



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

**CONFRONTO TRA METODI ECOTOSSICOLOGICI
PER VALUTARE LA TOSSICITÀ DI ACQUE
REFLUE DOMESTICHE**

Relatori

Prof.ssa Ornella Pastoris

Dott.ssa Laura Castagna

Dott.ssa Giulia Galvani

Tesi Sperimentale di
MATILDA GRANDI

Anno Accademico 2024/2025

RIASSUNTO

L'ecotossicologia si è evoluta progressivamente come una disciplina scientifica chiave per valutare l'impatto dei contaminanti sull'ecosistema. I saggi ecotossicologici sono gli strumenti che utilizzano diversi organismi modello per determinare se si sono verificati danni nell'ambiente. Parlando nello specifico di prodotti per il bucato – *oggetto di questo studio sperimentale* – negli ultimi anni è sempre più crescente la produzione e la vendita di formulazioni alternative ai prodotti convenzionali, le quali utilizzano la “*chimica verde*”: progettare formulazioni le cui componenti si scompongono in innocui prodotti di degradazione, le cui sostanze pericolose sono ridotte e/o eliminate.

Per questo lavoro di tesi è stato fatto un sondaggio al fine di verificare i prodotti tradizionali più comprati: *Dixan, Sole e Chanteclair*. Questi sono stati comparati con altri tre detersivi emersi nel sondaggio che presentano un'indicazione importante in etichetta, ovvero la dicitura “*bio/green*”: *Winni's, Green Emotion e Biophura*. Lo scopo è stato quello di verificare se l'etichetta presente nei prodotti “*bio*” sia realmente rappresentativa della tossicità dei detersivi. Ai fini della valutazione, i crostacei cladoceri della specie *Daphnia magna*, l'alga unicellulare della specie *Raphidocelis subcapitata* e i batteri bioluminescenti della specie *Vibrio fischeri* sono stati utilizzati per condurre test di tossicità acuta in cui è stato determinato il valore di EC₅₀ misurando rispettivamente l'immobilità dei crostacei e l'inibizione del tasso di crescita algale e della bioluminescenza batterica. A questo scopo, sono state preparate una serie di diluizioni seriali che hanno consentito di determinare la tossicità dei prodotti ai tre organismi selezionati.

I risultati ottenuti permettono di affermare che, in generale, i detersivi meglio sopportati da tutti e tre gli organismi rientrano nella categoria “*green*”, sebbene *Biophura* rappresenti un'eccezione: tutti e tre gli individui percepiscono la sua tossicità già a basse concentrazioni e, inoltre, per ben due di questi (*Raphidocelis subcapitata* e *Vibrio fischeri*) è il prodotto meno tollerato in assoluto. Il prodotto tradizionale più tossico è risultato essere *Dixan*. Al contrario, i più tollerati sono stati *Green Emotion* e *Sole*. Anche quest'ultimo si può definire un'eccezione: nonostante quanto appena dichiarato, non rientra nella categoria “*green*”.

Le conclusioni tratte da questo studio sperimentale non possono assumere valore di carattere generale e avvalorano la necessità di compiere studi sperimentali su altre categorie di prodotti emergenti, considerando inoltre altri aspetti degli individui quali comportamento, riproduzione, effetti cumulativi di detersivi diversi. Sarebbe auspicabile ampliare la gamma di organismi modello e valutare il destino dei vari prodotti nei comparti ambientali, studiando sia il fenomeno del bioaccumulo, sia il processo di biorisanamento.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 <i>L'ECOTOSSICOLOGIA.....</i>	<i>1</i>
1.1.1. CENNI STORICI ED EVOLUZIONE DELLA DISCIPLINA	1
1.1.2. SCOPO DELLA DISCIPLINA.....	2
1.1.3. MISURAZIONE DEL DANNO	3
1.1.3.1. PARAMETRI FONDAMENTALI.....	3
1.1.4. TEST DI TOSSICITÀ ACUTI E CRONICI.....	4
1.1.5. SAGGI ECOTOSSICOLOGICI	5
1.1.5.1. CARATTERISTICHE ORGANISMI MODELLO UTILIZZATI PER I SAGGI.....	5
1.1.5.2. ANALISI DI DIFFERENTI MATRICI	7
1.1.5.3. BIOINDICATORI COMUNEMENTE UTILIZZATI	7
1.2. <i>PANORAMICA BATTERIE ECO-TOSSICOLOGICHE SCELTE PER QUESTO STUDIO</i>	<i>9</i>
1.2.1. IL CROSTACEO CLADOCERO APPARTENENTE ALLA SPECIE <i>DAPHNIA</i> <i>MAGNA</i>	<i>9</i>
1.2.1.1. Inquadramento tassonomico e morfologia.....	9
1.2.1.2. Habitat	10
1.2.1.3. Alimentazione.....	10
1.2.1.4. Riproduzione	10
1.2.1.5. <i>Daphnia magna</i> in ecotossicologia	10
1.2.2. L'ALGA UNICELLULARE APPARTENENTE ALLA SPECIE <i>RAPHIDOCELIS</i> <i>SUBCAPITATA</i>	<i>11</i>
1.2.2.1. Inquadramento tassonomico e morfologia.....	11
1.2.2.2. Habitat	12
1.2.2.3. Alimentazione.....	12
1.2.2.4. Riproduzione	12
1.2.2.5. <i>Raphidocelis subcapitata</i> in ecotossicologia	12
1.2.3. IL BATTERIO BIOLUMINESCENTE APPARTENENTE ALLA SPECIE <i>VIBRIO</i> <i>FISCHERI</i>	<i>13</i>
1.2.3.1. Inquadramento tassonomico e morfologia.....	13
1.2.3.2. La bioluminescenza naturale del batterio	13
1.2.3.3. Habitat	14
1.2.3.4. Alimentazione.....	14

1.2.3.5.	Riproduzione	14
1.2.3.6.	Vibrio fischeri in ecotossicologia.....	14
1.3.	<i>L'INQUINAMENTO DELLE ACQUE</i>	15
1.3.1.	GLI INQUINANTI PERSISTENTI E IL LORO BIOACCUMULO.....	15
1.3.2.	I PRODOTTI DI CONSUMO PER LA CASA COME INQUINANTI EMERGENTI 17	
1.3.2.1.	LA DIFFUSIONE DEI DETERSIVI “ <i>ECO-FRIENDLY</i> ”	18
2.	SCOPO DEL LAVORO	19
2.2.	<i>AZIENDA OSPITANTE: LABANALYSIS ENVIRONMENTAL SCIENCE</i>	19
2.3.	<i>OBIETTIVO</i>	19
2.4.	<i>DETERSIVI SCELTI PER QUESTO STUDIO</i>	20
3.	MATERIALI E METODI	22
3.1.	<i>MATERIALI</i>	22
3.2.	<i>MATERIALI E METODI PER LA VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ CON IL CROSTACEO DAPHNIA MAGNA</i>	22
3.2.1.	Materiali utilizzati per i test condotti su <i>Daphnia magna</i> :.....	22
3.2.2.	Acque di allevamento e di diluizione.....	22
3.2.3.	Organismo sottoposto al saggio: <i>Daphnia magna</i>	23
3.3.4.	METODO APAT CNR IRSA 8020 MAN 29 2003 - Valutazione della tossicità con <i>Daphnia magna</i>	24
3.3.	<i>MATERIALI E METODI DI VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ CON ALGA RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA</i>	25
3.3.1.	Materiali utilizzati per i test condotti su <i>Raphidocelis subcapitata</i> :.....	25
3.3.2.	Condizioni di crescita.....	25
3.3.3.	Parametri per condurre i test	25
3.3.4.	Organismo sottoposto al saggio: <i>Raphidocelis subcapitata</i>	26
3.3.5.	METODO ISO 8692:2012 - Valutazione della tossicità con <i>Raphidocelis subcapitata</i> 30	
3.4.	<i>MATERIALI E METODI DI VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ CON IL BATTERIO VIBRIO FISCHERI</i>	32
3.4.1.	Materiali utilizzati per i test condotti su Vibrio Fischeri.....	32
3.4.2.	Parametri per l'esecuzione del saggio.....	32

3.4.3.	Organismo sottoposto al saggio: il batterio <i>Vibrio fischeri</i>	32
3.4.4.	METODO APAT CNR IRSA 8030 MAN 29 2003 - Valutazione della tossicità con <i>Vibrio fischeri</i>	32
4.	CASO STUDIO IN OGGETTO	33
4.1.	<i>PROCEDURA SPERIMENTALE PER I TEST CONDOTTI SU DAPHNIA MAGNA E RAPHIDOCCELIS SUBCAPITATA</i>	33
4.2.	<i>PROCEDURA SPERIMENTALE PER I TEST CONDOTTI SU VIBRIO FISCHERI</i>	34
5.	RISULTATI.....	36
5.1.	<i>RISULTATI TEST CONDOTTI SUL CROSTACEO DAPHNIA MAGNA</i>	36
5.1.1.	Detersivo Dixan	37
5.1.2.	Detersivo Sole.....	38
5.1.3.	Detersivo Chanteclair	39
5.1.4.	Detersivo Winni's.....	40
5.1.5.	Detersivo Green Emotion	41
5.1.6.	Detersivo Biophura	42
5.2.	<i>RISULTATI TEST CONDOTTI SULL'ALGA RAPHIDOCCELIS SUBCAPITATA</i>	43
5.2.1.	Detersivo Dixan	44
5.2.2.	Detersivo Sole.....	45
5.2.3.	Detersivo Chanteclair	46
5.2.4.	Detersivo Winni's.....	48
5.2.5.	Detersivo Green Emotion	49
5.2.6.	Detersivo Biophura	50
5.3.	<i>RISULTATI TEST CONDOTTI SUL BATTERIO VIBRIO FISCHERI</i>	51
5.3.1.	Detersivo Dixan	52
5.3.2.	Detersivo Sole.....	53
5.3.3.	Detersivo Chanteclair	54
5.3.4.	Detersivo Winni's.....	55
5.3.5.	Detersivo Green Emotion	56
5.3.6.	Detersivo Biophura.....	57
6.	DISCUSSIONE	58
6.1.	<i>TEST CONDOTTI SUL CROSTACEO DAPHNIA MAGNA</i>	58
6.2.	<i>TEST CONDOTTI SULL'ALGA RAPHIDOCCELIS SUBCAPITATA</i>	59

6.3.	<i>TEST CONDOTTI SUL BATTERIO VIBRIO FISCHERI</i>	60
7.	CONCLUSIONE	61
8.	PROSPETTIVE FUTURE	63
9.	BIBLIOGRAFIA	64
10.	MANUALI, LINEE GUIDA E NORME	72
11.	RINGRAZIAMENTI	75

1. INTRODUZIONE

1.1 L'ECOTOSSICOLOGIA

1.1.1. CENNI STORICI ED EVOLUZIONE DELLA DISCIPLINA

Le attività antropiche (uso del suolo, urbanizzazione, acquacoltura, eccessivo prelievo delle risorse, uso di farmaci e prodotti per la cura personale), da sempre, influiscono sugli ecosistemi generando impatti a diversi livelli: deposizioni acide, inquinamento atmosferico, marino e di falda, contaminazione da composti chimici sintetici, perdita di habitat.

