotteri, Oligocheti) coerentemente col RCC, ma allo stesso tempo mostra la presenza di Plecotteri, l'unità sistematica più sensibile, il che rappresenta una buona qualità dell'acqua, abbastanza ricca di ossigeno da permettere la sopravvivenza di tale taxon. È stata utilizzata la tabella per il calcolo dell'IBE riportata sul sito dell'ISPRA, tabella a doppia entrata, in cui le variabili sono la presenza di taxa sensibili e il numero di US (Unità sistematiche). La differenza di numero di unità sistematiche di Plecotteri, seppur piccola (1 a monte, 2 a valle), permette all'IBE a valle di non scendere al di sotto di 8, che corrisponde già a un ambiente con soli moderati sintomi di alterazione (Tabella 2). Oltre a causa dell'applicazione del concetto di River Continuum e quindi la posizione del sito di Aulla come fiume di medio ordine (4° - 6°), la presenza di strutture e argini artificiali per prevenire gli allagamenti nell'area urbana di Aulla dovrebbe portare a una maggiore artificialità (B. Belletti *et al.*, 2015) e quindi a un'alterazione maggiore delle condizioni in quel tratto rispetto a quello di Grondola, più a monte. Considerata la presenza di plecoteri sia a monte che a valle, e 18 US per il primo sito e 20 per il secondo, l'indice risulta 9 a monte e 10 a valle, che corrispondono alle classi di qualità rispettivamente II ed I (Tabella 2). I due valori e il numero di unità sistematiche sono molto simili in entrambi i siti, dimostrando una buona conservazione della qualità dell'acqua lungo tutto il tratto di fiume considerato. La discrepanza rispetto al River Continuum Concept, però, non è motivo di preoccupazione: è, infatti, possibile a causa di moltissimi fattori ambientali come la vegetazione, afflussi di fertilizzanti e attività umane come agricoltura e urbanizzazione (Xiaoming Jiang *et al.*, 2011).

Tabella 2 – Conversione di EBI nelle classi di qualità

Classe	EBI	Significato
I	10-14	Ambiente non alterato in modo sensibile
II	8-9	Ambiente con moderati sintomi di alterazione
III	6-7	Ambiente alterato
IV	4-5	Ambiente molto alterato
V	0-3	Ambiente fortemente degradato

3.2 Campionamento delle specie ittiche per il calcolo del NISECI

Per il calcolo del NISECI sono stati raccolti i pesci delle specie riportate in Tabella 3. L'indice richiede inoltre anche la valutazione della condizione biologica delle popolazioni, con attenzione alla

sua struttura: per questo vengono riportate anche le medie delle misure di peso e lunghezza (totale). Ovviamente, delle specie di cui è stato trovato un solo individuo, sono riportate le misure prese e non le medie. Delle tre specie più abbondanti, sono stati costruiti i grafici del rapporto peso/lunghezza, che dimostra un andamento esponenziale con un buon livello di correlazione lineare ($R^2 > 0,85$) nel caso delle specie *Salmo trutta*, variante atlantica (Grafico 1) e *Squalius lucumonis* (Grafico 2) e molto alto ($R^2 > 0,95$) nel caso di *Squalius squalus* (Grafico 3). Una così buona correlazione lineare è anche data dal fatto che di quest'ultima specie è stato escluso un valore outlier. Non è stato creato nessun grafico per le specie con meno di 8 individui.

Tabella 3 – Analisi dei pesci a monte (Grondola) e valle (Aulla)

	Specie	Numero individui	Lunghezza media (cm)	Peso medio (g)
Monte (Grondola) Zona dei salmonidi	Trota fario (var. atlantica) <i>Salmo trutta</i> ¹	39	13,57 ± 0,49	27,26 ± 2,90
	Trota fario (var. mediterranea) <i>Salmo ghigii</i> *	1	30,10	228,00
	Anguilla <i>Anguilla anguilla</i> *	3	33,67 ± 0,54	77,33 ± 4,41
Valle (Aulla) Zona dei Ciprinidi a deposizione litofila	Barbo <i>Barbus plebejus</i> *	3	36,67 ± 12,60	1138,33 ± 569,88
	Cavedano etrusco <i>Squalius lucumonis</i>	8	11,19 ± 0,51	17,13 ± 0,51
	Cavedano italico <i>Squalius squalus</i>	12	13,23 ± 3,54	143,42 ± 120,20
	Rovella <i>Sarmarutilus rubilio</i>	1	7,40	4,00
	Vairone <i>Telestes muticellus</i>	1	11,90	19,00
	Legenda: ¹ : Specie a nocività media. *: specie attese			

In Italia *Squalius squalus* è una delle specie di acqua dolce più comune: in molti ecosistemi è la specie dominante (L. Pompei *et al.*, 2011), coerentemente con i risultati ottenuti dal campionamento nella zona di Aulla. *S. lucumonis*, *T. multicellus* e *S. rubilio* vivono associati tra di loro, costituendo parte della comunità ittica di torrente (Pier Giorgio Bianco, *et al.*, 2013). *Squalius lucumonis* è una specie in pericolo critico secondo la lista dell'IUCN, e sopravvive solo nel reticolo idrografico italiano secondario, con popolazioni sparse ed isolate. Le dimensioni medie degli individui oggetto di questo studio sono nella norma (Grafico 2), in quanto solitamente la maggior parte degli individui non supera la lunghezza standard di 130-140 mm (Pier Giorgio Bianco, *et al.*, 2013).

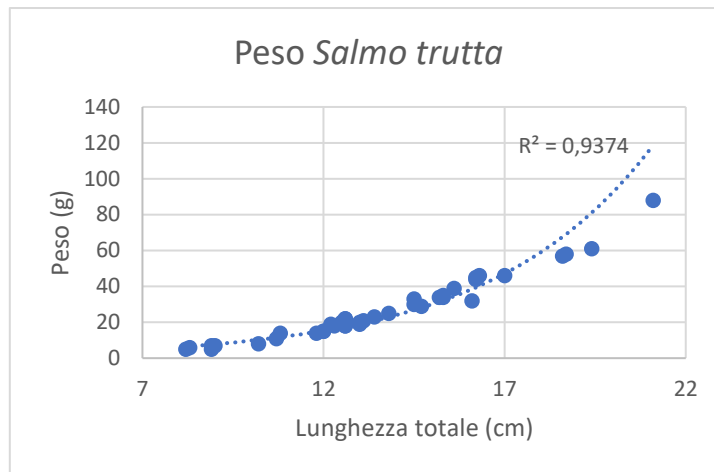


Grafico 1 : Rapporto peso/lunghezza tra gli individui di *Salmo trutta* (Trota fario, variante atlantica).

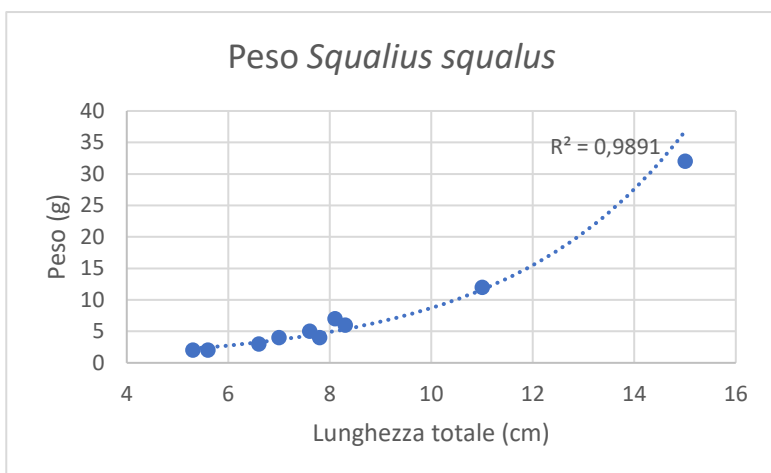


Grafico 3: Rapporto peso/lunghezza tra gli individui di *Squalius squalus* (Cavedano etrusco).

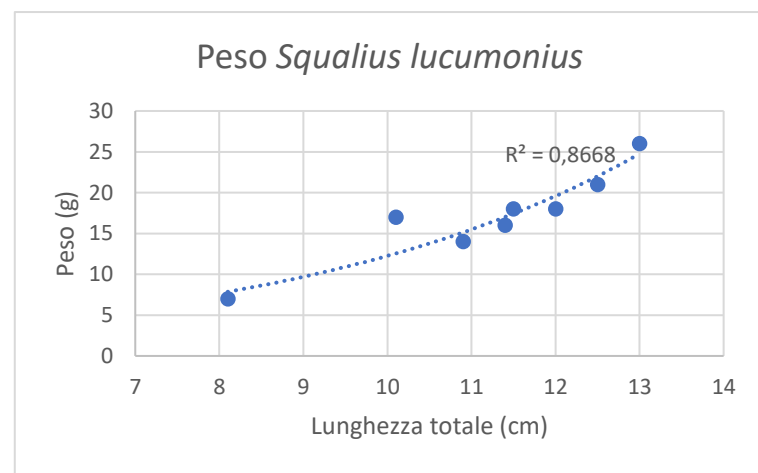


Grafico 2 : Rapporto peso/lunghezza tra gli individui di *Squalius lucumonius* (Cavedano etrusco).

Le principali minacce per la specie endemiche d'acqua dolce sono le alterazioni degli habitat, l'inquinamento delle acque, pesca eccessiva e illegale e l'introduzione di specie aliene (Zerunian, 2007). Probabilmente questo è uno dei motivi per cui *Salmo trutta* (var. atlantica) è così abbondante rispetto a *Salmo ghigii* (var. mediterranea), rappresentando il 97,5% dei Salmonidi campionati. È una specie di origini centro europee, di media nocività per le comunità indigene dei fiumi italiani (Zerunian, 2004) introdotta a metà del XIX secolo (Anna Rita Rossi *et al.*, 2022) per motivi riconducibili alla pesca sportiva (Pier Giorgio Bianco *et al.*, 2013) che compete per le risorse del fiume e genera ibridi con la specie endemica. *Salmo ghigii*, infatti, era in passato molto più diffusa in tutta l'area alpina, mentre ad oggi è possibile trovarla solo sul loro versante sud-ovest (Gianluca Polgar *et al.*, 2022). Fortunatamente in letteratura è già stata sottolineata l'importanza del preservare

le specie endemiche di queste aree (come *Salmo ghigii* e *Salmo marmoratus*) dalla presenza nociva di *Salmo trutta* (Gianluca Polgar *et al.*, 2022).

Per il calcolo del NISECI, la zona oggetto di studio è considerata Regione Italico-peninsulare (Zerunian, 2002). Nonostante il ritrovamento di specie indigene e la mancanza di ibridi, non è stato possibile il calcolo del NISECI mediante la formula riportata in Macchio *et al.*, 2017, in quanto le specie prelevate sono comunque troppo poche e l'indice avrebbe sottostimato la qualità delle acque (Tabella 4), ottenendo uno stato ecologico cattivo o scadente. La sottostima è stata provocata da un campionamento troppo breve a causa delle tempistiche dello studio svolto, essendo esso a carattere didattico. Non è stato possibile prendere in considerazione tutti gli habitat presenti nel tratto di fiume studiato (sia a Grondola che ad Aulla), e di conseguenza non si può escludere la presenza di altre specie sia endemiche che alloctone non riportate in questo studio.