L'ecosistema può essere in grado di sopportare la pressione antropica anche grazie alle comunità microbiche naturali, che rispondono alla contaminazione multipla (diffusa e cronica) a cui è soggetto l'ambiente con processi metabolici e co-metabolici biodegradativi al fine di rimuovere le molecole tossiche. Inoltre, sono parametri che permettono di definire lo stato di qualità di un ecosistema e la sua capacità potenziale di recupero naturale (Mancini et.al; 2020).

Tuttavia, l'evoluzione socioeconomica rappresenta una continua minaccia che ha reso sempre più urgente la necessità di un approccio di prevenzione che si basi sulla conoscenza e sullo studio degli ecosistemi, in modo da mitigare gli effetti negativi che negli ultimi anni sono associati a problematiche ben più complesse, come i cambiamenti climatici globali.

È nata così l'ecotossicologia e le sue sotto-discipline (eco-neuro tossicologia ed eco-geno tossicologia) che vengono definite “*sentinelle decisive*” in quanto hanno ottenuto ottimi risultati applicativi anche in contaminazioni ambientali non rilevate dai monitoraggi routinari (Mancini et.al; 2020).

Il 1968 è l'anno in cui il termine “*ecotossicologia*” viene coniato da un comitato dell'*International Council of Scientific Unions* (Russo, 2007/2008). A partire da quella data sono state date molte definizioni indispensabili per comprendere a pieno l'importanza di questa scienza.

La prima risale al 1978 in “*Principle of toxicology*” ed è la seguente: “*l'ecotossicologia riguarda gli effetti tossici degli agenti chimici e fisici sugli organismi viventi, in particolare su popolazioni e comunità all'interno di definiti ecosistemi; essa comprende anche lo studio delle modalità di diffusione di questi agenti e le loro interazioni con l'ambiente*” (Butler, 1978).

Altri autori successivamente hanno sottolineato l'importanza della componente ecologica e tossicologica con riferimento ad effetti diretti o indiretti. Ad esempio, quella presente nello scritto “*Ecotoxicology in Theory and Practice*”, di seguito riportata:

“*L'ecotossicologia rappresenta il campo di studio che integra gli effetti ecologici e tossicologici degli inquinanti chimici su popolazioni, comunità ed ecosistemi con il loro destino nell'ambiente (trasporto, trasformazione, e degradazione)*” (Forbes e Forbes, 1994).

Molto spesso i termini “*tossicologia*” ed “*ecotossicologia*” vengono utilizzati come sinonimi; tuttavia, emergono sostanziali differenze:

- Il termine “*tossicologia*” (“*scienza dei veleni*”) è più indicato per identificare lo studio, il destino e gli effetti dei contaminanti su uomo e ambiente a protezione del singolo individuo e utilizza per l’extrapolazione modelli animali come ratto, topo e coniglio (APAT, 71/2006).
- Il termine “*ecotossicologia*” (“*scienza dei veleni per l’ambiente*”) quantifica e studia i danni su tutte le specie dell’ecosistema causati dall’inquinamento ambientale. Utilizza per l’extrapolazione saggi su organismi acquatici e terrestri (APAT, 71/2006; Bazerman et. al; 2005).

L’OMS (*Organizzazione Mondiale della Sanità*) definisce il concetto “*salute*” includendo non solo l’assenza di malattie, ma anche uno “*stato dinamico di benessere fisico, mentale, sociale e spirituale*”. In base a quanto appena definito, si può affermare che l’essere umano viene considerato parte integrante dell’ecosistema, in un continuo rapporto coevolutivo con l’ambiente: forse è anche per questo motivo che spesso i termini vengono interscambiati (Mancini et.al; 2020).

L’ecotossicologia si è evoluta progressivamente come una disciplina scientifica chiave per valutare l’impatto dei contaminanti emergenti sull’ecosistema. Inizialmente la ricerca degli effetti tossici era mirata solo ad alcuni tipi di inquinanti: metalli pesanti e pesticidi (Matozzo et. al; 2025).

A tal proposito si cita il primo lavoro di *Carpenter* riguardante la tossicità di ioni di metalli pesanti, provenienti da miniere di piombo e zinco su alcune popolazioni ittiche, risalente al 1924 (Carpenter, 1924). Successivamente il campo di ricerca si è ampliato enormemente considerando anche altre categorie di sostanze, come ad esempio prodotti farmaceutici, prodotti per la cura personale e microplastiche (Matozzo et.al; 2025).

Ad oggi l’indagine eco-tossicologica è riconosciuta a livello internazionale come strumento per studiare gli effetti avversi negli ecosistemi, la diffusione nell’ambiente di un determinato composto, la sua trasformazione per processi chimici e il suo destino finale nei vari comparti ambientali e per prevenire danni futuri mediante campagne di monitoraggio (Mancini et.al; 2020; APAT 71/2006).

1.1.2. SCOPO DELLA DISCIPLINA

Il fine è quello di affermarne la tossicità (di un composto o una miscela) e stabilirne i valori compatibili con la vita degli organismi (APAT - IRSA/CNR 29/2003).

Nel 2005 Marchini S. afferma quanto riportato: “*le sostanze che per opera dell’uomo vengono introdotte nell’ambiente (contaminanti, inquinanti, xenobiotici), sono il fulcro dell’indagine ecotossicologica*”. Pertanto, questa scienza si occupa proprio di rispondere alle domande riguardanti il destino della qualità della vita considerando i composti tossici generati dall’attività umana (Marchini, 2005).

1.1.3. MISURAZIONE DEL DANNO

A seconda della durata degli eventi inquinanti, del tipo di inquinante e della sensibilità degli organismi, la presenza di sostanze tossiche può causare sintomi e risposte differenti (definite *endpoints*¹) che modificano negativamente la struttura della comunità e il funzionamento dell'ecosistema. Non sempre gli organismi riescono a mettere in atto meccanismi di difesa tali da contrastare l'effetto tossico (*Grafico n° 1*) (Mancini et.al; 2020). Di seguito sono riportati gli *endpoint* più comunemente osservati:

- Mortalità e/o immobilizzazione degli individui
- Variazione della vitalità (effetti sulla crescita – *diminuzione* - e sullo sviluppo)
- Alterazioni morfologiche e dei parametri comportamentali e fisiologiche
- Effetti sul DNA: danni al patrimonio genetico

Inoltre, l'ecosistema può subire altri danni come, ad esempio, l'eliminazione di specie maggiormente sensibili agli effetti tossici diretti e sostituzione con altre meno sensibili (in assenza di competizione) e il fenomeno dell'acclimatazione (adattamento fisiologico a livelli di inquinamento superiori a quelli ambientali) (Mancini et.al; 2020).

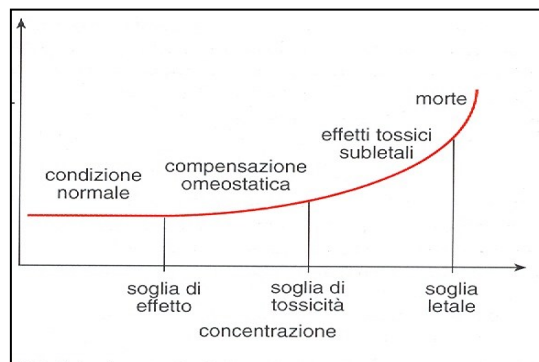


Grafico n° 1: mostra la relazione che esiste tra la risposta individuale e il grado di esposizione a un tossico (Gaggi G., 1998).

1.1.3.1. PARAMETRI FONDAMENTALI

Ad oggi esistono numerosi metodi standardizzati applicabili a numerose specie (appartenenti sia a classi tassonomiche che a livelli trofici differenti) che permettono di individuare criteri di valutazione e limiti soglia, al fine di quantificare la risposta e discriminare lo stato di qualità di un sito (Ebert, 2022; Mancini et.al; 2020).

¹ L'*endpoint* è un parametro misurabile o stimabile. Rappresenta la caratteristica di un componente ecologico che subentra in conseguenza all'esposizione ad un fattore di stress. Quando si raggiunge, il test si considera terminato (APAT 71/2006).

Per citare alcuni parametri fondamentali:

- LOEL (*lowest observed effect level*), minima concentrazione che provoca un effetto osservabile sugli animali (Ebert, 2022).
- NOEL (*no observed effect level*), massima concentrazione in cui ancora non si osservano effetti avversi (APAT 71/2006).
- MATC (*maximum acceptable toxic concentration*), media geometrica di NOEL e LOEL: concentrazione massima non tossica per gli organismi testati (APAT, 71/2006).
- EC₅₀ (Concentrazione efficace mediana) concentrazione che produce nel 50% degli individui un effetto diverso dalla morte (immobilizzazione, arresto della crescita in saggi sia acuti che cronici).
- LD₅₀ (dose letale mediana): dose di una sostanza chimica che determina la morte del 50% degli individui in saggi di tossicità acuta per somministrazione diretta. Si esprime in modo ponderato per unità di peso corporeo.

1.1.4. TEST DI TOSSICITÀ ACUTI E CRONICI

Nel rapporto RTI CTN_AIM 04. /2001, ANPA 2001 associato alle tre tipologie fondamentali di tossicità si distinguono principalmente tre test:

- Test di tossicità acuta con durata 24 ore (*Grafico n° 2*): è l'effetto immediato prodotto da una sostanza tossica su un organismo vivente (soma). L'*endpoint* più comune è la morte.
- Test di tossicità cronica: indica la capacità di una sostanza di provocare danni alla salute a seguito di un'esposizione prolungata, ripetuta o continua nel tempo, spesso a basse dosi. A differenza dell'acuta, provoca effetti a lungo termine, a volte irreversibili, accumulandosi nell'organismo e colpendo organi bersaglio come fegato, reni e sistema nervoso (Mancini et.al; 2020).
- Test di tossicità e mutagenesi: è l'effetto che una sostanza produce su un organismo vivente, sulla sua capacità riproduttiva e sulle generazioni successive (ISPRA, 88/2013).

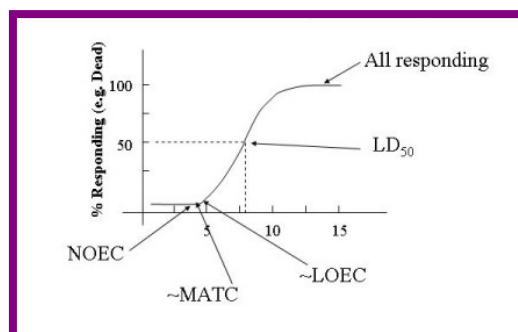


Grafico n° 2: esempio di test di tossicità acuta: curva che descrive la relazione causa-effetto dell'esposizione a diverse concentrazioni di un contaminante e i diversi parametri (Gaggi G., 1998).