Tabella 4 – Valori soglia NISECI (Macchio *et al.*, 2017)

Stato ecologico	Valori soglia NISECI
Elevato	$0,525 \leq \text{NISECI}$
Buono	$0,322 \leq \text{NISECI} < 0,525$
Moderato	$0,198 \leq \text{NISECI} < 0,322$
Scadente	$0,121 \leq \text{NISECI} < 0,198$
Cattivo	$\text{NISECI} < 0,121$

4. Conclusione

Lo studio ha illustrato quindi un quadro molto positivo della qualità delle acque del fiume Magra, ma non ha preso in considerazione tutte le variabili. Per una corretta valutazione, è di fondamentale importanza lo studio, in contemporanea, delle proprietà fisico-chimiche, tossicologiche e biologiche (Marina Isidori *et al.*, 2004). Concentrarsi su una sola di queste componenti può comportare una sottostima dell'alterazione dei corsi d'acqua oggetti di studio: questo potrebbe spiegare il perché di un IBE così elevato e soprattutto più alto a valle che a monte, un risultato in contrasto con il concetto di River Continuum. È inoltre probabile che, così come non è stato possibile raccogliere abbastanza dati sulla fauna ittica per il calcolo del NISECI, anche la raccolta di macroinvertebrati per il calcolo di IBE abbia risentito del poco tempo a disposizione. È consigliabile ripetere lo studio quindi: (i) prolungando i tempi per permettere un approccio più meticoloso, (ii) valutando anche le condizioni fisico-chimiche e tossicologiche del fiume, (iii) prendendo in considerazione anche altri bioindicatori sia animali che vegetali (A. Testi *et al.*, 2012), per integrare i dati e compararli, ottenendo un'analisi più accurata.

Corso di laurea triennale in Scienze Biologiche

Anno Accademico 2022/2023

Tirocinio interno presso laboratori universitari

Percorso n° 7

Titolo: Interazioni animali-ambiente

**L'azione di inquinanti fisici
(nanoplastiche) e chimici (glifosate) sul
comportamento e la rigenerazione di
Ophiactis virens (Ophiuridea:
Echinodermata)**

Flavia Leotta

928239

0. Riassunto

Lo studio svolto durante questo tirocinio didattico ha come obiettivo quello di valutare l'azione di inquinanti sia chimici che fisici sulla specie *Ophiactis virens*, un echinoderma della classe degli Ofiuroidei. Gli esemplari sono stati esposti a concentrazioni diverse sia di un erbicida, il glifosato (l'inquinante chimico) che di nanoplastiche di polistirene (il contaminante fisico) per due settimane, alla fine delle quali sono stati raccolti i dati per valutare se ci fossero stati dei cambiamenti, o meno, sia sul loro comportamento che sulla morfologia delle braccia in rigenerazione. È stato osservato un aumento del tempo di ribaltamento negli organismi posti a una concentrazione intermedia di 0,5 mg/L di nanoplastiche, mentre il glifosato non è sembrato influenzare tale risultato. Per quanto riguarda la rigenerazione dei bracci, hanno risentito dell'effetto combinato di glifosato e nanoparticelle alle concentrazioni intermedie: la risposta di *Ophiactis virens* a questi contaminanti sembra seguire, quindi, l'andamento del fenomeno di ormesi, già conosciuto e descritto in letteratura per altri tipi di contaminanti, molecole e specie studiate. L'effetto singolo dei due contaminanti è di difficile interpretazione, e richiede ulteriori studi su specie di animali, tipologie di nanoplastiche e coformulanti di glifosato diversi.

1. Introduzione

Ophiactis virens (M. Sars, 1859) è un echinoderma appartenente alla classe degli Ofiuridei, presente nell'Oceano Atlantico lungo la costa ovest dell'Africa e nel Mar Mediterraneo, al largo di Turchia ed Italia (Figura 1). È un'ofiura, o stella serpentina, piccola, con un diametro tra i 3 ai 5 mm, caratterizzata dalla presenza di sei braccia, di un colore grigio-marrone con delle bande più scure (Figura 2) (Hayfa Chammam *et al.*, 2019). Come la maggior parte delle ofiure che si nascondono in fessure per proteggersi da predazione (David Drolet *et al.*, 2004) o che scavano un nascondiglio sotto la sabbia (Anthony F. D'Andrea *et al.*, 1996), è possibile trovare anche *O. virens* occultata alla vista dei predatori, solitamente tra molluschi bivalvi come le cozze, da cui traggono sia rifugio che qualche frammento di cibo da filtrare.

In letteratura non ci sono molti studi su *O. virens*: è possibile trovarne facilmente su molte altre ofiure come *Amphipholis squamata* (Samuel Dupont *et al.*, 2000), con cui spesso condivide l'ambiente, e *Micropholis gracillima* (Robert Lombard Singletary, 1971; Anthony F. D'Andrea *et al.*, 1996). Di queste però, l'oggetto di studio sono spesso altre caratteristiche biologiche, come la bioluminescenza nel caso di *A. squamata* (Dimitri Deheyn *et al.*, 2000; Samuel Dupont *et al.*, 2000), e gli effetti di altre tipologie di inquinanti come i metalli pesanti (Anthony F. D'Andrea *et al.*, 1996; Dimitri Deheyn *et al.*, 2000). Raccogliere maggiori informazioni su *Ophiactis virens*, specie

caratteristica del Mar Ligure e Tirrenico, è sicuramente di straordinaria importanza perché attraverso di essa è possibile studiare la composizione delle acque e dei sedimenti nel nostro Paese. Come gli altri echinodermi, sono animali bentonici particolarmente suscettibili alla presenza di microinquinanti che si accumulano nei sedimenti (Anthony F. D'Andrea *et al.*, 1996; Alice Bargaglio *et al.*, 2006) e quindi una variazione nel loro comportamento o nella loro morfologia potrebbe rappresentare un indicatore della presenza di contaminanti nei nostri mari. Inoltre, *O. virens* è una specie molto rinomata per la sua riproduzione asessuata attraverso fissione del suo corpo in due parti uguali con tre bracci ciascuna (Wilkie, 1984) e come molte altre ofiure, perde i bracci quando si sente minacciata (Robert Lombard Singletary, 1971) per poi riuscire a ristorarle completamente. Le sue straordinarie capacità di rigenerazione si prestano molto bene allo svolgimento di studi eco-tossicologici come quello proposto in questa sede.

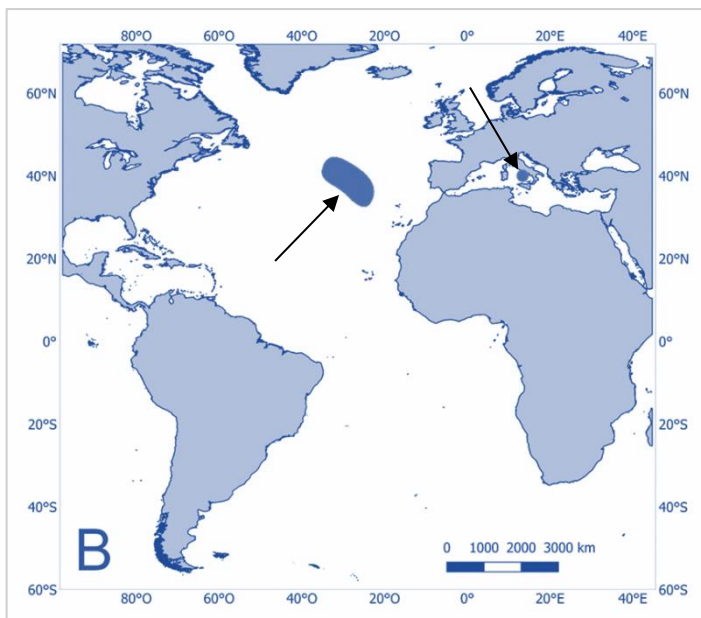


Figura 1: Distribuzione di *Ophiactis Virens* (Hayfa Chammem *et al.*, 2019)

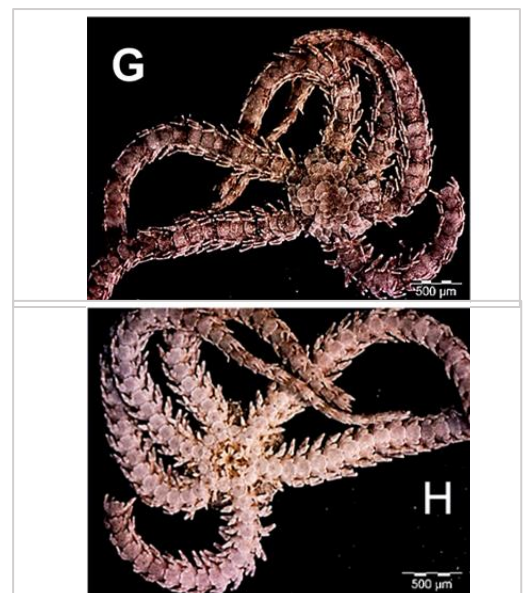


Figura 2: *Ophiactis virens*, vista dorsale (G) ed orale (H) (Hayfa Chammem *et al.*, 2019).

In natura, però, non è presente una sola tipologia di inquinanti alla volta, ma una combinazione di quest'ultimi che può influenzare le diverse comunità che colonizzano gli ambienti marini. Per questo si è valutato essenziale prendere in considerazione sia inquinanti chimici che fisici. Per lo studio di quest'ultimi sono state individuate le nanoplastiche, la cui presenza sta catturando l'attenzione delle più moderne ricerche a causa del loro effetto potenzialmente tossico sugli organismi, ma di cui sono presenti molti meno riferimenti in letteratura rispetto alle microplastiche (Grafico 1). La plastica può essere degradata in piccoli frammenti a causa di agenti atmosferici, radiazioni solari (Julien Gigault *et al.*, 2016) e biodegradazione: le particelle più piccole di 5 mm vengono definite microplastiche, mentre al di sotto dei 100 nm prendono il nome di nanoplastiche (Shosaku Kashiwada, 2006; Maocai Shen *et al.*, 2019). La quantità di nanoplastiche nell'ambiente non è ancora del tutto nota perché non

esistono metodi efficaci per determinarne la presenza e quantificarla (Inês Ferreira *et al.*, 2019), ma ne si conosce l'origine e la si colloca in base alla loro suddivisione in primarie e secondarie. Le nanoplastiche primarie derivano da prodotti come fibre sintetiche, cosmetici, medicine ed altri materiali che le contengono (Inês Ferreira *et al.*, 2019) mentre quelle secondarie dalla degradazione delle microplastiche immesse negli ambienti marini a causa della pesca, nel turismo costiero e nello smaltimento delle acque reflue (Inês Ferreira *et al.*, 2019; Maocai Shen *et al.*, 2019). La scelta è ricaduta su di esse anche perché, a causa delle loro piccole dimensioni, sono molto distribuite negli ambienti marini e sono facilmente ingeribili dagli organismi (Maocai Shen *et al.*, 2019), si accumulano e vengono trasmesse lungo la catena trofica (Muhammad Rozaimi Mohd Zaki & Ahmad Zaharin Aris, 2022). Lo studio dei loro effetti non è molto approfondito, e si concentra su organismi modello come lo zebrafish (*Danio rerio*) (Yifeng Lu *et al.*, 2016) e in generale pesci (*Oryzias latipes*) (Shosaku Kashiwada, 2006), molluschi e artropodi (C. Della Torre *et al.*, 2014). Ci sono ben poche informazioni sugli echinodermi, il cui studio si concentra più sugli Echinoidei (C. Della Torre *et al.*, 2014; E. Bergami *et al.*, 2019) che sugli ofiuroidei; prese in considerazione le dimensioni di particelle e la tipologia di alimentazione di questi animali (per filtrazione), però, è molto probabile che possano essere ingerite anche da essi.