Tuttavia, in letteratura emerge che non sempre è possibile stabilire un limite temporale (ad esempio 24 h/48 h) per distinguere le due tipologie di saggi, in quanto i vari taxa possiedono una vita media molto diversa (ECETOC, 1993).

Un'altra chiave di lettura può essere la distinzione tra effetto letale e subletale. Il primo si manifesta con *la morte di una frazione definita degli organismi esposti ad un tossico per un tempo prestabilito*. Nel secondo caso si sottolinea che l'esposizione non causa la morte in breve tempo, ma è probabile che gli effetti portino ad una diminuzione della capacità dell'organismo di rispondere all'ambiente e quindi ad un accorciamento della vita (Moriarty, 1990).

1.1.5. SAGGI ECOTOSSICOLOGICI

Gli strumenti con cui si determina se si sono verificati effetti nell'ambiente sono saggi ecotossicologici a cui si sottopongono diversi organismi modello (APAT, 71/2006). Ormai è noto ed accertato il principio secondo cui la potenziale tossicità di un materiale possa essere confermata solo utilizzando una batteria di saggi ecotossicologici, in quanto nessun singolo modello sperimentale è in grado di garantire la rappresentatività dei risultati per tutte le possibili tipologie di matrici e/o sostanze (Baudo et.al; 2011).

Negli anni, la scelta degli organismi da utilizzare come *bioindicatori* ha contribuito ai successi raggiunti dall'ecotossicologia moderna, offrendo nuove possibilità di applicazione e studio (si passa dalle specie zooplanctoniche fino ai predatori apicali). In ogni caso, ancora oggi si utilizzano i “*vecchi modelli*”, sebbene con approcci più innovativi: ad esempio, ricci di mare e mitili vengono utilizzati per mettere a punto sistemi diagnostici basati sui meccanismi di azione molecolare dei contaminanti. (Mancini et.al; 2020).

1.1.5.1. CARATTERISTICHE ORGANISMI MODELLO UTILIZZATI PER I SAGGI

Gli organismi utilizzati in ecotossicologia vengono definiti “*bioindicatori*” in quanto subiscono un'alterazione rispetto al loro stato naturale in seguito alla presenza di concentrazioni di inquinanti, (Russo 2007/2008).

Le specie da considerare per una batteria di saggi di ecotossicologia dovrebbero possedere una serie di caratteristiche riassunte da *Ducrot et.al; 2005*:

- Reperibilità degli organismi (RO) e disponibilità nell'arco dell'intero anno solare. Essi devono quindi essere facilmente allevabili e/o facilmente reperibili. Molte specie si possono mantenere in laboratorio per il tempo necessario all'esecuzione dei saggi, ma non sono tutte allevabili in quanto sopravvivono, ma non si riproducono; pertanto, si contempla la possibilità di una raccolta in natura (ASTM, 1994). Se gli organismi sono sempre disponibili è possibile monitorare più ambienti diversi e in periodi diversi dell'anno; al contrario se la loro disponibilità è stagionale,

la loro utilità è limitata (Baudo et.al; 2011). Il prelievo in natura inoltre deve essere sostenibile ecologicamente e non deve comportare rischi per la popolazione d'origine.

- Sensibilità ai componenti tossici
- Distribuzione geografica ampia
- Importanza ecologica ed economica
- Riconoscimento come specie di riferimento in metodi standardizzati

Inoltre, sono da preferire specie che, dal punto di vista filogenetico ed ecologico, sono vicine alle specie dominanti nell'ambiente di studio, autoctone o comunque sovrapponibili per nicchia ecologica occupata e modalità di alimentazione, compatibili con il tipo di esposizione ed *endpoint* scelti (Buttino, 2011).

Il ciclo vitale, la strategia riproduttiva e le dimensioni; vengono menzionate in quanto possono essere rilevanti nella determinazione delle vie di esposizione e dei meccanismi di tossicità e bioaccumulo (ASTM, 1994).

Una batteria di organismi valida da sottoporre a saggio ecotossicologico – *indipendentemente dall'ambiente di studio e dall'applicazione specifica* – dovrebbe prevedere la presenza di almeno tre specie di organismi, con stadi vitali ben distinti e appartenenti a livelli funzionali diversi (ad es.: un produttore primario vegetale, un decompositore/saprofita, un detritivoro/filtratore, un consumatore). Questo perché la batteria selezionata dovrebbe possedere un potere discriminatorio e una sensibilità tali da renderla capace di rispondere al maggior numero di forme di inquinamento possibili.

Al fine di valutare correttamente la valenza ecologica e la praticità di una batteria si considerano alcuni parametri significativi (Buttino, 2011) quali:

- Standardizzazione dell'endpoint (S_{ep}): il saggio deve garantire il confronto tra laboratori diversi; pertanto, deve essere basato su una metodologia di provata affidabilità che consenta una condivisione dei risultati.
- Effetto sulla scala di rischio: se un saggio prevede *endpoint* multipli, il fattore di ponderazione sarà la somma dei singoli *endpoint* misurabili.
- Rilevanza e sensibilità dell'effetto (RES): nel caso in cui si voglia valutare la valenza della batteria per scopi di prevenzione (quindi sfruttando la sua capacità di rilevare segnali precoci), essa dovrebbe essere inversamente proporzionale alla gravità degli effetti in funzione del tempo di esposizione: si avranno quindi fattori di ponderazione elevati per effetti sub-letali di lunga esposizione e fattori di ponderazione bassi per effetti letali acuti da misurare su brevi periodi espositivi.

- Rappresentatività della matrice rispetto all'applicazione (RM_{appl}): essa dovrebbe essere proporzionale all'importanza della matrice sulla quale viene eseguito il saggio rispetto agli obiettivi dell'indagine.
- Valenza della distribuzione geografica della specie-test: la batteria dovrebbe essere proporzionale all'assenza/presenza dell'organismo nell'area considerata (ISPRA, 88/2013).

1.1.5.2. ANALISI DI DIFFERENTI MATRICI

I test possono essere condotti in laboratorio esaminando matrici ambientali diverse (Balzamo, 2010): acque di scarico, sotterranee, marine e superficiali, campioni reali di fiumi, campioni di effluenti complessi (APAT 71/2006), rifiuti, suolo, aria.

Nonostante le matrici che costituiscono l'ambiente siano molteplici, in uno studio condotto da ARPA in Italia (54 province su un totale di 103, pari a più del 52.4% del territorio nazionale) nel 2005 - *volto a verificare quanto siano diffuse le metodiche eco-tossicologiche e come vengono utilizzate*- le analisi su sedimenti, acque marine, acque sotterranee, aria e suolo sono risultate essere molto meno diffuse rispetto a quelle effettuate su acque reflue e superficiali (APAT 71/2006).

Ponendo pertanto un focus maggiore alle acque, i test di tossicità acquatica sono effettuati mediante l'esposizione di organismi selezionati a concentrazioni di sostanze poste in soluzione nel mezzo (APAT 71/2006). Il livello della loro qualità viene valutato secondo la Direttiva Quadro Acque 2000/60/CE che è in continua evoluzione e classifica lo stato dei corpi idrici con programmi di monitoraggio e valutazione dello stato chimico ed ecologico.

1.1.5.3. BIOINDICATORI COMUNEMENTE UTILIZZATI

Nel Rapporto CTN_AIM, ANPA 2001 vengono identificati alcuni degli organismi utilizzati. In seguito, ne sono riportati alcuni con riferimento a specie, *endpoint*, tempo di esposizione e norma di riferimento (ISPRA, 88/2013):

- Alghe

Raphidocelis subcapitata è un'alga unicellulare d'acqua dolce. L'*endpoint* misurato è l'inibizione della crescita algale coltivata in un intervallo di concentrazioni del campione di prova e misurata dopo 72 ore. Il saggio è applicabile ad acque di scarico, estratti o elutriati acquosi, acque dolci, elutriati di sedimenti, acque interstiziali. Il riferimento è la norma ISO 8692:2012).

Ulva pertusa (recentemente spesso riclassificata come *Ulva australis* in alcune regioni) è una macroalga verde ampiamente utilizzata nei test ecotossicologici marini grazie alla sua sensibilità a vari inquinanti, facilità di reperimento e rapida riproduzione. I test su questa specie sono considerati semplici, economici e sensibili, spesso utilizzati per monitorare la

qualità delle acque costiere. Il riferimento considerato è dato dalla norma ISO/DIS 13308 (2011).

- Altri vegetali

Lepidium sativum è una pianta erbacea annuale dicotiledone appartenente alla famiglia delle *Brassicaceae*. Il saggio prevede la conta dei semi germinati e la misura dell'allungamento radicale e si valutano gli effetti sulla germinazione dei semi nei primi stadi di sviluppo, in seguito a esposizione alla sostanza di prova. Il metodo può essere applicato sia ad acque (superficiali, di falda, di pioggia, di scarico e percolati), che a campioni solidi quali sedimenti e fanghi di depurazione. Si fa riferimento al metodo ufficiale UNICHIM N. 1651 (2003).

- Crostacei

La specie più diffusa e utilizzata è *Daphnia magna*, un crostaceo d'acqua dolce. L'*endpoint* misurato è rappresentato dalla immobilizzazione dopo 24/48 ore di esposizione dell'individuo a concentrazioni diverse della sostanza tossica. Esistono anche metodiche croniche con durata di sette giorni (ISPRA, 88/2013). Il saggio si effettua per acqua e sedimenti di corsi d'acqua, laghi, relativi sedimenti, scarichi reflui e industriali nel suolo, acque superficiali e in fognatura. Il riferimento utile è il metodo APAT-IRSA, 2003b.

Un'altra specie chiave di crostaceo di acqua dolce è *Ceriodaphnia dubia*. Si misurano due *endpoint*: la mortalità delle femmine adulte e la loro riproduzione durante il periodo di esposizione. la norma e i metodi di riferimento sono ISO 20665:2008, APAT-IRSA 2003c 8100 e APAT-IRSA, 2003d 8040.

- Batteri bioluminescenti

Tra questi si riporta il batterio d'acqua salata *Vibrio fischeri* che viene utilizzato per la valutazione della tossicità acuta di vari tipi di acque (scarico, industriali, superficiali, sotterranee), ma anche composti chimici, nonché sedimenti e suoli (APAT 71/2006).

L'*endpoint* misurato è l'inibizione della bioluminescenza naturale dell'organismo esposto alla sostanza. Il metodo di riferimento è APAT-IRSA, 2003a. 8030.

- Pesci

I test con questi organismi sono meno diffusi e più complicati da attuare in quanto non sempre i soggetti scelti riescono a sopportare bene le condizioni di stabulazione. I test acuti hanno una durata di 96 ore mentre quelli cronici variano in base alla specie utilizzata. L'*endpoint* è rappresentato dalla mortalità (UNI EN ISO 7346-1 (2000)).