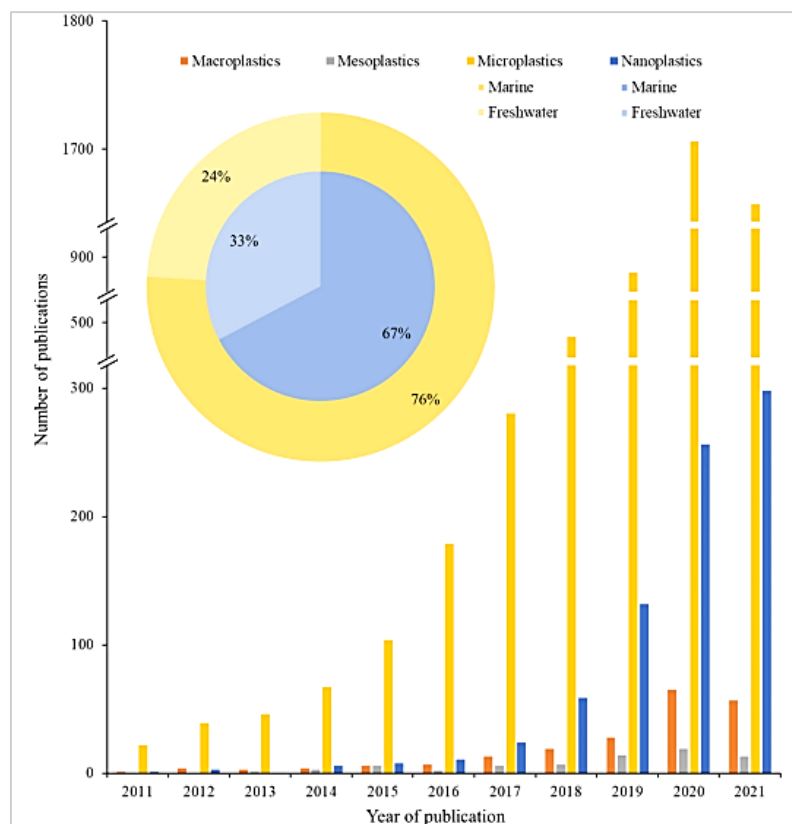


Grafico 1: numero annuale di pubblicazioni su micro- e nanoplastiche. (Muhammad Rozaimi Mohd Zaki & Ahmad Zaharin Aris, 2022)

Per quanto riguarda l'inquinamento chimico dell'ambiente, la scelta è ricaduta sul glifosato (N-(fosfonometil)glicina), un potente erbicida non selettivo entrato in commercio nel 1974 e sempre più usato da quando nel 1996 sono state sviluppate colture glifosate-resistenti (Stephen O. Duke & Stephen B. Powles, 2008), utilizzato per lo più come controllo per le piante infestanti e per diminuirne la copertura prima della semina dei campi (Federico Maggi *et al.*, 2020). Viene degradato velocemente dalle comunità batteriche del suolo e non rappresenta un pericolo per gli ambienti acquatici se non supera gli 8 kg ha⁻¹ (Antonio L. Cerdeira & Stephen O. Duke, 2006), in quanto di regola non viene bioaccumulato e subisce, inoltre, biodegradazione (Philip Mercurio *et al.*, 2014), solitamente nel suo metabolita più comune, l'acido amminometil-fosfonico o AMPA (Van Bruggen A. H. C. *et al.*, 2018). Si sa che riduce la tossicità di ioni pesanti come Ag, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, e Zn legandosi ad essi e riducendone la biodisponibilità (Antonio L. Cerdeira & Stephen O. Duke, 2006): questo può portare benefici alle comunità marine, ma non si conosce bene l'effetto diretto che ha sugli animali. Non sembra avere gravi effetti sulle piante acquatiche rispetto a molti altri erbicidi in commercio (Robert K. D. Peterson & Andrew G. Hulting, 2004), né sugli artropodi e uccelli, se non indirettamente a causa dell'azione che ha sulle piante, spesso fonte di nutrimento per i primi (Antonio L. Cerdeira & Stephen O. Duke, 2006) e rifugio per i secondi (Alan M. Dewar *et al.*, 2003). Sembra, però essere tossico per alcuni organismi acquatici, in particolare per i pesci d'acqua dolce: è stata provata che un'esposizione cronica al glifosato può disturbare il metabolismo di molte specie, come *Carassius auratus* (pesce rosso comune), *Anguilla anguilla* (anguilla europea), *Cyprinus carpio* (carpa d'acqua dolce) (Van Bruggen A. H. C. *et al.*, 2018). Nonostante sia uno degli erbicidi più utilizzati e conoscendo questi effetti sulle specie ittiche d'acqua dolce, generalmente non è considerato nei programmi di monitoraggio marini (Philip Mercurio *et al.*, 2014). Considerata la mancanza di informazioni sul suo effetto sulle comunità marine e dal momento che nel 2015 l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha riclassificato il glifosato come potenzialmente cancerogeno per gli umani (Van Bruggen A. H. C. *et al.*, 2018), si è ritenuto utile includerlo nello studio così da raccogliere maggiori dati.

2. Materiali, Metodi e Tecniche

Il campionamento è stato svolto nel porto di La Spezia, Liguria (44°04'04.1"N 9°50'10.4"E) il giorno 28 Aprile 2023, in 18 siti diversi (Figura 3). Sono stati prelevati quanti più individui di *Ophiactis virens* possibili, contando quanti fossero in fissione e quanti, invece, fossero interi: solo questi ultimi sono stati raccolti e portati il giorno stesso in laboratorio. Sul sito di campionamento sono stati ritrovati anche esemplari di *Amphipholis squamata* (Delle Chiaje, 1828), di cui ne è stato riportato il numero e poi liberati (in Grafico 1 sono riportati i dati sul censimento di tutti gli individui).

Gli individui di *O. virens* sono rimasti in laboratorio ad acclimatare fino al 2 Maggio 2023 a 17°C, in vasca ossigenata e provvisti di cozze per ridurre lo stress del nuovo ambiente. Sono stati selezionati 120 esemplari non in fissione di almeno 2 mm di diametro, sono stati sedati con MgCl₂ al 3,5% w/w e ne sono stati amputati con bisturi due bracci consecutivi a livello del quarto segmento a partire dal disco.

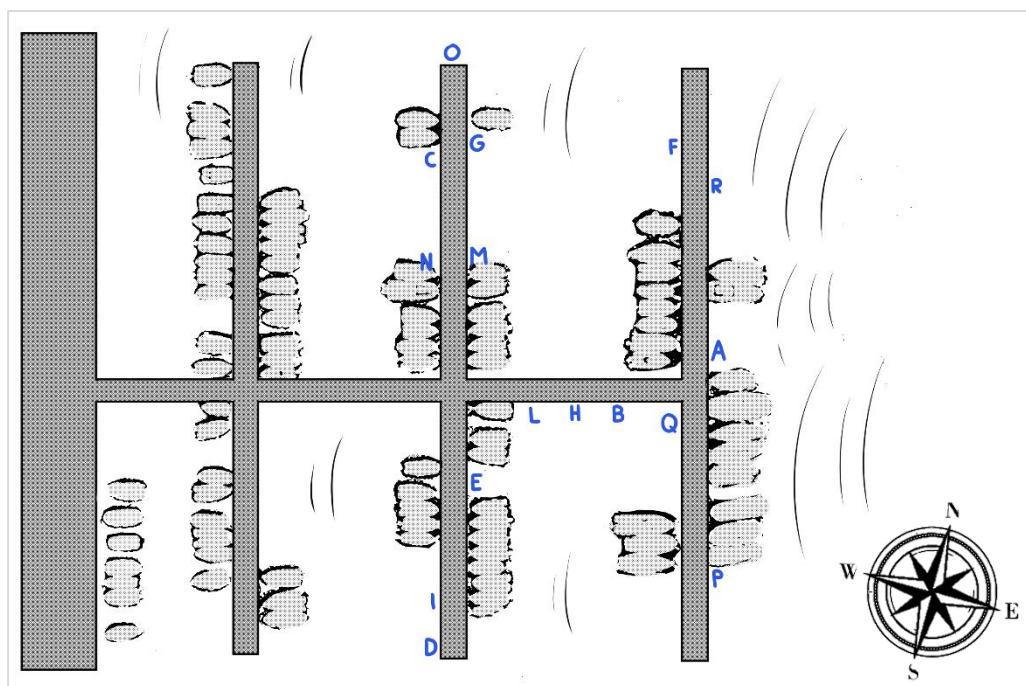


Figura 3: siti di campionamento (da A a R) lungo il pontile. Immagine personale.

Sono stati quindi allestiti 6 cristallizzatori da 450 mL, uno per ogni trattamento, a diverse concentrazioni di nanoplastiche e di glifosate, riportati in Tabella 1, diluiti in acqua di mare filtrata, e di ognuno sono state preparate due repliche, ognuna delle quali conteneva 10 esemplari di *O. virens* e qualche guscio di cozza per simulare il substrato di provenienza.

Tabella 1: trattamenti preparati.		
Sigla	Concentrazione nanoplastiche	Concentrazione glifosate
CTRL	0 mg/L	0 µg/L
CTRL_GLI	0 mg/L	100 µg/L
CTRL_NP	5 mg/L	0 µg/L
MIN	0,05 mg/L	1 µg/L
MEDIA	0,5 mg/L	10 µg/L
MAX	5 mg/L	100 µg/L

La soluzione di glifosate utilizzata è un erbicida in commercio di cui non si conoscono i coformulanti, mentre le nanoplastiche sono commerciali (produzione di Thermofisher), in polistirene, con densità 1,05 g/cm³ e fluorescenti nello spettro del rosso (a circa 589 nm), di forma sferica e di 50 nm di diametro. I cristallizzatori sono stati quindi riposti in frigo a 17°C, con ossigenatori, e le ofiure sono

state esposte ai rispettivi trattamenti fino al giorno 16 Maggio, quindi per due settimane. Per mantenere semi-statiche le condizioni, le soluzioni sono state cambiate ogni tre giorni e le ofiure nutrite nello stesso intervallo di tempo, con circa 3 mL di alga spirulina tritata disciolta in acqua di mare. Alla fine dell'esposizione sono stati contati gli individui morti (per valutare la mortalità e la valenza dell'esperimento) ed è iniziato lo studio dell'effetto dei contaminanti su quelli vivi.

2.1 Test comportamentale: il tempo di ribaltamento

Per valutarne l'effetto dei contaminanti sul comportamento, è stato testato il tempo di ribaltamento dei singoli individui: ognuno di essi è stato capovolto, esponendo la bocca verso l'alto. È stato quindi cronometrato il tempo, in secondi, impiegato per ritornare alla posizione di partenza: sono state eseguite due repliche del test sugli esemplari provenienti dai cristallizzatori in cui la mortalità è stata maggiore del 50% (CTRL_GLI e MEDIA).

2.2 Morfologia macroscopica

In seguito al test comportamentale gli esemplari sono stati nuovamente sedati con $MgCl_2$ al 3,5% w/w, osservati allo stereomicroscopio e i bracci in rigenerazione sono state fotografati tutti allo stesso ingrandimento. È stata poi misurata, mediante l'ausilio del programma ImageJ, la lunghezza della parte in rigenerazione e del diametro dei bracci, così da poter calcolare la "lunghezza normalizzata", ovvero il rapporto tra la lunghezza del rigenerato e il diametro del braccio d'origine. Sono stati, inoltre, contati i segmenti morfologicamente evidenti che si erano già formati nella parte in rigenerazione. Dopo ciò, ogni braccio, tranne quelli contenenti il rigenerato, è stato tagliato per preparare l'individuo ai passaggi successivi, ovvero l'allestimento di campioni per altri tipi di osservazione: preparati istologici (per l'anatomia interna), SEM (per l'anatomia esterna dei rigenerati) e osservazione al confocale per la presenza e localizzazione delle nanoplastiche, fluorescenti.

2.3 Allestimento di campioni istologici

Almeno 4 animali per concentrazione sono stati immersi in fissativo di Bouin (70% acido picrico, 25% formaldeide al 37%, 5% acido acetico), poi lavati con acqua di rete e posti in soluzione decalcificante di acido ascorbico al 2% e cloruro di sodio 0,3 M, per ammorbidire il più possibile lo scheletro degli animali. Dopo questo passaggio, i campioni sono stati disidratati con soluzioni di etanolo a concentrazione crescente (70-90-95-100%), in Xilolo e poi una soluzione 1:1 di Xilolo e paraffina. Dopo questo passaggio i campioni sono stati posti in stufa per permettere lo scioglimento totale della paraffina, e infine tutti gli esemplari sono stati inclusi in paraffina pura. Una volta solidificatasi è stato possibile produrre dei campioni dallo spessore di 8 μm ciascuno utilizzando un

microtomo: sono state preparate sezioni per lo più trasversali rispetto al disco centrale. Una volta trasferite sui vetrini sono quindi state colorate con colorazione Tricomica di Milligan, che evidenzia le strutture ricche in collagene di verde-azzurro, mentre il resto viene colorato di rosa.