Data la sua rilevante importanza, si riporta come esempio la specie *Danio rerio* (noto come "Zebrafish") in quanto negli ultimi vent'anni il suo utilizzo è aumentato esponenzialmente (riunione SETAC del 2020). Il test di tossicità che utilizza embrioni di *zebrafish* (*Fish Embryo*

Toxicity Acute test - OECD 236), è l'approccio alternativo più promettente al test acuto classico con il pesce adulto che non è compatibile con la maggior parte della normativa vigente in materia di benessere degli animali (Direttiva 2010/63/UE). Si possono inoltre misurare diversi *endpoint* contemporaneamente, come: neurotossicità, cardiotoxicità, embriotossicità, genotossicità ed interferenza endocrina. Il metodo di riferimento è APAT-IRSA, 2003e. 8010.

1.2. PANORAMICA BATTERIE ECO-TOSSICOLOGICHE SCELTE PER QUESTO STUDIO

1.2.1. IL CROSTACEO CLADOCERO APPARTENENTE ALLA SPECIE *DAPHNIA MAGNA*

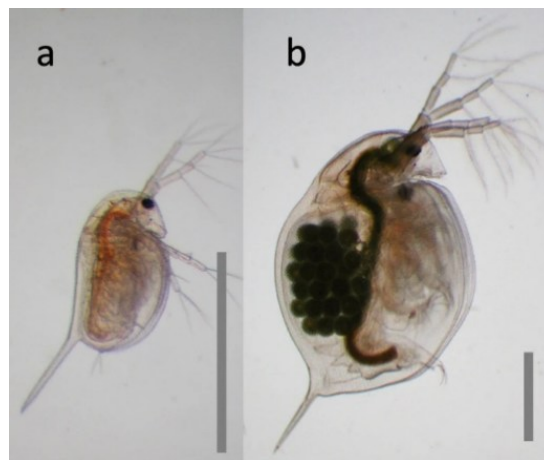


Figura n° 1: a) un neonato di *Daphnia magna*. b) un adulto di *Daphnia magna* (Ebert, 2022).

1.2.1.1. Inquadramento tassonomico e morfologia

Daphnia magna è un piccolo crostaceo planctonico (< 5 mm di lunghezza) facente parte dell'ordine dei cladoceri e alla classe dei brachiopodi (Stignani, 2011/2012) (*Figura n° 1*).

Tutte le specie di *Daphnia* descritte presentano una morfologia simile:

- Un corpo quasi trasparente (per proteggersi dalla predazione)
- Un capo abbastanza grande che si amplia verso il dorso
- Un unico occhio composto
- Due paia di antenne, le prime sono branchie utilizzate per la filtrazione, le seconde invece sono specializzate per nuotare (Ebert, 2022).

Gli individui adulti e i neonati sono fenotipicamente piuttosto simili, come si osserva in *figura n° 1*. I nuovi nati prima di raggiungere la maturità, mutano da quattro a sei volte, ma continuano a crescere a intervalli regolari per tutta la durata della loro vita (40-100 giorni) (Ebert, 2022).

1.2.1.2. Habitat

Il loro habitat è limitato a corpi d'acqua dolce e salmastra, nello specifico abitano sia in grandi laghi che stagni e piccole pozze temporanee. Sono in grado di sopravvivere in condizioni poco favorevoli come congelamento e secchezza temporanea sottoforma di “*stadio di riposo*” (Stignani, 2011/2012).

1.2.1.3. Alimentazione

Sono consumatori primari e organismi filtratori di piccole particelle in sospensione come alghe unicellulari (Azzolin, 2022/2023).

1.2.1.4. Riproduzione

Questi organismi sono noti per la loro capacità di riprodursi asessualmente per partenogenesi: le femmine adulte producono uova che si schiudono senza fecondazione. In condizioni favorevoli, la riproduzione asessuata può essere mantenuta per molti anni (Ebert, 2022).

In condizioni avverse, invece, sono in grado di passare alla riproduzione sessuata: in questo caso, le popolazioni producono prima maschi² (asessualmente) e poi uova aploidi che necessitano di fecondazione maschile. La femmina lascia cadere le uova fecondate in una custodia fatta dal suo carapace, la quale si deposita sul fondo del corpo idrico. Successivamente, subentra dapprima una fase di riposo (*ephippium*) al termine della quale le uova si schiudono e si sviluppano in femmine. La schiusa avviene in primavera, in seguito i nuovi nati si riproducono asessualmente durante la stagione e infine terminano la fase planctonica producendo fasi di riposo che resistono alle condizioni invernali (Wuerz et. al.; 2017).

Tuttavia, studi in diversi habitat, hanno dimostrato che gli aspetti ecologici del ciclo vitale possono variare: ad esempio, la *Daphnia* può continuare nella forma planctonica per tutto l'inverno o può persistere in pozze di pioggia desertiche di breve durata; oppure, le popolazioni possono mantenersi attive solo nella stagione delle piogge invernale e produrre fasi di riposo asessuata o non produrle. (Ebert, 2022).

1.2.1.5. *Daphnia magna* in ecotossicologia

Questo crostaceo possiede una serie di caratteristiche biologiche peculiari che lo rendono un ottimo organismo ecologico modello molto utilizzato negli studi (Stignani, 2011/2012):

- Dimensioni ridotte (caratteristica che rende le colture meno costose rispetto a pesci, molluschi e altri animali)

²La morfologia dei maschi di *Daphnia magna* è meno studiata rispetto a quella delle femmine, in quanto la loro presenza si verifica solo in determinate condizioni. Tuttavia, si presentano più piccoli e possiedono un'ampia apertura ventrale da cui si estende un uncino copulatorio, utilizzato per aggrapparsi alla femmina durante l'accoppiamento (Wuerz et. al.; 2017).

- Sensibilità a vari fattori di stress ambientali
- Ciclo di vita breve
- Riproduzione partenogenetica
- Facilità con cui si riesce a campionarlo
- Esoscheletro trasparente
- Diffusione in ambienti naturali

Per quanto concerne i saggi di ecotossicologia vengono valutati alcuni effetti come immobilizzazione e mortalità nei test di tossicità acuta; mentre riproduzione e crescita dell'animale sono considerati nei test cronici (Shahnawaz, 2023). Questi vengono definiti “*indicatori sensibili degli effetti tossici*” e forniscono inoltre informazioni sugli impatti letali e sub-letali.

1.2.2. L'ALGA UNICELLULARE APPARTENENTE ALLA SPECIE *RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA*

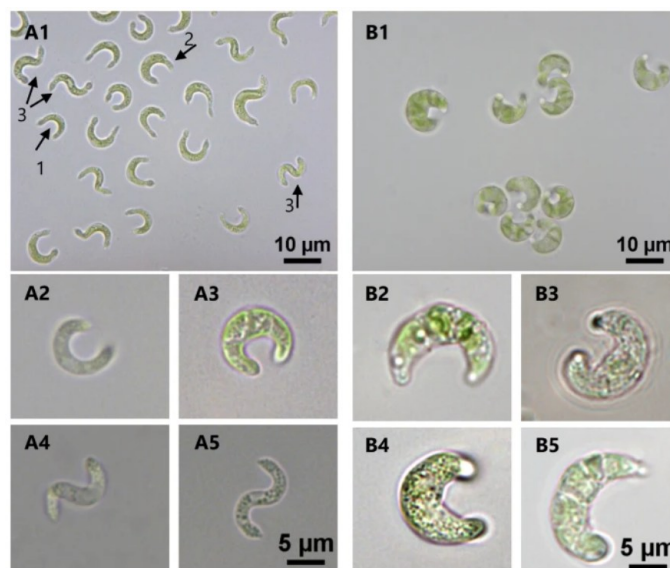


Figura n° 2: morfologia dell'alga *Raphidocelis subcapitata* in diversi momenti del ciclo vitale (Machado e Soares, 2024).

1.2.2.1. Inquadramento tassonomico e morfologia

L'alga unicellulare *Raphidocelis subcapitata* è una microalga planctonica d'acqua dolce che fa parte del phylum *Clorophyta*, (le alghe verdi) e della famiglia *Clorophyceae* (Machado e Soares, 2024). Precedentemente denominata *Selenastrum capricornutum* (Blaise e Vasseur 2005) per via della sua forma a mezza luna, come si può osservare in *figura n° 2*. Questa morfologia si mantiene durante il suo ciclo vitale, infatti l'organismo è definito non polimorfico (Blaise e Vasseur 2005; Chèvre, 2013). Nonostante quanto appena affermato, studi condotti in seguito hanno dimostrato che modificazioni della sua morfologia si rilevano in particolari condizioni, come ad esempio, l'esposizione ad

inquinanti (*Figura n° 2: B4 e B5*) e la fase di morte (*Figura n° 4.: A4 e A5*): rispettivamente assumono una conformazione più “gonfia” e più contorta (Machado e Soares, 2024).

1.2.2.2. Habitat

Raphidocelis subcapitata è una microalga, produttore primario negli ecosistemi acquatici (Kenaga, 1981), raccolta ed isolata per la prima volta in Norvegia nel fiume Nitelva dal ricercatore Skulberg (NORCCA 2023a). Fa parte del fitoplancton d’acqua dolce in quanto si trova in stagni, laghi, pozze e fiumi (Machado e Soares, 2024).

A livello geografico è presente praticamente in tutto il mondo (Fawley et al. 2006) e si trova principalmente in forma solitaria, ma può vivere anche in forma coloniale (Krienitz et al. 2011). Inoltre, per via della sua sensibilità a diversi inquinanti, si definisce un rappresentante d’acqua dolce sia di ambienti eutrofici che oligotrofi (Machado e Soares, 2024).

1.2.2.3. Alimentazione

È un organismo autotrofo, pertanto effettua la fotosintesi utilizzando luce e anidride carbonica rispettivamente come fonte di energia per il metabolismo e di carbonio (Suzuki et al. 2018; Priyanka et al. 2020). Può crescere anche in condizioni eterotrofe utilizzando il glucosio, il che comporta un aumento della produzione di biomassa e lipidi e una diminuzione della clorofilla (Suzuki et al. 2018; Priyanka et al. 2020 - Machado e Soares, 2024).

1.2.2.4. Riproduzione

Si riproduce esclusivamente asessualmente tramite autospores nel seguente modo: una cellula madre accresce le sue dimensioni e il suo volume. All'interno della sua parete cellulare, il protoplasto si divide, formando in genere 4 o 8 cellule figlie, chiamate autospores (talvolta descritte come cellule di tipo "otto-autospore"). Le autospores vengono rilasciate attraverso la rottura della parete della cellula madre (Machado e Soares, 2024).

In condizioni ottimali, *R. subcapitata* mostra una crescita esponenziale, con tempi di raddoppio della popolazione (*generation time*) molto brevi. La riproduzione è favorita in terreni di coltura specifici (come OECD o US-EPA) che forniscono nutrienti essenziali, in particolare il fosforo sotto forma di fosfato (Krienitz et al. 2011; Krienitz e Bock 2012).

1.2.2.5. *Raphidocelis subcapitata* in ecotossicologia

La crescita delle microalghe in coltura dipende dalle condizioni ambientali (si include la composizione chimica del mezzo di crescita) ed è costituita da tre fasi: una fase di ritardo, una fase di crescita esponenziale, una fase di declino e una fase di morte (Fogg et.al; 1987).