2.4 Allestimento di campioni per Microscopio elettronico a scansione (SEM)

Almeno 2 esemplari sono stati immersi in fissativo apposito, ovvero glutaraldeide al 2% in acqua di mare e dopo lavati in acqua di mare e lasciati in frigorifero a 4°C per almeno un giorno. I campioni sono poi stati immersi in una soluzione di osmio 2% in acqua di mare e glucosio, in quanto l'osmio, un sale di metallo pesante, fissa molto bene i lipidi e crea dei contrasti chiaro/scuro molto utili per l'osservazione al SEM. In seguito a dei lavaggi in acqua distillata e filtrata, i campioni sono stati disidratati con alcool a concentrazione crescente (25-40-50-60-70-80-90-95-100%) e poi sottoposti a CPD (Critical Point Dry), una tecnica che essicca i campioni senza danneggiarne i tessuti e le strutture. Dopodiché i campioni sono stati montati su stub e coperti da uno strato d'oro di qualche nanometro, per renderne la superficie conduttiva elettricamente e permetterne l'osservazione al SEM.

2.5 Allestimento di campioni per microscopia confocale

Sei esemplari per ogni trattamento sono stati immersi in fissativo, una soluzione di PFA al 4% in PBS, dopodiché sono stati effettuati dei lavaggi in PBS e i campioni sono stati riposti in frigo a 4°C per una notte. Sono stati quindi trasferiti in una soluzione di Triton al 0,2% in PBS per 5 ore, così che Triton, un tensioattivo, potesse detergerne le membrane cellulari. In seguito a tre lavaggi in PBS, gli esemplari sono quindi stati immersi in una soluzione di Hoechst in PBS (1:4000) e lasciati, nuovamente, in frigo a 4°C per tutta la notte. Hoechst è un colorante fluorescente in blu che evidenzia i nuclei cellulari poiché mostra affinità per il DNA e in particolare per le sequenze ricche di adenina e timina (secondariamente, evidenzia anche i mitocondri): permette così di ottenere un punto di riferimento nella visualizzazione del campione al confocale. Gli esemplari sono quindi stati nuovamente lavati con PBS filtrato e montati su vetrino, utilizzando dei salva-buchi per creare uno spessore in cui immergere gli esemplari in montante e dello smalto per bloccare il vetrino copri-oggetto su queste strutture.

3. Risultati e Discussione

Il censimento degli esemplari (Grafico 2) mostra una buona presenza della specie *O. virens* sul sito di campionamento: nonostante il buon numero di *A. squamata* ritrovati, essi rappresentano circa il 27% degli esemplari raccolti. Si può notare un buon rapporto tra gli esemplari di *O. virens* in scissione e interi (quasi 1:1) che dimostra che sul sito di campionamento non c'è uno stress ambientale troppo elevato: se ci fosse, porterebbe l'animale a non usare le proprie energie per la riproduzione (Anthony F. D'Andrea *et al.*, 1996). La mortalità totale è stata di esattamente 20% (Grafico 3), un valore considerabile accettabile per la validità di test eco-tossicologici (Alice Bargaglio *et al.*, 2006). È importante, però, notare che l'alta mortalità in CTRL_GLI (55%) e in MEDIA (60%) sono attribuibili più ad errori accidentali che alle condizioni del trattamento, poiché di entrambi è stato persa una replica intera, oltre che a pochi esemplari della seconda: probabilmente la causa è stata un malfunzionamento degli ossigenatori utilizzati durante il periodo di esposizione che hanno mostrato spesso qualche problema.

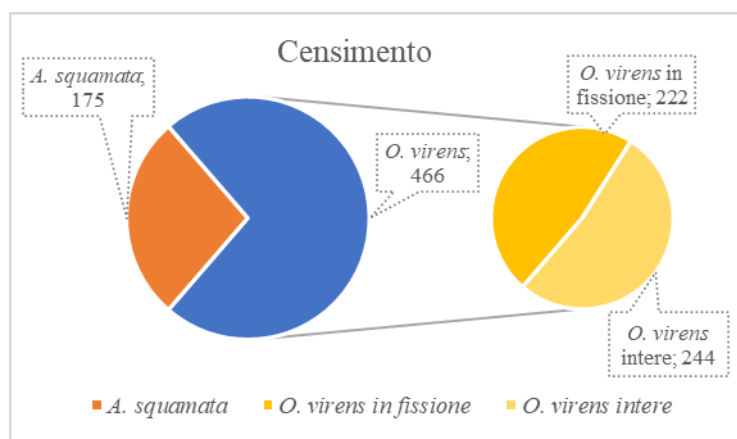


Grafico 2: censimento degli animali.

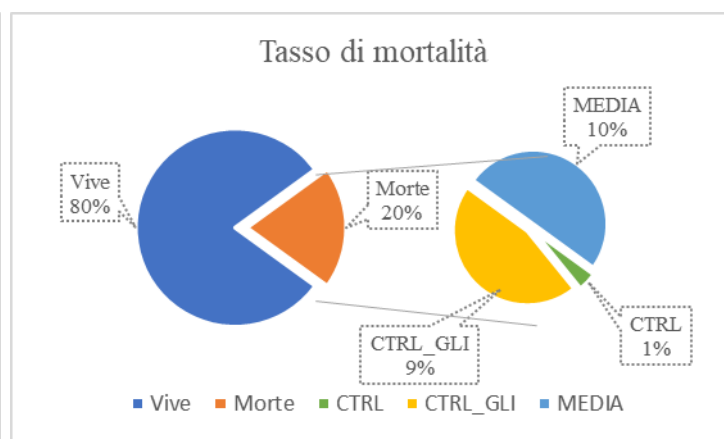


Grafico 3: mortalità del test eco-tossicologico.

Attraverso la microscopia confocale si può notare la presenza di nanoplastiche sui campioni (Figura 4), fluorescenti in rosso: anche nei campioni di CTRL e CTRL_GLI si possono vedere delle particelle rosse, ma la quantità, rispetto agli altri campioni, è molto inferiore e si può concludere siano semplicemente delle contaminazioni. Non sono osservate evidenti differenze nella crescita rigenerativa e nel comportamento degli esemplari riconducibili all'effetto di nanoplastiche, se non nell'aumento del tempo di ribaltamento nel trattamento MEDIA, cambiamento assente nei trattamenti MIN e MAX (Grafico 4). Questo effetto così specifico per una determinata concentrazione richiede uno studio delle informazioni attualmente disponibili sulle nanoplastiche, poiché è simile a quello delle ofiure in CTRL_NP. Si sa che le nanoplastiche presentano additivi aggiunti per stabilizzarle, ma che possono aumentarne il tempo di degradazione permettendo la loro permanenza nell'ambiente ed aumentando le probabilità che vengano a contatto con diversi animali (Inês Ferreira *et al.*, 2019;

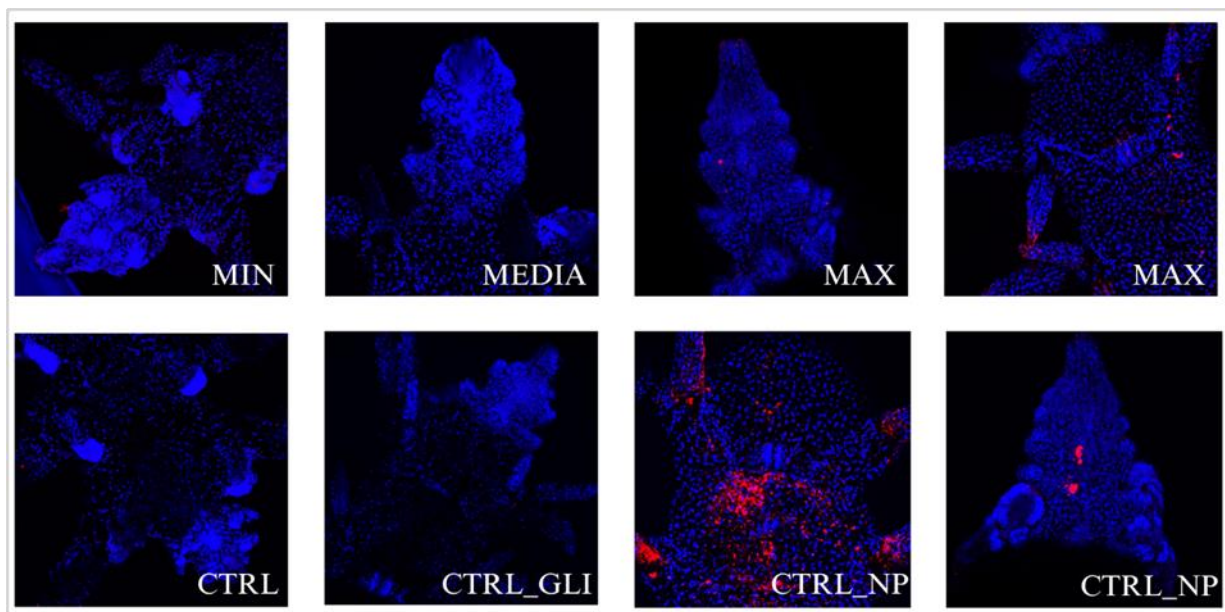
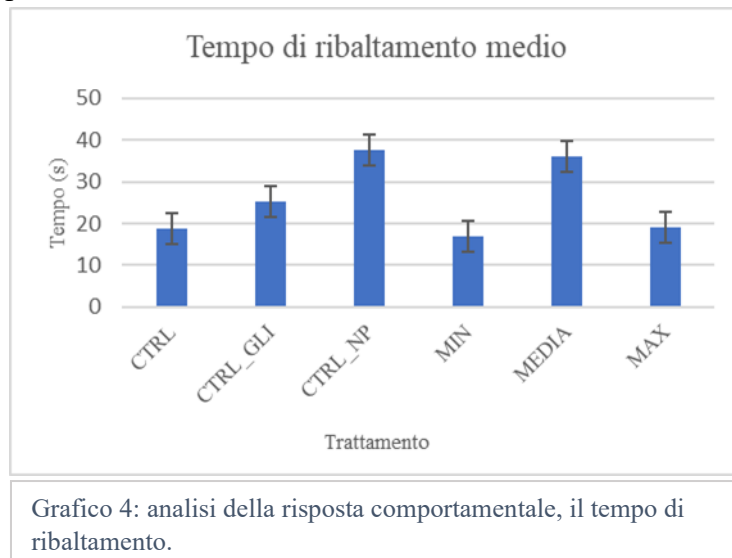


Figura 4: Immagini al confocale delle braccia in rigenerazione di *Ophiactis virens* nei differenti trattamenti.