I saggi ecotossicologici condotti sulle microalghe possono essere utilizzati per studiare gli effetti inibitori della crescita di sostanze tossiche (Payne, 1979).

Dagli anni '70 ad oggi si è lavorato per ottenere risultati sempre più riproducibili e rappresentativi. Già nel 1977 il ceppo *S. capricornutum* è l'alga di prova più utilizzata per i saggi (Hindak, 1977), sebbene la rilevanza ambientale dei risultati dei test sulle alghe sia stata messa in discussione da alcuni autori, i quali affermano che la sensibilità di questi organismi sia generalmente bassa e che ci sia una scarsa corrispondenza tra i risultati dei test di tossicità algale con la risposta ambientale. In seguito, sono stati intrapresi sviluppi di nuovi metodi che hanno permesso di affermare una rilevanza consistente dei test di tossicità condotti con le microalghe (Lewis, 1990). Ad oggi rappresentano un tassello importante nella valutazione del rischio di sostanze tossiche (Kenaga, 1981): quest'alga è considerata un modello di riferimento mondiale dal punto di vista sperimentale per valutare la tossicità delle sostanze chimiche e la qualità dell'acqua (Machado e Soares, 2024). Nello studio condotto da Weyers e Vollmer pubblicato nel 2000, emerge che questi test siano i più sensibili tra i "base-set" che includono anche i test di tossicità acuta sui crostacei (*Daphniae*) e pesci (Weyers e Vollmer, 2000).

1.2.3. IL BATTERIO BIOLUMINESCENTE APPARTENENTE ALLA SPECIE *VIBRIO FISCHERI*

1.2.3.1. Inquadramento tassonomico e morfologia

Vibrio fischeri (Beijerinck, 1889) è un proteobatterio Gram-negativo descritto per la prima volta alla fine del 1800.

Per studiarne la morfologia si ricorre all'utilizzo del microscopio (microscopia diretta in campo scuro) in modo da identificarne la forma. Viene descritto con una morfologia "a bastoncello" e con flagelli utilizzati per la motilità (Urbanczyk et. al; 2007). Al microscopio si osserva nella colorazione di contrasto rosa, in quanto non trattiene il suo colore primario, facendo parte dei batteri Gram-negativi e possedendo uno strato di peptidoglicano più sottile rispetto ai Gram-positivi (Dunn, 2012).

1.2.3.2. La bioluminescenza naturale del batterio

Si tratta di un microorganismo marino bioluminescente (*Figura n° 3*). Si può coltivare facilmente in laboratorio (Dunn, 2012), pertanto alcuni ricercatori, studiandolo su piastre di crescita e notando per la prima volta la loro capacità di produrre luce, negli anni '70-'80 hanno scoperto un fenomeno batterico oggi diffuso e noto come *quorum sensing* (Septer e Visik, 2024).

I primi studi sui meccanismi alla base delle interazioni ospite-microbo, invece, sono iniziati negli anni '90. In particolare, sulla relazione mutualistica tra *V. fischeri* e il calamaro *Bobtail Hawaiiano E. scolopes* (Bongrand et. al; 2020), uno studio ha dimostrato che i batteri si stabiliscono nell'organo

luminoso del calamaro. Ad oggi questo batterio è noto per la sua capacità di entrare in simbiosi anche con altri organismi come alcune specie di pesci (Dunn, 2012).

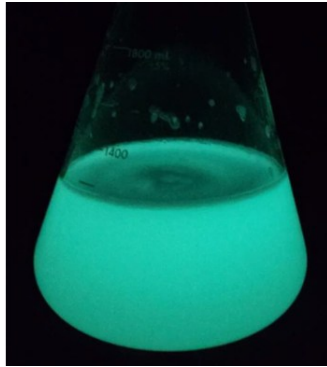


Figura n° 3: la luminescenza blu-verde prodotta dal batterio *Vibrio Fischeri* (Septer e Visik, 2024).

1.2.3.3. Habitat

Vive liberamente in oceano in quantità molto basse, quasi non rilevabili (Holt, 1994; Madigan e Martinko, 2005) e predilige acque temperate e subtropicali. Come già accennato, vive anche in simbiosi con altri organismi e in questo caso la sua concentrazione risulta più elevata (Dunn, 2012).

1.2.3.4. Alimentazione

Si tratta di un organismo eterotrofo, si nutre di sostanze organiche presenti in acqua (Holt, 1994; Madigan e Martinko, 2005).

1.2.3.5. Riproduzione

I batteri del genere *Vibrio* si riproducono attraverso la scissione binaria: l'organismo adulto in condizioni ambientali favorevoli inizia ad allungarsi mentre il DNA viene replicato e in seguito avviene la divisione per formare le cellule figlie che raggiungeranno le dimensioni della cellula madre permettendo al ciclo di ripartire (Lippi e Gotuzzo, 2013; Harris et.al; 2012; Echazarreta e Klose, 2019; Cooper, 2001).

1.2.3.6. *Vibrio fischeri* in ecotossicologia

I saggi ecotossicologici che utilizzano il batterio *Vibrio fischeri* sfruttano la bioluminescenza naturale del batterio, valutando la sua inibizione in seguito all'esposizione al contaminante. È ampiamente impiegato per monitorare la tossicità grazie a numerosi vantaggi tra i quali (Abbas et.al; 2018): breve durata del test, sensibilità dell'organismo ottimale, facilità operativa, affidabilità, riproducibilità, basso costo rispetto ai saggi condotti con organismi più complessi (Chen et al., 2017; Gu et al., 2004).

Può essere applicato a molti tipi di matrici: composti organici e inorganici, metalli, acque reflue, acque fluviali, fanghi delle acque reflue, erbicidi, acque reflue trattate, terreni, sedimenti etc.

È dimostrato che, in termini di versatilità, i saggi con *Vibrio fischeri* sono migliorati progressivamente; tuttavia, sono numerosi gli studi che riportano un'inefficienza per la misurazione di alcune classi di sostanze chimiche, come gli antibiotici (Ferrari et.al; 2004) e le micotossine (Sarter et.al; 2008).

1.3. L'INQUINAMENTO DELLE ACQUE

L'inquinamento delle acque è così definito: “*qualsiasi alterazione della qualità chimica, fisica, biologica o microbiologica dell'acqua che provoca un deprezzamento inaccettabile ai fini degli usi normali o della conservazione dell'ambiente*” (APAT, 71/2006).

Le tre principali categorie di inquinamento sono (APAT, 71/2006):

- Chimico: è associato all'immissione di sostanze organiche e inorganiche nell'acqua e alla contaminazione di metalli pesanti (contaminanti tossici e persistenti).

L'effetto viene esercitato sulla matrice ambientale, la quale subisce un cambiamento delle sue caratteristiche che non la rende più efficiente a supportare l'ecosistema. Ad esempio: la trasformazione di mercurio inorganico in derivati metilici ad opera di organismi anaerobici, riduce la qualità dell'acqua, dal momento in cui questi composti sono altamente tossici.

- Biologico: è provocato dall'immissione in acqua di composti che rallentano o inibiscono lo sviluppo delle specie che intervengono nei processi di autodepurazione. L'effetto in questo caso si intende come un cambiamento della comunità microbica in primis e dei taxa superiori di conseguenza.

In questo tipo di inquinamento si può menzionare il fenomeno dell'*eutrofizzazione*³ che rende la vita acquatica impossibile a causa di un'importante diminuzione dei livelli di ossigeno.

- Microbiologico: si fa riferimento all'alterazione dovuta a tutti gli agenti di malattie (batteri, virus, protozoi e vermi parassitari) che si trovano principalmente nei sistemi fognari.

1.3.1. GLI INQUINANTI PERSISTENTI E IL LORO BIOACCUMULO

Le acque, e di conseguenza gli ecosistemi, possono subire alterazioni anche a causa di altri composti come oli e grassi (*contaminanti convenzionali*) e dei *contaminanti emergenti*, ovvero farmaci, prodotti cosmetici, detersivi per la casa, prodotti schiumogeni, etc (Xu, et. al.,2022). Tra questi, i primi ad

³ L'aumento di nutrienti (azoto e fosforo) nelle acque, è un fatto naturale ma spesso viene favorito dalle attività umane, come l'agricoltura (fertilizzanti). Questo provoca una crescita smisurata di fitoplancton e di alghe che possono produrre composti chimici altamente tossici per la vita acquatica; inoltre, vi è una riduzione della trasmissione della luce. Di conseguenza, gli unici batteri a rimanere attivi sono quelli anaerobici, in quanto quelli aerobici rimasti, esauriscono ulteriormente i livelli di ossigeno (APAT, 71/2006).

essere evidenziati, a partire dagli anni '60 del secolo, scorso sono i distruttori ormonali (Canesi et.al; 2008).

In generale questi contaminanti si diffondono nelle acque attraverso scarichi dei liquami domestici (APAT 71/2006), fabbriche farmaceutiche, sistemi di allevamento degli animali, acquacoltura e ospedali (Xie et.al; 2019). Vengono emessi quotidianamente e per questo rappresentano un rischio non trascurabile per l'ecosistema e di conseguenza per la salute dell'uomo (Mushtaq et al., 2020).

Queste sostanze spesso non vengono rilevate nei monitoraggi ambientali routinari, forse perché nella legislazione ambientale non sono contemplate (OECD, 2019; Santos et al., 2010). A tal proposito, i programmi di monitoraggio chimico attuali della WFD (*Water Framework Directive*) si basano esclusivamente su un elenco di sostanze chimiche, definito attraverso valutazioni di rischio semplificate basate su dati di monitoraggio e modelli di diffusione (sostanze prioritarie, inquinanti specifici del bacino idrografico) (Mancini et.al; 2020).

Sono definiti inoltre “*contaminanti persistenti*” in quanto non vengono completamente rimossi dai processi di depurazione delle acque (Montes-Grajales et al., 2017). La loro persistenza dipende in primo luogo dalla presenza di comunità microbiche in grado di effettuare o meno il processo della degradazione e in secondo luogo dalle condizioni abiotiche, che possono essere il pH, la temperatura e altri fattori ambientali. Sebbene i produttori assicurino la biodegradabilità del prodotto, a seguito di test di laboratorio, una volta a contatto con corpi idrici, sedimenti e suolo, possono avere tempi di degradazione differenti, proprio per le condizioni ambientali (Mancini et.al; 2020).

Possono inoltre accumularsi negli organismi, che non sempre riescono a metabolizzarli o chelarli, e reagendo con altri composti, possono essere trasformati in sostanze potenzialmente più tossiche (Leusch et al., 2019; Wilkinson et al., 2017).

Il fenomeno secondo cui un organismo accumula composti presenti nell'acqua è definito *bioconcentrazione o bioaccumulo* (Xie et.al; 2019).

Per quantificare il bioaccumulo si considerano tre parametri:

- 1) Il fattore di bioconcentrazione (BCF): si può misurare solo in laboratorio perché si riferisce al processo di assorbimento attraverso le superfici dermiche e respiratorie (Arnot e Gobas, 2006).
- 2) Il fattore di bioingrandimento (BMF): rappresenta la conseguenza della biomagnificazione⁴. Alcuni autori nel 2017 hanno affermato che un BFM > 1 suggerisce l'aumento della concentrazione del tossico dai livelli trofici inferiori a superiori (Peng et al., 2017).

⁴ Con il termine “*biomagnificazione*” si intende il processo che descrive l'accumulo dei contaminanti e il loro trasferimento a livelli trofici successivi: nel predatore all'apice si osservano gli effetti dell'inquinante (Wang et al., 2021).

- 3) Il fattore di bioaccumulo (BAF), rappresenta tutte le vie di esposizione compresa quella dietetica (Jyoti e Sinha, 2023).

1.3.2. I PRODOTTI DI CONSUMO PER LA CASA COME INQUINANTI EMERGENTI

Tra i prodotti utilizzati maggiormente nelle case, sicuramente emergono PPCPs⁵ (Daughton e Ternes 1999) che comprendono farmaci, fragranze, disinfettanti, saponi, shampoo e altri prodotti chimici (Cizmas et al., 2015; Gros et al., 2010) e HCPs che racchiudono prodotti per la cura della casa come detersivi per il bucato, detersivi e gel per i piatti, dentifrici, collutori, insetticidi e vari detergenti multiuso (Trantallidi et al., 2015).

Parlando nello specifico dei detersivi per il bucato, questi sono una miscela di materie prime formulata che può essere classificata in base alle proprietà e alle funzioni del prodotto finale.

Solitamente in una formulazione, si ha sempre uno o più ingredienti attivi, ovvero composti che forniscono direttamente l'effetto desiderato e ingredienti coadiuvanti, responsabili delle caratteristiche fisiche del prodotto (ad esempio: emollienti, tensioattivi, emulsionanti e conservanti) (Porretti, 2023/2024).

Pertanto, tra le materie prime si menzionano appunto: tensioattivi, agenti sbiancanti ed enzimi (Bajpai e Tyagi, 2007). I tensioattivi in particolare costituiscono circa il 15%-40% di tutti i composti detersivi e rappresentano il gruppo di composti più tossico, seguito dagli sbiancanti (Warne e Schifko, 1999). Dal 2021 inoltre rientrano tra le sostanze tossiche per la vita acquatica (Salmani et al., 2021).

I risultati di uno studio condotto su crostacei cladoceri d'acqua dolce - *in cui si è valutata la tossicità dei componenti detersivi per il bucato* - dimostrano che le componenti più tossiche dei detersivi ⁶, essendo presenti a basse concentrazioni, contribuiscono in minima parte alla tossicità del prodotto.

La maggior parte delle ricerche condotte, inoltre, non consentono di affermare conseguenze più o meno rilevanti riguardo la tossicità associata a miscele e alle formulazioni commerciali (Warne e Schifko, 1999).

⁵ Nonostante la loro concentrazione nelle acque sia relativamente bassa (da ng/L a ug/L) (Jyoti e Sinha, 2023) risultano essere presenti (Jianchao et al., 2020; Luo et al., 2017; Macedo et al., 2017; Morales et al., 2018; Parolini et al., 2015; Rilievo et al., 2021), in vari organismi acquatici compresi plancton, pesci e invertebrati acquatici (Chavoshani et al., 2020).

⁶ In questo studio le componenti dei detersivi per il bucato più tossiche sono le seguenti: tensioattivi, sbiancanti, sodio carbossimetilcellulosa, soluzione di silicato di sodio, sbiancanti, perborato di sodio tetraidrato commerciali (Warne e Schifko, 1999).

Due lavori pubblicati in letteratura hanno dimostrato due risposte differenti da parte degli organismi acquatici in base al tipo di tensioattivo presente negli HCPs (Gray et.al; 2022):

- I tensioattivi anionici⁷ inducono una risposta infiammatoria e uno stress ossidativo (Renaud et al., 2014; Susmi et al., 2010)
- I tensioattivi cationici⁸ interagiscono con il sistema endocrino degli organismi acquatici (Korner et al., 1998).

1.3.2.1. LA DIFFUSIONE DEI DETERSIVI “ECO-FRIENDLY”

Il classico detersivo per il bucato è sempre stato un solido in polvere o granulare; in seguito, con il passare degli anni, l'utilizzo della formulazione liquida è aumentato sempre di più e al giorno d'oggi prevale sulla prima (Bajpai e Tyagi, 2007).

Negli ultimi anni è crescente la produzione e vendita di formulazioni alternative ai prodotti convenzionali, al fine di ridurre gli impatti derivanti da produzione e smaltimento. Queste alternative sono definite “*prodotti green*” e utilizzano la “*chimica verde*”: progettare formulazioni le cui componenti, al termine della loro funzionalità progettata, si scompongano in innocui prodotti di degradazione, le cui sostanze pericolose sono ridotte e/o eliminate (Gray et.al; 2022).

“*Eco-friendly*” è il termine con cui si commercializzano questi prodotti, ma un *claim* commerciale da solo non può sostituirsi all'indagine scientifica. Ad esempio, in uno studio sperimentale (Gray et.al; 2022) si conclude che quanto sostenuto dai produttori – *le formulazioni verdi sono meno tossici e più degradabili* -, non sono sovrapponibili con i risultati emersi, dando fondamento allo scetticismo dei consumatori circa le affermazioni riportate in etichetta. Tuttavia, per comprendere maggiormente le interazioni tra i composti presenti all'interno di queste formulazioni bisognerebbe approfondire la ricerca con ulteriori lavori.

L'autore D. Gray nel 2022 riporta inoltre alcune considerazioni basate su studi meno recenti (2008-2012) che mostrano com'è cambiata nell'arco degli anni l'attenzione dei compratori rispetto a questi prodotti (Gray et.al; 2022). Nel 2018 più del 50% delle persone era disposto a pagare di più per questi prodotti “*green*” (Global Web Index, 2018).

⁷ I tensioattivi anionici dispongono di cariche negative, aumentano il pH e hanno un elevato potere sgrassante e pulente. Tra questi si menziona il *sodio lauril eter solfato* (SLS), il tensioattivo anionico più antico e utilizzato come agente emulsionante. È il componente principale presente in tutte le formulazioni commerciali. La sua concentrazione varia dall'1% al 30% nei prodotti per la pulizia e dallo 0,01% al 50% nei prodotti cosmetici (Jyoti e Sinha, 2023).

⁸ I tensioattivi cationici dispongono di cariche positive e vengono utilizzati nella formulazione di balsami (Porretti, 2023/2024).

2. SCOPO DEL LAVORO

2.2. AZIENDA OSPITANTE: LABANALYSIS ENVIRONMENTAL SCIENCE

Il lavoro descritto in questa tesi è stato svolto presso il laboratorio di microbiologia ambientale ed ecotossicologia dell'azienda *LABANALYSIS ENVIRONMENTAL SCIENCE SRL*, sede Casanova Lonati (PV).

LabAnalysis è un gruppo di aziende specializzate in analisi chimiche che nasce nel 1976 da due studenti universitari ai quali si aggiunge un terzo che in seguito diventa il primo dipendente e attuale Responsabile HSE.

Nel corso degli anni le conoscenze e le competenze si sono ampliate ai settori delle analisi alimentari, agli studi per la registrazione dei prodotti, alla consulenza per la salute, alla sicurezza dei lavoratori e ai test per cosmesi e beni di consumo.

2.3. OBIETTIVO

Lo scopo di questo studio è stato effettuare un'analisi sperimentale di laboratorio per valutare la sensibilità di tre organismi modello ad alcuni detersivi per lavatrice. In questa valutazione, i crostacei cladoceri della specie *Daphnia magna*, l'alga unicellulare della specie *Raphidocelis subcapitata* e i batteri bioluminescenti della specie *Vibrio fischeri* sono stati utilizzati per condurre test di tossicità acuta, con lo scopo di verificare se l'etichetta presente nei prodotti "bio" (*Winni's*, *Green Emotion* e *Biophura*) sia realmente rappresentativa della tossicità dei detersivi.

La determinazione dell' EC_{50} è avvenuta in modo diverso per ognuno dei tre organismi:

- È stata valutata l'immobilità di *Daphnia magna* dopo 24h di esposizione alle sostanze (APAT CNR IRSA 8020 Man 29 2003).
- È stata valutata l'inibizione della crescita di *Raphidocelis subcapitata* dopo 72 h di esposizione ai detersivi (ISO 8692:2012).
- È stata valutata l'inibizione della bioluminescenza di *Vibrio fischeri* dopo trenta minuti dall'esposizione ai prodotti (APAT CNR IRSA 8030 Man 29 2003).

2.4. DETERSIVI SCELTI PER QUESTO STUDIO

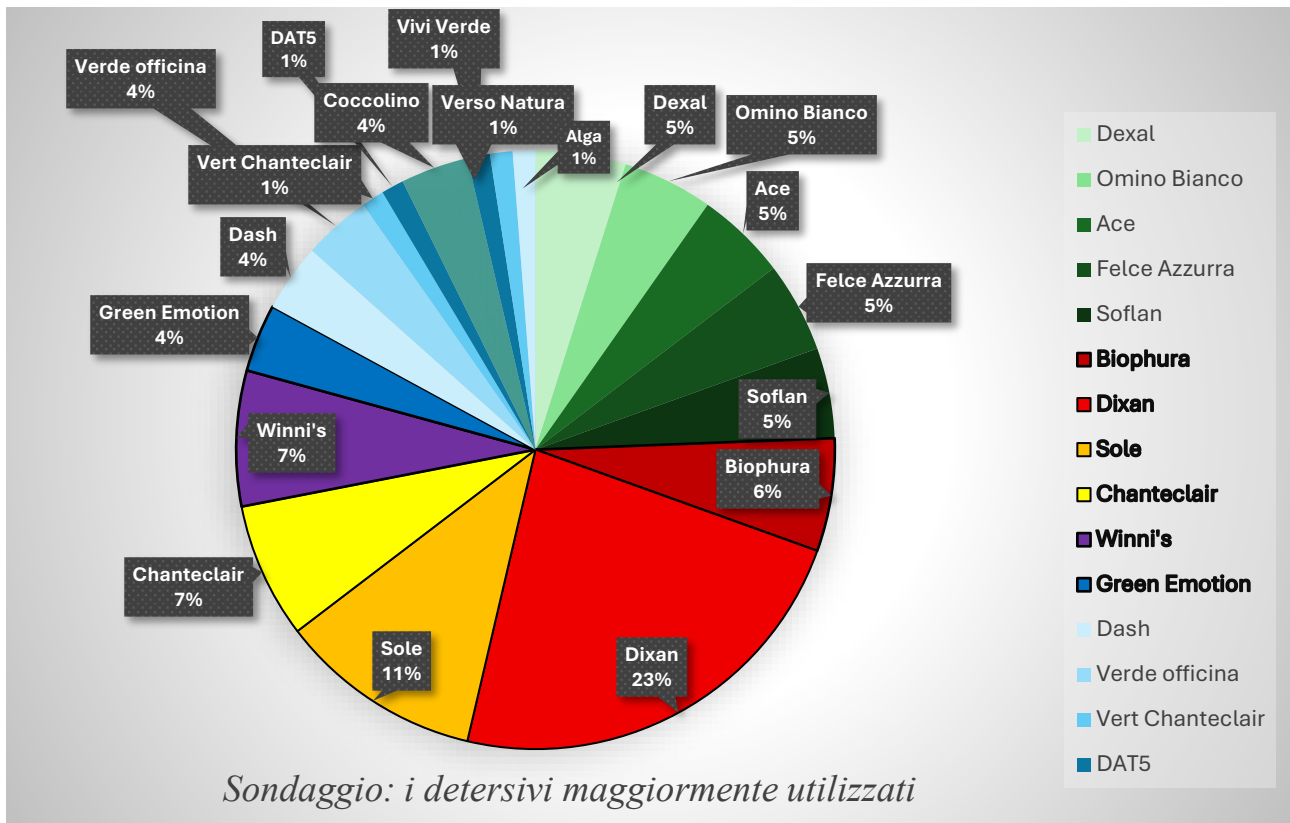


Grafico n° 3: grafico a torta che mostra le % di utilizzo dei detersivi che, dall'indagine effettuata, risultano essere maggiormente utilizzati. I detersivi scelti per condurre l'esperimento sono riportati in legenda e contrassegnati con carattere in grassetto.