Muhammad Rozaimi Mohd Zaki & Ahmad Zaharin Aris, 2022). Il rilascio di questi additivi e contaminanti adsorbiti sulle nanoplastiche (come metalli pesanti, idrocarburi aromatici policiclici ed altri) nel corpo degli organismi può essere una minaccia più significativa rispetto alle nanoplastiche stesse (Maocai Shen *et al.*, 2019). In recenti studi (Muhammad Rozaimi Mohd Zaki & Ahmad Zaharin Aris, 2022) è stata osservata negli echinodermi, infatti, una risposta solo in seguito ad esposizione a molecole di polistirene con cariche superficiali, PS-COOH e soprattutto PS-NH₂: la risposta è stata molto diversa in base alla tipologia di carica, il che suggerisce la necessità di un approfondimento utilizzando tipologie di nanoplastiche differenti. Questa potrebbe essere una delle cause dell'assenza di cambiamenti nelle concentrazioni MIN e MAX, ma deve essere successo qualcosa per cui c'è stata risposta in MEDIA. La diminuzione di dimensioni (Evgenios Agathokleous *et al.*, 2021) e il conseguente aumento della superficie delle nanoplastiche rispetto alle microplastiche, aumenta l'adsorbimento di contaminanti ambientali e rende le particelle più reattive (Inês Ferreira *et al.*, 2019). Le nanoplastiche però tendono ad aggregarsi in acqua salata (Shosaku Kashiwada, 2006) un fenomeno che è stato notato anche durante l'esperimento: nei giorni in cui le soluzioni venivano cambiate, si potevano notare degli agglomerati biancastri in sospensione. Potrebbe essere questo il motivo per cui il maggiore effetto sui tempi di ribaltamento si ha nella concentrazione intermedia (Grafico 4): la quantità di nanoplastiche potrebbe essere abbastanza alta da causare un effetto (a differenza della concentrazione minima), ma abbastanza bassa da non aggregarsi e permettere alle particelle di essere più assimilabili e reattive (diversamente dalla concentrazione massima). È vero che esiste un aumento nel tempo di ribaltamento anche in CTRL_NP in cui la concentrazione di nanoplastiche è alta tanto quanto quella nel trattamento MAX e non quanto quelle del trattamento MEDIA, ma probabilmente nel primo caso le particelle di nanoplastiche avranno anche adsorbito più

molecole di glifosato, che ne avrà influenzato l'azione sul comportamento degli animali o ne avrà favorito l'aggregazione. È più probabile la seconda ipotesi in quanto il glifosato è anionico a pH fisiologici (Stephen O. Duke & Stephen B. Powles, 2008) mentre le nanoplastiche diventano più pericolose quando associate a cariche positive (Muhammad Rozaimi Mohd Zaki & Ahmad Zaharin Aris, 2022), quindi può averne solo influenzato le caratteristiche fisiche.



Al SEM è, inoltre, possibile notare degli aggregati (Figura 5) sulla superficie dei pedicelli dei bracci delle ofiure del trattamento MAX: questo può suggerire che le nanoplastiche, alla concentrazione più elevata, sono rimaste sul corpo dell'animale e più difficilmente sono state assorbite al suo interno. Questo è altrettanto confermato dal fatto che gli stessi aggregati non sono visibili nelle concentrazioni MIN, MEDIA, CTRL e CTRL_GLI (Figura 6), mentre nel trattamento CTRL_NP (Figura 7) si possono intravedere degli aggregati sulle spine. Non si può essere sicuri, però, della natura di quest'ultimi perché non è stata prodotta un'immagine ad un ingrandimento abbastanza elevato da valutare il diametro delle particelle. Attraverso microscopia a 2 fotoni (Figura 8) si è prodotta un'immagine della cavità preorale degli esemplari di *O. virens*: nonostante non si possano ottenere dati quantitativi da queste riproduzioni, si può osservare che le nanoplastiche sono, ovviamente, assenti in CTRL e particolarmente visibili in MAX. È interessante però sottolineare che le particelle di nanoplastiche sono più evidenti nel trattamento MIN rispetto a MEDIA e questo conferma la teoria esposta precedentemente, ovvero che la concentrazione MIN era troppo bassa per provocare degli effetti, in quella MEDIA le nanoplastiche sono state assimilate meglio dall'animale mentre in quella MAX sono rimaste sulla superficie. Non si esclude, comunque, che nonostante un maggiore o minore assorbimento delle nanoplastiche, queste possano diminuire in ogni caso le capacità filtranti dell'animale, fenomeno già osservato in molluschi bivalvi come *M. edulis* (Yooeun Chae & Youn-Joo An, 2017), e di conseguenza il tasso di alimentazione, che è stato dimostrato

diminuire significativamente in studi su *Daphnia magna* (Sinja Rist *et al.*, 2017) in seguito a contaminazione da nanoplastiche.

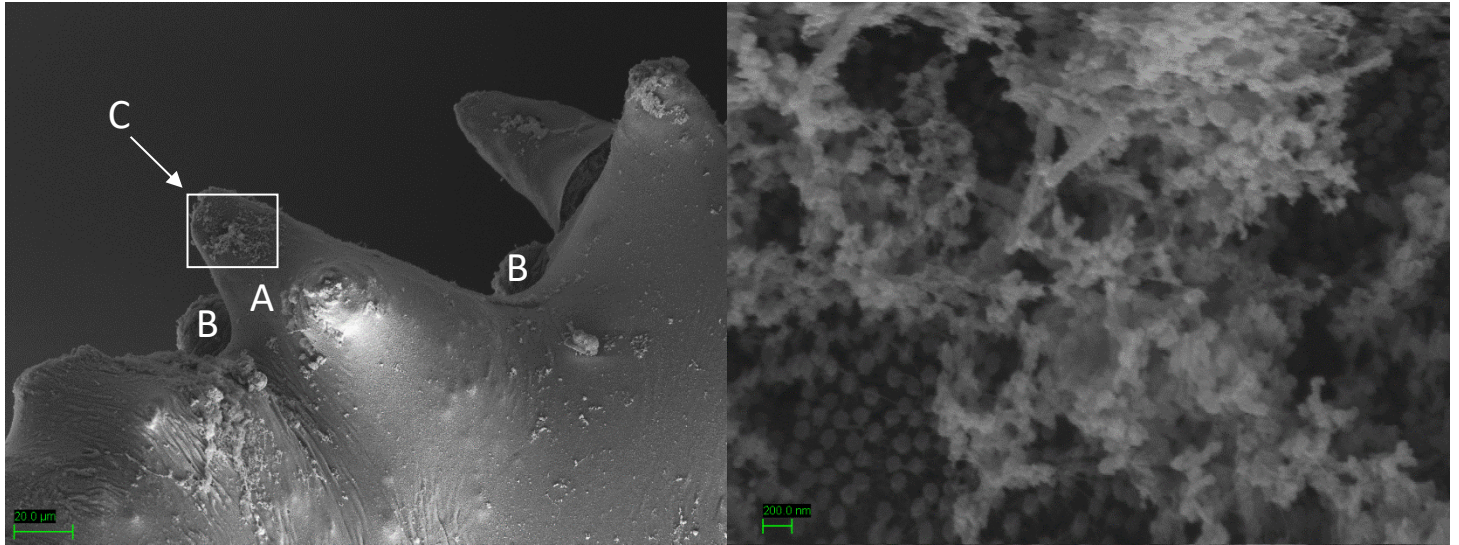


Figura 5: immagini al SEM delle ofiure in concentrazione MAX. A sinistra ingrandimento sulle spine (A) e sui pedicelli (B), su cui è possibile notare un aggregato di particelle (C). A destra ulteriore ingrandimento dell'aggregato: le sfere che si intravedono hanno un diametro comparabile a quello di 50 nm delle nanoplastiche commerciali utilizzate nell'esperimento.

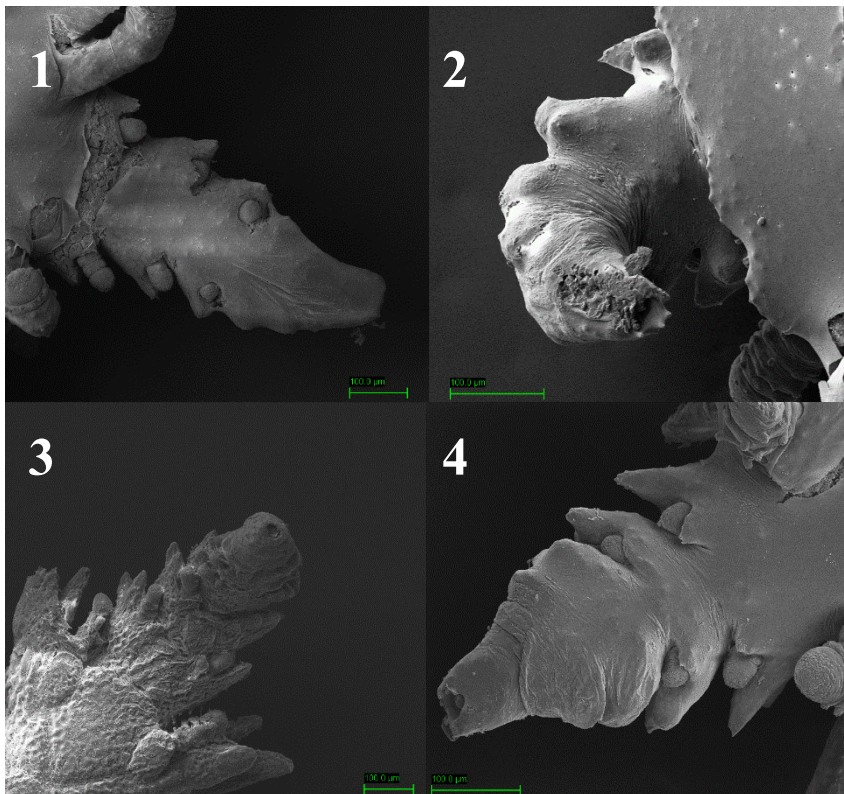


Figura 6: Immagini al SEM dei trattamenti MIN (1), MEDIA (2), CTRL (3), CTRL_GLI (4).

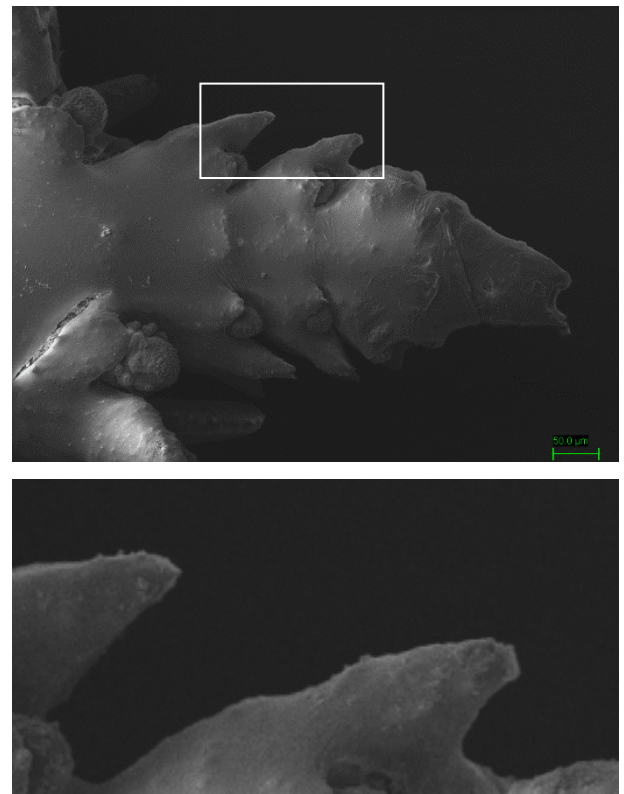


Figura 7: Immagine al SEM del trattamento CTRL_NP.