La scelta dei detersivi utilizzati in questo lavoro di tesi è frutto di un sondaggio su un campione di 72 persone al fine di individuare i tre detersivi tradizionali più comunemente utilizzati. Sulla base dei risultati di questa indagine è emerso che la maggior parte delle persone utilizza i detersivi riportati nel *Grafico n° 3*.

Dixan, Sole e Chanteclair, risultano i prodotti tradizionali più acquistati; pertanto, sono stati scelti per il lavoro di tesi e sono stati comparati con altri tre detersivi emersi nel sondaggio, sicuramente meno conosciuti rispetto ai precedenti, ma con un'indicazione importante in etichetta, ovvero la dicitura "bio/green": *Winni's, Green Emotion e Biophura*.

Le etichette su tutti i prodotti verdi indicano chiaramente che sono commercializzati come alternativa *eco-friendly*, aspetto evidenziato anche dal *packaging* (alcuni avevano foglie, fiori o piante sulla loro etichetta e molti includevano i termini "Earth" "Green" "Bio" "VeganoOk" direttamente nel nome del prodotto); altri includevano affermazioni comuni come "Prodotto ecocompatibile in base alla presenza di componenti facilmente biodegradabili" "detergente eco-biocompatibile" (*Figure n° 4, 5 e 6*).



Figura n° 4: etichetta del detersivo *Biophura*.



Figura n° 5: etichetta del detersivo *Winni's*.



Figura n° 6: etichetta del detersivo *Green Emotion*.

Si considera come campione di partenza la dose consigliata dal produttore utilizzabile per il bucato a mano (tabella n° 1).

Detersivo	Concentrazioni di partenza espresse in mg/L
Dixan	2500 mg/L
Sole	8000 mg/L
Chanteclair	5500 mg/L
Winni's	3700 mg/L
Green Emotion	3500 mg/L
Biophura	5000 mg/L

Tabella n° 1: dose del detersivo consigliata dal produttore, divenuta il “*tal quale*” di partenza per tutte le diluizioni.

3. MATERIALI E METODI

3.1. MATERIALI

I materiali utilizzati in laboratorio rientrano nella normale attrezzatura. Il seguente elenco racchiude la strumentazione comune utilizzata per tutti i test:

- Autoclave per la sterilizzazione
- pHmetro
- Ossimetro (misuratore di ossigeno disciolto)
- Bilancia tecnica e analitica
- Micropipette a volume variabile da 10 a 200 μL e da 200 a 1000 μL con adeguati puntali
- Pipette sierologiche monouso da 2 ml, 10 ml, 25 ml

3.2. MATERIALI E METODI PER LA VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ CON IL CROSTACEO *DAPHNIA MAGNA*

3.2.1. Materiali utilizzati per i test condotti su *Daphnia magna*:

- Becker in vetro con volume di 30 ml, 50 ml, 100 ml, 1000 ml
- Incubatore a temperatura controllata ($22\pm 2^\circ\text{C}$) con sistema di illuminazione continua (6000 lux) per gli allevamenti
- Incubatore a temperatura controllata ad illuminazione alterna, per poter svolgere il saggio in condizioni di luce (16 ore a 300 lux) e di buio (8 ore)
- Frigo termostato per la conservazione delle soluzioni madre

3.2.2. Acque di allevamento e di diluizione

L'acqua utilizzata per l'allevamento è stata preparata a partire da 1 litro di acqua distillata. Alla fine, deve presentare i seguenti parametri:

- pH compreso tra 6 e 9 (la variazione non dovrebbe essere maggiore di 1,5 unità)
- temperatura compresa tra 18°C e 22°C
- durezza dell'acqua compresa tra 140 e 250 mg/L espressa come CaCO_3
- concentrazione di ossigeno disciolto superiore a 6 mg/L

Per la preparazione di 1 litro di terreno di coltura, a 900 ml di acqua distillata sono stati aggiunti i seguenti volumi di soluzione madre, ottenuti pesando i vari sali:

Soluzioni madre	Concentrazioni delle componenti delle soluzioni madre espresse in g/L	Volume delle soluzioni madre espressi in ml/L
Soluzione 1		25 ml/L
Cloruro di calcio	11,76 g/L	
Soluzione 2		25 ml/L
Solfato di magnesio	4,93 g/L	
Soluzione 3		25 ml/L
Bicarbonato di sodio	2,59 g/L	
Soluzione 4		25 ml/L
Cloruro di potassio	0,23 g/L	

Tabella n° 2: pesate dei vari sali (g/L) che compongono le quattro soluzioni madre (denominate 1, 2, 3 e 4) con i corrispondenti volumi aggiunti per ottenere il terreno di coltura per il mantenimento di *Daphnia magna*.

3.2.3. Organismo sottoposto al saggio: *Daphnia magna*

Per i test sono stati utilizzati crostacei cladoceri appartenenti alla specie *Daphnia magna*, almeno di terza generazione (per ridurre la variabilità), ottenuta per partenogenesi in condizioni di allevamento definite, con meno di 24 h di vita.

Tutti gli organismi utilizzati per una prova provenivano da colture derivanti dalla stessa popolazione di *Daphnie* sana (senza segni di stress, come un alto tasso di mortalità, presenza di maschi, formazione di efippi, scolorazione etc...).

I neonati sottoposti ai test vengono mantenuti a digiuno, mentre agli individui in allevamento viene somministrata quotidianamente in sospensione la seguente dieta per il mantenimento in coltura: un'alga verde *Raphidocelis subcapitata* e un lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Il mezzo di coltura viene cambiato due volte a settimana.

Inoltre, sono state mantenute contemporaneamente due vasche: in una sono stati isolati gli adulti in fase riproduttiva per partenogenesi (riconoscibili per le dimensioni e la presenza delle uova) nell'altra i nuovi nati sottoposti ai test di tossicità acuta.

3.3.4. METODO APAT CNR IRSA 8020 MAN 29 2003 - Valutazione della tossicità con *Daphnia magna*

Il saggio permette di calcolare l'EC₅₀, ovvero la concentrazione di prodotto che causa l'immobilità nel 50% degli organismi esposti.

Come già descritto nel capitolo precedente (“scopo del lavoro”) come campioni di partenza si è scelto di considerare la dose di detersivo consigliata dal produttore, in quanto sottoporre gli organismi ad un “*tal quale*” non diluito non avrebbe restituito nessun'informazione utile, esclusa la morte immediata.

Sia i test di prova che quelli definitivi sono stati effettuati in triplo e con un controllo per ogni diluizione, che conteneva soluzione di coltura, in modo da monitorare lo stato di buona salute dell'animale.

Per calcolare approssimativamente la tossicità dei singoli detersivi, inizialmente sono stati condotti dei test preliminari che hanno permesso di trovare il range di concentrazioni all'interno del quale rientrano lo 0% e il 100% di immobilizzazione.

In seguito, sono stati svolti i test definitivi che hanno permesso di costruire la retta che descrive la relazione dose/risposta e ricavare così l'EC₅₀, ottenuto con il programma di calcolo *BMD5 Analysis*. Per i saggi sono stati utilizzati neonati esposti a diverse concentrazioni delle sostanze. L'alimentazione degli individui è stata sospesa per tutta la durata dei test.

Ciascuna diluizione è stata testata in triplo, in ogni replica sono state trasferite 10 *daphniae*, portate in seguito nell'incubatore per essere sottoposte a condizioni di luce alterne (16 h 300 lux) e di buio (8 h), a temperatura costante (22 ± 2° C). Dopo 24 h è stato valutato il numero di animali sopravvissuti a contatto con le soluzioni.

3.3. MATERIALI E METODI DI VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ CON ALGA *RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA*

3.3.1. Materiali utilizzati per i test condotti su *Raphidocelis subcapitata*:

- Microscopio ottico
- Camera di Burker
- Cuvette con volume 25 mL usa e getta
- Spettrofotometro in grado di leggere una lunghezza d'onda pari a 670 nm
- Beute in vetro con volume 100 mL per l'allevamento

3.3.2. Condizioni di crescita

I parametri per il mantenimento dell'allevamento sono i seguenti:

- Temperatura $23 \pm 2^\circ \text{C}$
- Intensità luminosa 6000 lux.
- Conducibilità inferiore a $5 \mu\text{s/cm}$
- pH del terreno messo in equilibrio con l'aria: 8
- Agitazione costante

3.3.3. Parametri per condurre i test

I parametri per condurre i saggi sono i seguenti:

- Temperatura $23 \pm 2^\circ \text{C}$
- intensità luminosa 10000 lux
- Conducibilità inferiore a $5 \mu\text{s/cm}$
- pH del terreno: 8 (la variazione non dovrebbe essere maggiore di 1,5 unità)
- Agitazione costante

Per la preparazione del terreno di coltura, nonché dell'acqua utilizzata per le diluizioni è impiegata acqua distillata e sottoposta a sterilizzazione, con l'aggiunta di opportuni Sali (ISO 8692:2012) (Tabella n° 3).