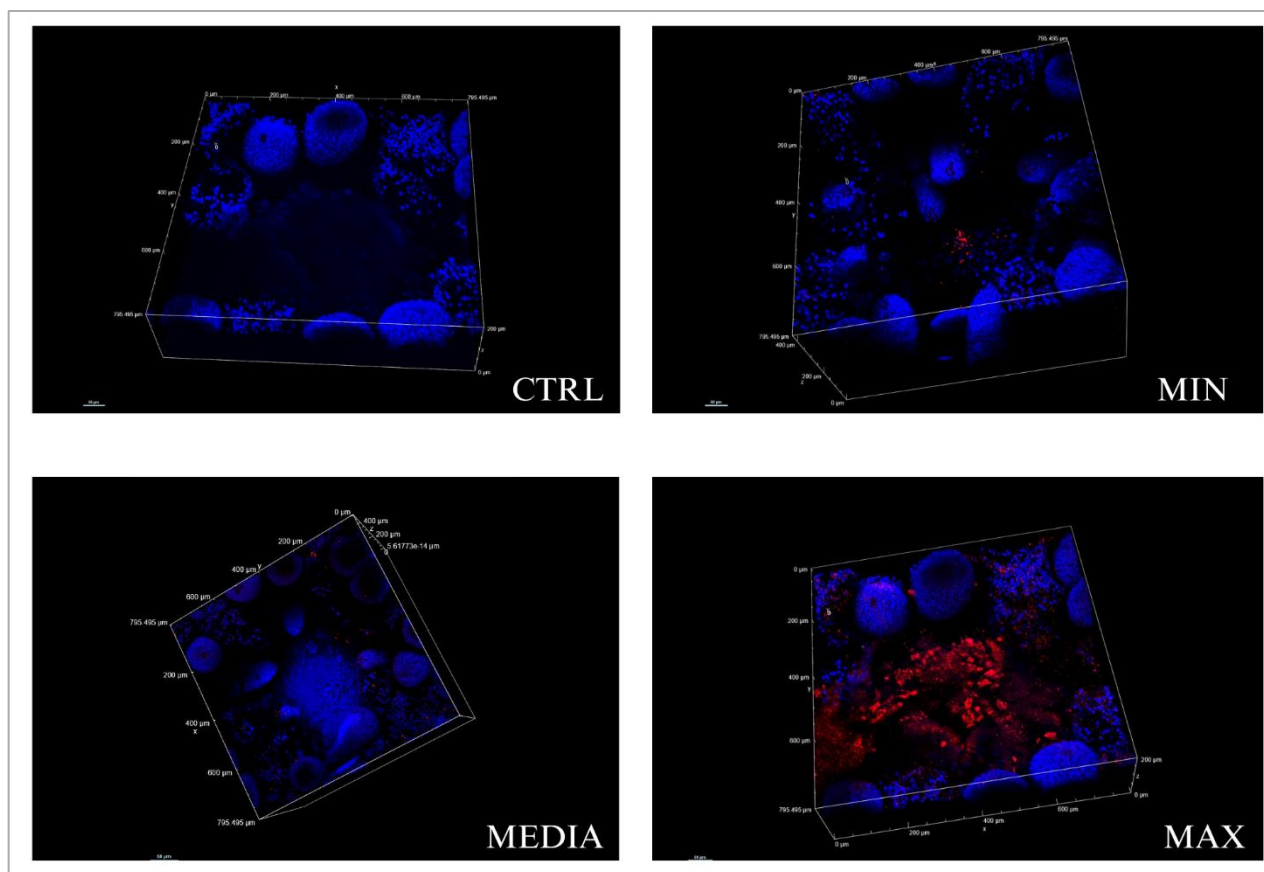


Figura 8: Microscopia a 2 fotoni, ingrandimento sulla cavità pre-orale.

Il glifosato ha effetti tossici a concentrazioni di almeno 3,5 mg/L in invertebrati come gamberi e moscerini e soprattutto su anfibi come rane e la loro forma larvale di girini, anche se la tossicità di solito è attribuita ai surfattanti associati e non al glifosato in sé (Rick A. Relyea, 2005): le soluzioni che contengono POEA sono più tossiche rispetto alle altre (Van Bruggen A. H. C. *et al.*, 2018). Non conoscendo la natura dei coformulanti del glifosato commerciale utilizzato in questo esperimento, è difficile stabilirne la tossicità e l'azione sugli animali, in quanto potrebbe essere bassa a causa della semplice mancanza dell'elemento che, in natura, lo renderebbe pericoloso. Inoltre, il glifosato degrada più velocemente tanto più la temperatura è bassa e la luce scarsa (Philip Mercurio *et al.*, 2014), e le condizioni di esposizione, ovvero in frigo chiuso a 17 °C, potrebbero averne favorito la degradazione e quindi un minore effetto sugli esemplari.

Per quanto riguarda la rigenerazione dei bracci, sembra probabile che i due inquinanti abbiano un effetto maggiore se presenti singolarmente nell'ambiente o se l'effetto si combina a concentrazioni intermedie, come si evince dal Grafico 5. Si nota, infatti, una simile diminuzione della lunghezza dei rigenerati nel CTRL_GLI e CTRL_NP, diminuzione persa poi nel trattamento MIN e MAX, e invece accentuata in MEDIA. Una risposta più accentuata a condizioni intermedie è chiamata, in biologia, ormesi (Figura 9), ovvero una risposta bifasica con effetti opposti in una concentrazione bassa (al di

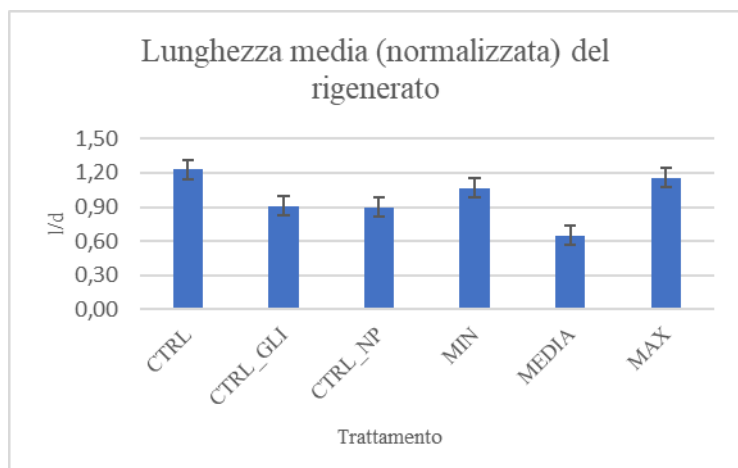


Grafico 5: Lunghezza media normalizzata dei rigenerati, in base al trattamento.

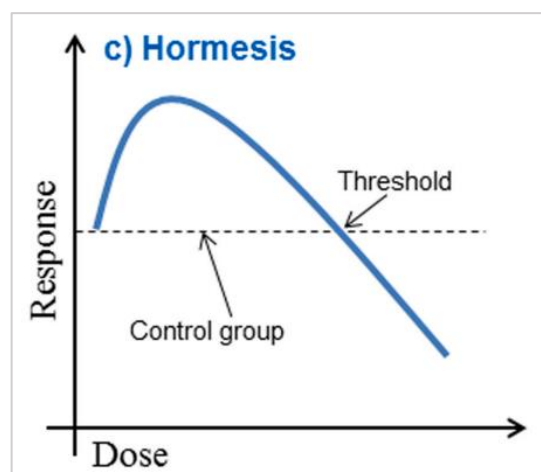


Figura 9: Andamento dose-risposta nel caso di ormesi. (Evgenios Agathokleous *et al.*, 2021)

sotto della soglia tossicologica) e una alta (al di sopra) (Evgenios Agathokleous *et al.*, 2021). Questo tipo di risposta è tipico delle microplastiche in diversi taxa, e soprattutto specifico del polistirene (Evgenios Agathokleous *et al.*, 2021) di cui sono composte le nanoparticelle utilizzate: perciò è probabile che le nanoplastiche mostrino un comportamento simile alle microplastiche. Si può, inoltre, ipotizzare che tra nanoplastiche e glifosato esista un'interazione sinergica e che quindi la risposta vari in base alla combinazione delle concentrazioni dei due contaminanti, un effetto già visto tra le microplastiche e DBP, un loro additivo (Evgenios Agathokleous *et al.*, 2021). Se invece si prende in considerazione l'indice di differenziamento, ovvero il rapporto tra la lunghezza media e il numero dei rigenerati, non si notano differenze evidenti (Grafico 6) se non una diminuzione in CTRL_GLI. Questo potrebbe essere causato o da una diminuzione della lunghezza dei rigenerati o da un maggior numero di segmenti formatisi: considerato il Grafico 5 in cui la lunghezza in CTRL_GLI era simile a CTRL_NP, si può concludere che si tratti proprio di un aumento di segmenti. Questo accade perché probabilmente il glifosato rappresenta uno stress maggiore per la rigenerazione dei bracci, rispetto alle nanoplastiche, e quando le ofiure si trovano in queste condizioni, prediligono il raggiungimento

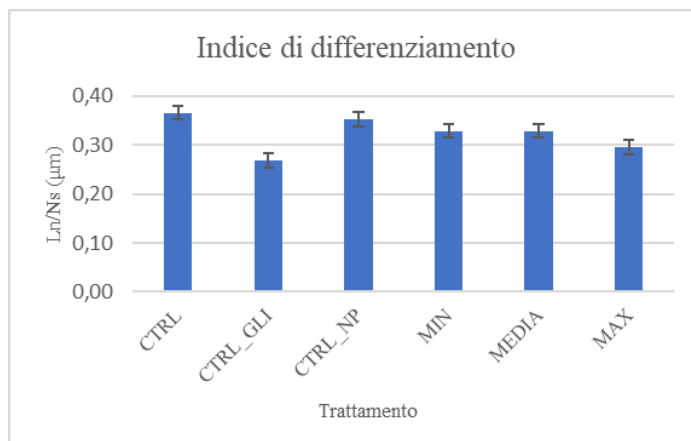


Grafico 6: Indice di differenziamento, ovvero il rapporto tra la lunghezza media e il numero dei segmenti dei rigenerati.

di bracci della stessa lunghezza invece che della stessa qualità di quelli originali (Anthony F. D'Andrea *et al.*, 1996): si formano quindi più segmenti, ma più piccoli, per raggiungere comunque la stessa lunghezza.

Non si notano, invece, evidenti differenze morfologiche in seguito ad analisi istologica (Figura 10). Lo spessore della parete dello stomaco è simile in tutti i trattamenti, e non sembrano esserci perdite di alcuna tipologia di tessuto: cartilagine, muscoli e nervi sono ben visibili in tutti i campioni, sia nelle parti del corpo “di partenza” (come disco e i primi 4 o 5 segmenti dei bracci) che nelle porzioni in rigenerazione.

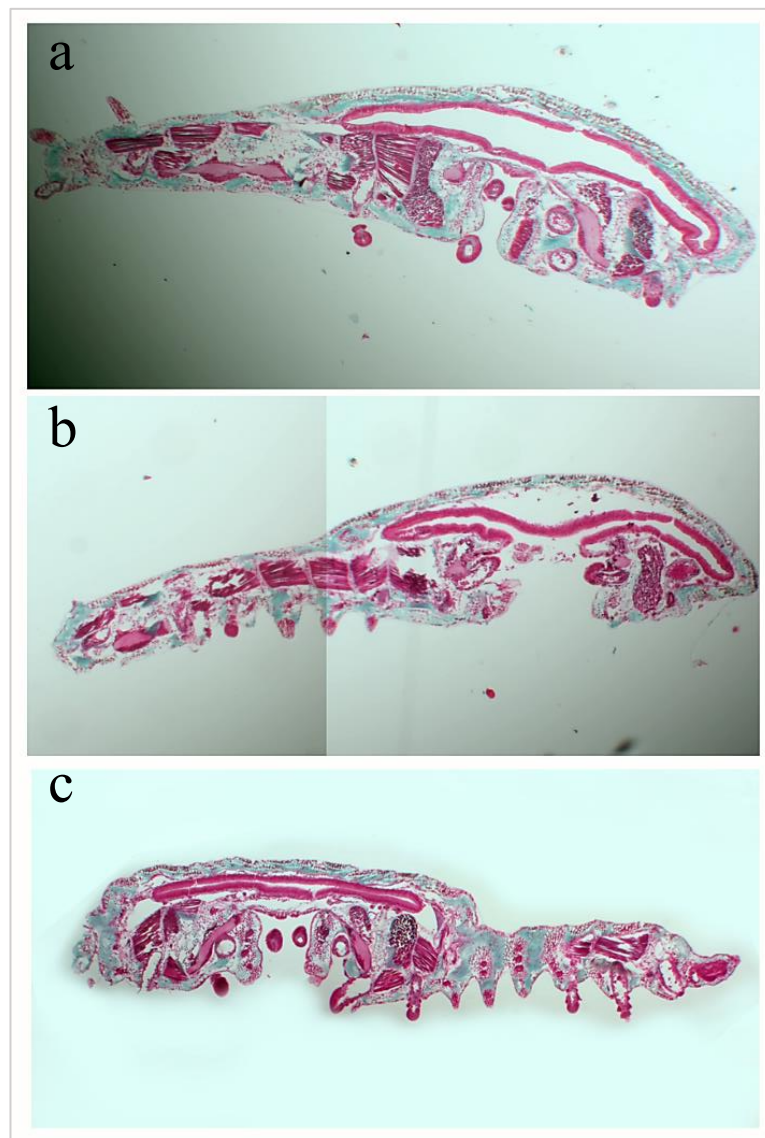


Figura 10: sezioni trasversali dei trattamenti MIN (a), MEDIA (b), MAX c). Colorazione tricromica di Milligan.

4. Conclusione

Comparando i risultati ottenuti in questo studio con quelli di altri esperimenti riportati in letteratura, si può concludere che l'effetto del glifosato è molto variabile nei diversi taxa: concentrazioni che nel caso di *Ophiactis virens* non hanno causato modificazioni evidenti (5 mg/L), in altre specie hanno invece causato la morte degli esemplari oggetto di studio, come nel caso di girini che iniziano a risentirne già a 3,5 mg/L (Rick A. Relyea, 2005). Per condurre un test eco-tossicologico su un intero ambiente è, perciò, fondamentale prendere in considerazione diverse specie. Seppur il glifosato non si sia dimostrato un serio pericolo durante questo studio, è bene ricordare che l'emivita dei pesticidi ed erbicidi, varia in base alle condizioni di laboratorio che generalmente differiscono da quelle dell'ambiente e perciò non si può sapere con certezza se in mare l'effetto del glifosato potrebbe essere più accentuato né se ci potrebbero essere conseguenze ad un'esposizione più a lungo termine a glifosato o al suo metabolita AMPA, più persistente (Federico Maggi *et al.*, 2020). Nonostante la tossicità acuta del glifosato nei pesci e mammiferi sia bassa, e in questo studio lo sembra anche per gli echinodermi, non è ancora chiaro se: (i) la stessa cosa valga per altri taxa marini e (ii) la tossicità dei suoi formulati, più alta, potrebbe avere effetti cronici sia sugli animali che, inoltre, sulla salute degli umani stessi (Van Bruggen A. H. C. *et al.*, 2018). Da questo studio non possiamo concludere la validità di queste due ipotesi, né confutarle. Per quanto riguarda le nanoplastiche, invece, sono contaminanti che stanno scaturendo sempre più preoccupazione in quanto è accertato che sono potenzialmente tossiche sia per gli organismi acquatici che per gli umani (Muhammad Rozaimi Mohd Zaki & Ahmad Zaharin Aris, 2022). Da questo studio si evince che l'azione combinata di nanoplastiche con altre tipologie di inquinanti potrebbe causare risposte diverse e anche imprevedibili se non supportate da ulteriori studi. La loro distribuzione e quantificazione non è ancora stata adeguatamente investigata; quindi, fino a quando non si saprà di più sugli effetti ambientali dei nanomateriali e delle loro interazioni con altri contaminanti, il rilascio di entrambi nell'ambiente deve essere evitato il più possibile.

Bibliografia

Alan M. Dewar¹, Mike J. May, Ian P. Woiwod, Lisa A. Haylock, Gillian T. Champion, Beulah H. Garner, Richard J. N. Sands, Aiming Qi and John D. Pidgeon (2003). *A novel approach to the use of genetically modified herbicide tolerant crops for environmental benefit*. Proc. R. Soc. Lond. B 270: 335–340.

Alice Barbaglio, Daniela Mozzi, Michela Sugni, Paolo Tremolada, Francesco Bonasoro, Ramon Lavado, Cinta Porte, M. Daniela Candia Carnevali (2006). *Effects of exposure to ED contaminants (TPT-Cl and Fenarimol) on crinoid echinoderms: comparative analysis of regenerative development and correlated steroid levels*. Marine Biology 149: 65–77.

Anthony F. D’Andrea, S. E. Stancyk, G. T. Chandler (1996). *Sublethal effects of cadmium on arm regeneration in the burrowing brittlestar, Microphiopholis gracillima*. Ecotoxycology 5: 115-133.

Antonio L. Cerdeira, Stephen O. Duke (2006). *The Current Status and Environmental Impacts of Glyphosate-Resistant Crops: A Review*. J. Environ. Qual. 35: 1633–1658.

D. Della Torre, E. Bergami, A. Salvati, C. Faleri, P. Cirino, K. A. Dawson, I. Corsi (2014). *Accumulation and Embryotoxicity of Polystyrene Nanoparticles at Early Stage of Development of Sea Urchin Embryos Paracentrotus lividus*. Environ. Sci. Technol. 48, 30: 12302-12311.

David Drolet, John H. Himmelman, Rémy Rochette (2004). *Use of refuges by the ophiuroid Ophiopholis aculeata: contrasting effects of substratum complexity on predation risk from two predators*. Marine ecology progress series, Vol. 284: 173–183.

Dimitri Deheyn, Michel Jangoux, Michel Warnau (2000). *Alteration of bioluminescence in Amphipholis squamata (Ophiuroidea: Echinodermata) by heavy metals contamination: a field study*. The Science of the Total Environment 247: 41-49.

E. Bergami, A. Krupinski Emerenciano, M. González-Aravena, C. A. Cárdenas, P. Hernández, J. R. M. C. Silva, I. Corsi (2019). *Polystyrene nanoparticles affect the innate immune system of the Antarctic sea urchin Stereochinus neumayeri*. Polar Biology 42: 743-757.

Evgenios Agathokleous, Ivo Iavicoli, Damia Barcelo, Edward J. Calabrese (2021). *Micro/nanoplastics effects on organisms: A review focusing on ‘dose’*. Journal of Hazardous Materials 417: 126084.

Federico Maggi, Daniele la Cecilia, Fiona H.M. Tang, Alexander McBratney (2020). *The global environmental hazard of glyphosate use*. Science of the Total Environment 717: 137167.

Hayfa Chammem, Jamila Ben Souissi, Angel Pérez-Ruzafa (2019). *Checklist with first records for the Echinoderms of northern Tunisia (central Mediterranean Sea)*. Sci. Mar. 83(3): 277-288

Inês Ferreira, Cátia Venâncio, Isabel Lopes, Miguel Oliveira (2019). *Nanoplastics and marine organisms: What has been studied?* Environmental Toxicology and Pharmacology 67: 1-7.

Julien Gigault, Boris Pedrono, Benoit Maxit, Alexandra Ter Halle (2016). *Marine plastic litter: the unanalyzed nanofraction*. Environ. Sci.: Nano 3, 346.

M. Sars (1859). *Bidrag til Kundskaben om Middelhavets Littoral-Fauna, Reisebemærkninger fra Italien*. (2den Afhandling). Nyt Magazin for Naturvidenskaberne. 10(1): 57-155, disponibile online <http://www.archive.org/stream/nytmagazinforNat10phys#page/n1/mode/2up>

Maocai Shen, Yaxin Zhang, Yuan Zhu, Biao Song, Guangming Zeng, Duofei Hu, Xiaofeng Wen, Xiaoya Ren (2019). *Recent advances in toxicological research of nanoplastics in the environment: A review*. Environmental Pollution 252: 511-521.

Muhammad Rozaimi Mohd Zaki, Ahmad Zaharin Aris (2022). *An overview of the effects of nanoplastics on marine organisms*. Science of the Total Environment 831: 154757.

Philip Mercurio, Florita Flores, Jochen F. Mueller, Steve Carter, Andrew P. Negri (2014). *Glyphosate persistence in seawater*. Marine Pollution Bulletin 85: 385-390.

Rick A. Relyea (2005). *The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities*. Ecological Applications, 15(2): 618–627.

Robert K. D. Peterson, Andrew G. Hulting (2004). *A comparative ecological risk assessment for herbicides used on spring wheat: the effect of glyphosate when used within a glyphosate-tolerant wheat system*. Weed Science, 52: 834-844.

Robert Lombard Singletary (1971). *The biology and ecology of Amphiplus coniertodes, Ophioneptys limicola, and Micropholis gracillima (ophiuroida: amphiuridae)*. University of Miami ProQuest Dissertations Publishing, Coral Gables, Florida.

Samuel Dupont, Stephen Chaufer, Élie Poulin, Jean-Pierre Féral, Jérôme Mallefet (2000). *Is there a link between morphological Physiological and genetic variability of the ophiuroid Amphipoholis squamata?* Netherlands Journal of Zoology, 50(3): 355-363.

Shosaku Kashiwada (2006). *Distribution of Nanoparticles in the See-through Medaka (Oryzias latipes)*. Environ Health Perspect 114:1697–1702

Sinja Rist, Anders Baun, Nanna B. Hartmann (2017). *Ingestion of micro- and nanoplastics in Daphnia magna - Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction*. Environmental Pollution 228: 398-407.

Stefano Delle Chiaje (1822). *Memorie sulla storia e notomia degli animali senza vertebre del regno di Napoli* (vol. 1-4). Napoli. Fratelli Fernandes (vol. 1) e Società Tipografica (vol. 2-4), disponibile online <https://doi.org/10.5962/bhl.title.10021>

Stephen O Duke, Stephen B Powles (2008). *Mini-review. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide*. Pest Manag. Sci. 64: 319 – 325.

Van Bruggen A. H. C., He M. M., Shin K., Mai V., Jeong K. C., Finckh M. R., Morris J. G. Jr. (2018). *Environmental and health effects of the herbicide glyphosate*. Science of the Total Environment 616-617: 255-268.

Wilkie I.C. (1984) *Variable tensility in echinoderm collagenous tissues: a review*. Mar. Freshw. Behav. Physiol 11: 1-34.

Yifeng Lu, Yan Zhang, Yongfeng Deng, Wei Jiang, Yanping Zhao, Jinju Geng, Lili Ding, Hongqiang Ren (2016). *Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (Danio rerio) and Toxic Effects in Liver*. Environ. Sci. Technol. 50, 12523-12524.

Yooeun Chae, Youn-Joo An (2017). *Effects of micro- and nanoplastics on aquatic ecosystems: Current research trends and perspectives*. Marine Pollution Bulletin 124: 624-632.

A. Testi, G. Fanelli, R. Crosti, V. Castigliani, D. D'Angeli (2012). *Characterizing river habitat quality using plant and animal bioindicators: A case study of Tirino River (Abruzzo Region, Central Italy)*. Ecological Indicators 20: 24-33.

Alberto Sorace, Paolo Formichetti, Aldo Boano, Paolo Andreani, Cristiano Gramegna, Laura Mancini (2002). *The presence of a river bird, the dipper, in relation to water quality and biotic indices in central Italy*. Environmental Pollution 118: 89-96.

Anna Rita Rossi, Lorenzo Talarico, Gerardo Petrosino, Simone Crescenzo, Lorenzo Tancioni (2022). *Conservation Genetics of Mediterranean Brown Trout in Central Italy (Latium): A Multi-Marker Approach*. Water 2022, 14, 937.

B. Belletti, L. Nardi, M. Rinaldi (2015). *Diagnosing problems induced by past gravel mining and other disturbances in Southern European rivers: the Magra River, Italy*. Aquat Sci 78: 107-119.

Bruno Pennelli, Karl-Otto Nagel, Giuseppe Crivellaro, Claudio Fabiani, Alexandra Vancova, Laura Mancini. *Testing the Extended Biotic Index in Slovakia: Consistency, Advantages, and Limitations versus the Saprobic Assessment Method of Water Quality*. Water Environment Research, volume 78, number 4.

Gianluca Polgar, Mattia Iaia, Tommaso Righi, Pietro Volta (2022). *The Italian Alpine and Subalpine trouts: Taxonomy, Evolution, and Conservation*. Biology 2022, 11, 576.

Ghetti Pier Francesco, Giuseppe Sansoni (2005). *Atlante per il riconoscimento dei Macroinvertebrati dei corsi d'acqua italiani*. Ed. Trento: Provincia autonoma (5^a edizione).

ISPRA, *Indice biotico esteso-IBE*, consultato il 4 giugno 2023, <https://www.isprambiente.gov.it/it/attivita/biodiversita/documenti/indice-biotico-esteso-ibe>

J. L. Metcalfe (1989). *Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: history and present status in Europe*. Environmental Pollution 60, 101–139.

John H. Olive, Jim L. Jackson, Joanna Bass, Lynda Holland, Timothy Savisky (1988). *Benthic Macroinvertebrates as Indexes of Water Quality in the Upper Cuyahoga River*. Ohio J. Sci. 88 (3): 91-98

K. Khamis, D. M. Hannah, L. E. Brown, R. Tiberti, A. M. Milner (2014). *The use of invertebrates as indicators of environmental change in alpine rivers and lakes*. Science of the Total Environment 493: 1242 – 1254.

L. Pompei, A. Carosi, G. Pedicillo, E. Rocchini, M. Lorenzoni (2011). *Age and growth analysis of the chub, Squalius squalus (Bonaparte, 1837), in the Assino Creek (Umbria, Italy)*. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems 400, 09.

Laura Nardi & Massimo Rinaldi (2015). *Spatio-temporal patterns of channel changes in response to a major flood event: the case of the Magra River (central-northern Italy)*. Earth Surf. Process. Landforms 40: 326–339.

Marina Isidori, Margherita Lavorgna, Angela Nardelli, Alfredo Parrella (2004). *Integrated environmental assessment of Volturno River in South Italy*. Science of the Total Environment 327: 123-134

Massimo Rinaldi, Cristina Simoncini, Hervé Piégay (2009). *Scientific design strategy for promoting sustainable sediment management: the case of the Magra River (Central-Northern Italy)*. River. Res. Applic. 25: 607-625

Pier Giorgio Bianco, Vincenzo Caputo, Venera Ferrito, Massimo Lorenzoni, Francesco Nonnis Marzao, Fabrizio Stefani, Andrea Sabatini, Lorenzo Tancioni (2013). *Squalis lucumonis*. IUCN. <http://www.iucn.it/scheda.php?id=1166336394>

Pier Giorgio Bianco, Vincenzo Caputo, Venera Ferrito, Massimo Lorenzoni, Francesco Nonnis Marzao, Fabrizio Stefani, Andrea Sabatini, Lorenzo Tancioni (2013). *Salmo trutta*. IUCN. <http://www.iucn.it/scheda.php?id=-1938596710>

Robin L. Vannote, G. Wayne Minshall, Kenneth W. Cummins, James R. Sedell, Colbert E. Cushing. *The River Continuum Concept*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37: 130-137.

Sergio Zerunian (2002). *Condannati all'estinzione? Biodiversità, biologia, minacce e strategie di conservazione dei Pesci d'acqua dolce indigeni in Italia*. Edagricole, Bologna, X + 220 pp.

Sergio Zerunian (2004). *Pesci delle acque interne d'Italia*. Quaderni Conservazione della Natura 20, Ministero dell'Ambiente – Istituto Nazionale Fauna Selvatica.

Sergio Zerunian (2007). *Problematiche di conservazione dei Pesci d'acqua dolce italiani*. Biologia ambientale, 21 (2): 49-55.

Simon Dufour, Massimo Rinaldi, Hervé Piégay, Amael Michalon (2015). *How do river dynamics and human influences affect the landscape pattern of fluvial corridors? Lessons from the Magra River, Central-Northern Italy*. Landscape and Urban Planning 134: 107-118.

Stefano Macchio, Gian Luigi Rossi, Giovanni Rossi, Salvatore De Bonis, Stefania Balzamo, Cristina Martone (2017). *Nuovo indice dello stato ecologico delle comunità ittiche (NISECI)*. ISPRA, Manuali e Linee Guida 159/2017

Xiaoming Jiang, Jing Xiong, Zhicai Xie, Yifeng Chen (2011). *Longitudinal patterns of macroinvertebrate functional feeding groups in a Chinese river system: A test for river continuum concept (RCC)*. Quaternary International 244: 289-295.

A. Kouba, A. Petrusek, P. Kozák (2014). *Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps*. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems 413, 05.

Angéline Bertin, Bruno David, Frank Cézilly, Paul Albert (2002). *Quantification of sexual dimorphism in Asellus aquaticus (Crustacea: Isopoda) using outline approaches*. Biological Journal of the Linnean Society 77: 523-533.

Ben Mcfarlanda, Fiona Carse, Leonard Sandin (2010). *Littoral macroinvertebrates as indicators of lake acidification within the UK*. Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst. 20: S105–S116.

Charles W. Martin (2014). *Naïve prey exhibit reduced antipredator behavior and survivorship*. PeerJ 2: e665.

Elvira Lafuente, Moritz D. Lürig, Moritz Rövekamp, Blake Matthews, Claudia Buser, Christoph Vorburger, Katja Räsänen (2021). *Building on 150 Years of Knowledge: The Freshwater Isopod Asellus aquaticus as an Integrative Eco-Evolutionary Model System*. Frontiers in Ecology and Evolution 9:748212.

Francisco J. Oficialdegui, Miguel Clavero, Marta I. Sánchez, Andy J. Green, Luz Boyero, Thomas C. Michot, Kristie Klose, Tadashi Kawai, Christophe Lejeusne (2019). *Unravelling the global invasion routes of a worldwide invader, the red swamp crayfish (Procambarus clarkii)*. Freshwater Biology 64: 1382-1400.

H.J. De Lange, E.M. De Haas, H. Maas, E.T.H.M. Peeters (2005). *Contaminated sediments and bioassay responses of three macroinvertebrates, the midge larva Chironomus riparius, the water louse*

Asellus aquaticus and the mayfly nymph Ephoron virgo. Chemosphere Volume 61, Issue 11: 1700-1709.

Irene O'Callaghan, Simon Harrison, Dara Fitzpatrick, Timothy Sullivan (2019), *The freshwater isopod Asellus aquaticus as a model biomonitor of environmental pollution: a review*. Chemosphere 235: 498-509.

Jonathan Adams, Paul Greenwood, Richard Pollitt, Tania Yonow (1985). *Loading Constraints and Sexual Size Dimorphism in Asellus aquaticus*. Behaviour, vol. 92, No. ¾: 277-287.

Kovalenko K. E., Dibble ED, Agostinho AA, Pelicice FM. (2010). *Recognition of non-native peacock bass, Cichla kelberi by native prey: testing the naivete hypothesis*. Biological Invasions 12(9): 3071–3080.

Leonard Sandin & Richard K. Johnson (2000). *The statistical power of selected indicator metrics using macroinvertebrates for assessing acidification and eutrophication of running waters*. Hydrobiologia 422/423: 233–243.

Linnaeus, C. (1758). *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Editio decima, reformata [10th revised edition], vol. 1: 637, available online at <https://biodiversitylibrary.org/page/726886>

Lorraine Maltby (1991). *Pollution as a probe of life-history adaptation in Asellus aquaticus (Isopoda)*. Oikos 61: 11-18.

Maja Plahuta, Tatjana Tišler, Mihael Jožef Toman, Albin Pintar (2017). *Toxic and endocrine disrupting effects of wastewater treatment plant influents and effluents on a freshwater isopod Asellus aquaticus (Isopoda, Crustacea)*. Chemosphere 174: 342-353.

Martti Rask, Christa Hiisivuori (1985). *The predation on Asellus aquaticus (L.) by perch, Perca fluviatilis (L.), in a small forest lake*. Hydrobiologia 121: 27–33.

Mirco Bundschuh, Andreas Appeltauer, André Dabrunz, Ralf Schulz (2012). *Combined Effect of Invertebrate Predation and Sublethal Pesticide Exposure on the Behavior and Survival of Asellus aquaticus (Crustacea; Isopoda)*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 63: 77–85.

Stubbington, R., England, J., Wood, P.J. and Sefton, C.E.M. (2017). *Temporary streams in temperate zones: recognizing, monitoring and restoring transitional aquatic-terrestrial ecosystems*. WIREs Water, 4: e1223.

T. Akyüz, B. M. Erkan, S. Akyüz, A. Bassari (2001). *Radioisotope excited X-ray fluorescence analysis of Asellus aquaticus (Crustacea: Isopoda) from Istanbul as an indicator of environmental metal pollution*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Vol. 249, No. 3: 649–651.

Vandel A (1926). *La reconnaissance sexuelle chez les aselles*. Bulletin de la Société Zoologique de France 51: 163–172.

Žiga Fišer, Simona Prevorčnik, Nina Lozej, Peter Trontelj (2019). *No need to hide in caves: shelter-seeking behavior of surface and cave ecomorphs of Asellus aquaticus (Isopoda: Crustacea)*. Zoology 134, 58-65

Ringraziamenti

È importante che io dedichi uno spazio di questo elaborato a quelle persone senza le quali esso non esisterebbe neanche.

Ringrazio i professori Dott. Marco Parolini, Dott. Raul Manenti e la Dott.ssa Michela Sugni che ci hanno accompagnato in questo tirocinio con la loro pazienza, conoscenza e soprattutto travolgente passione. Le settimane passate in laboratorio (e ovviamente i tre giorni di campionamento) sono state fonte di ispirazione oltre che di crescita e, ad esser sinceri, di risate e buon umore. Vorrei estendere la mia gratitudine in particolare alla professoressa Sugni, per i consigli e le sagge parole che mi ha rivolto, che rimarranno sempre nei miei pensieri, in qualunque carriera intraprenderò.

Ringrazio i miei genitori per il sostegno economico che non mi hanno fatto mancare nonostante un percorso più lungo del pattuito, per i sacrifici fatti per garantire un'educazione di alto livello a me e ai miei fratelli lontani da casa in Sicilia.

Ringrazio il resto della mia famiglia, in particolare mia sorella Clara, con cui ho potuto condividere tutte le gioie e preoccupazioni del percorso universitario: non potrei essere più felice di non essere più separate in due regioni diverse.

Ringrazio i miei amici storici, Dafne, Alessia, Irene, Desirée e Giacomo, per tutti questi anni in cui mi sono stati vicini, nonostante le difficoltà nella vita di ognuno di loro. Vorrei poter restituire loro tutta la forza che mi hanno prestato per affrontare ogni ostacolo che potrebbero incontrare in futuro.

È doveroso, da parte mia, rivolgere un importante ringraziamento agli amici che ho incontrato in questo Corso di Laurea: non sminuisco il mio impegno nel dire che se non ci fossero stati loro, non sarei riuscita a conseguire questo titolo di studio, o almeno non in queste tempistiche. Mi hanno insegnato la semplicità e la genuinità dell'aiutarsi l'un l'altro, in diversi modi, che siano gli appunti di una lezione che non si è potuta seguire o un sorriso amico dopo una lunga e tediosa giornata. Mi auguro che ognuno di loro, nella vita, riesca ad ottenere qualunque cosa si meritino e desiderino.

Dal profondo del mio cuore, ringrazio Oliwia, che nonostante la distanza non mi ha mai fatto mancare il suo supporto e amore. Non potrò mai essere più grata dei pomeriggi infiniti passati ad ascoltarmi parlare di argomenti fuori dal suo ambito e, spesso, in una lingua che non capisce. Dedico a lei buona parte della felicità che provo al raggiungere questo traguardo con la speranza e l'obiettivo di condividere molte altre pietre miliari delle nostre vite.