Soluzioni madre	Concentrazioni delle componenti delle soluzioni madre espresse in g/L	Volume delle soluzioni madre espressi in ml/L
Soluzione A		10 ml/L
NH₄Cl	1,5 g/L	
MgCl₂.6H₂O	1,2 g/L	
CaCl₂	1,3 g/L	
MgSO₄.7H₂O	1,5 g/L	
KH₂PO₄	0,16 g/L	
Soluzione B		1 ml/L
FeCl₃.6H₂O	0,08 g/L	
Na₂EDTA.2H₂O	0,1 g/L	
Soluzione C		1 ml/L
H₃BO₃	1,850 g/L	
MnCl₂.4H₂O	4,150 g/L	
ZnCl₂	0,03 g/L	
CoCl₂.6H₂O	0,015 g/L	
CuCl₂.2H₂O	0,001 g/L	
Na₂MoO₄.2H₂O	0,07 g/L	
Soluzione D		1 ml/L
NaHCO₃	50 g/L	

Tabella n° 3: pesate dei vari ingredienti (g/L) che compongono le quattro soluzioni madre (denominate A, B, C e D) con i corrispondenti volumi aggiunti ad 1 l di acqua distillata per ottenere il terreno di coltura con i nutrienti necessari al mantenimento di *Raphidocelis subcapitata*.

3.3.4. Organismo sottoposto al saggio: *Raphidocelis subcapitata*

Anche in questo caso è stata utilizzata una specie proveniente da allevamento in condizioni definite: l'alga unicellulare *Raphidocelis subcapitata*.

La crescita esponenziale della nuova coltura è garantita partendo da una concentrazione di 10^4 cell/mL, che si è ottenuta dopo 72 ore di incubazione e valutando la densità cellulare mediante conta diretta utilizzando un microscopio con *camera di Burker*. Questa ha uno spessore di 0,1 mm ed è costituita da un reticolo contenente nove quadrati grandi, ognuno dei quali ha una superficie di 1 mm², a loro volta sono suddivisi in sedici quadrati più piccoli con superficie 1/25 mm² (*figura n° 7*).

Per la conta (*figura n° 8*), dopo aver inserito una goccia di sospensione algale tra la camera e il vetrino coprioggetto (10 μ l), si conta il numero di alghe presenti in un numero rappresentativo di quadrati piccoli (*figura n° 9*).

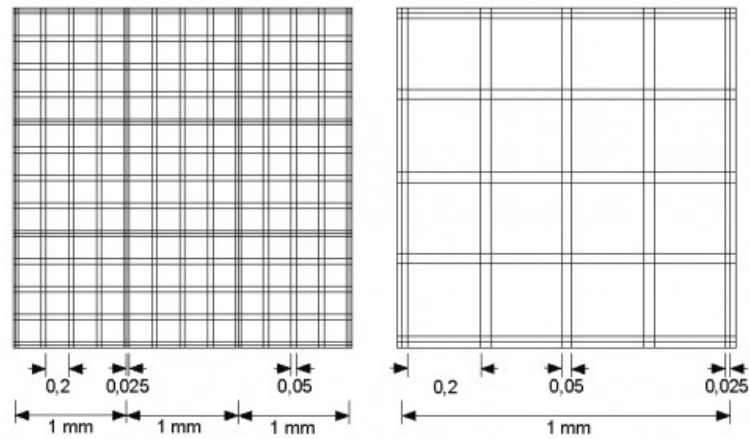


Figura n° 7: camera di Burkler a sinistra e sezione di 1 mm a destra.

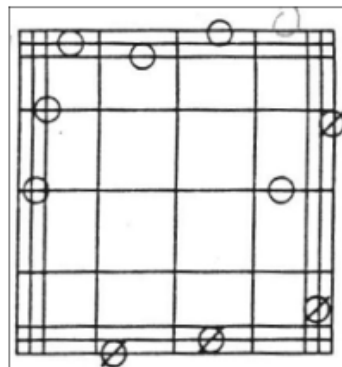


Figura n° 8: schema di un quadrato piccolo della camera di Burkler che mostra quali alghe vengono considerate nella conta.



Figura n° 9: la figura mostra la vista al microscopio delle alghe che si è potuto osservare in alcune delle celle che compongono la Camera di Burker.

Quadrato camera di Burker	Numero di alghe
1	5
2	7
3	4
4	7
5	5
6	7
7	9

Tabella n° 4: viene riportato il numero di alghe contate in sette quadrati diversi della camera di Burker.

La media aritmetica delle alghe contate in ogni quadrato (*Tabella n° 4*) è stata utilizzata nel seguente calcolo per convertire il risultato da superficie a volume:

$$6,30 \times 25 \times 10 \times 10^3 = 1,58 \times 10^6 \text{ }^9$$

Successivamente sono state fatte sei diluizioni seriali con rapporto 2:1 a partire da questa concentrazione cellulare e successivamente lette le relative assorbanze allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 670 nm (*Tabella n° 5*). L'inserimento di questi valori su Excel ha permesso di ottenere l'equazione che descrive la retta che esprime la correlazione concentrazione algale/assorbanza (*Grafico n° 4*).

Concentrazione (cell/mL)	Assorbanza (ABS)
$8,00 \times 10^5$	0,806
$4,00 \times 10^5$	0,419
$2,00 \times 10^5$	0,214
$1,00 \times 10^5$	0,108
$5,00 \times 10^4$	0,053
$2,50 \times 10^4$	0,025

Tabella n° 5: diluizioni seriali effettuate a partire da $1,58 \times 10^6$ e le corrispondenti assorbanze a 670 nm lette dallo spettrofotometro.

⁹ 6,30: media aritmetica

25: 1 mm²

10: considerando lo spessore della camera di Burker, ovvero 0,1 mm

103: conversione da mm³ a ml

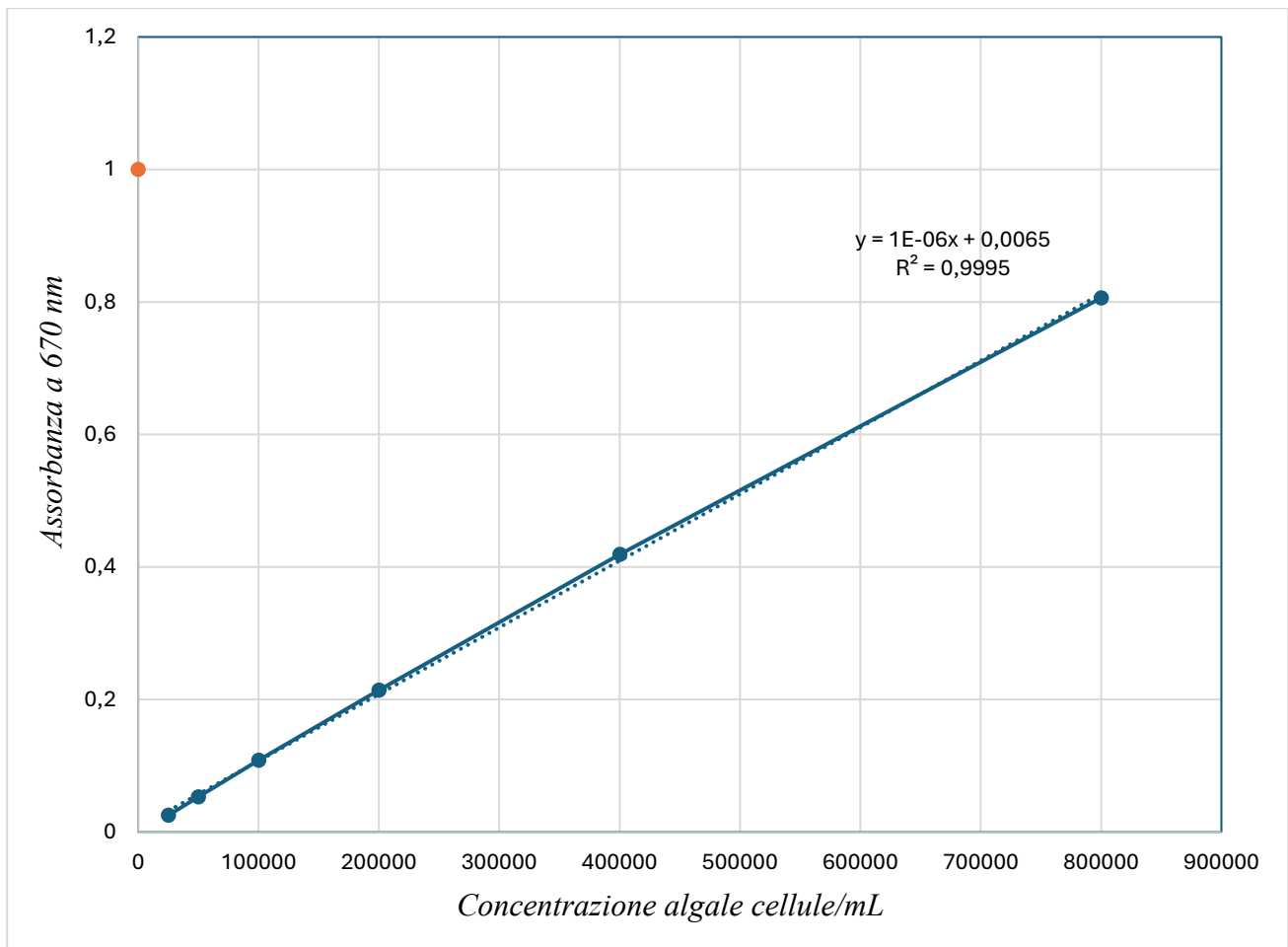


Grafico n° 4: la retta mostra la correlazione tra la concentrazione dell'alga espressa in cellule/mL e la relativa misura dell'assorbanza letta allo spettrofotometro, impostando una lunghezza d'onda pari a 670 nm.

Tramite questa correlazione (concentrazione algale/ assorbanza), è possibile ricavare l'inibizione del tasso di crescita in percentuale del test di tossicità acuta.

Considerando che la concentrazione iniziale deve essere di 10^4 cellule/ml e la sospensione da cui partiamo ha una densità pari a 10^6 cellule/ml, 100 ml di terreno di coltura sono stati inoculati con 1 ml di concentrato algale, per far ripartire una nuova crescita esponenziale e rinfrescare così l'allevamento.

3.3.5. METODO ISO 8692:2012 - Valutazione della tossicità con *Raphidocelis subcapitata*

Il metodo descrive la determinazione dell'inibizione della crescita di alghe verdi unicellulari.

Con questo test si determina l'inibizione della crescita algale rispetto ad una coltura di controllo nell'arco di 72 h. L' EC_{50} è la concentrazione che determina l'inibizione del 50% del tasso di crescita algale.

Anche in questo caso sono state eseguite diluizioni preliminari del campione che hanno permesso di determinare valori più precisi compresi tra un'inibizione della crescita algale pari al 100% e

un'assenza di inibizione. Il test è stato eseguito in cuvette monouso, con cammino ottico pari a 10 cm (*figura n° 10*), in ognuna delle quali si aggiunge un inoculo algale di 0,25 ml (concentrazione di partenza 10^6 cell/ml), avendo cura di prelevare sempre lo stesso volume della sospensione, mantenuta omogenea mediante periodica agitazione. Ogni beuta conterrà un volume finale di 25 ml, di conseguenza la densità algale all'inizio del saggio sarà di 10^4 cellule/ml.

Tutta la procedura sopra descritta viene eseguita in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare. Le cuvette successivamente vengono chiuse parzialmente e poste nell'agitatore termico: rimarranno sotto agitazione continua per 72 h ad un'illuminazione continua pari a 10000 lux.

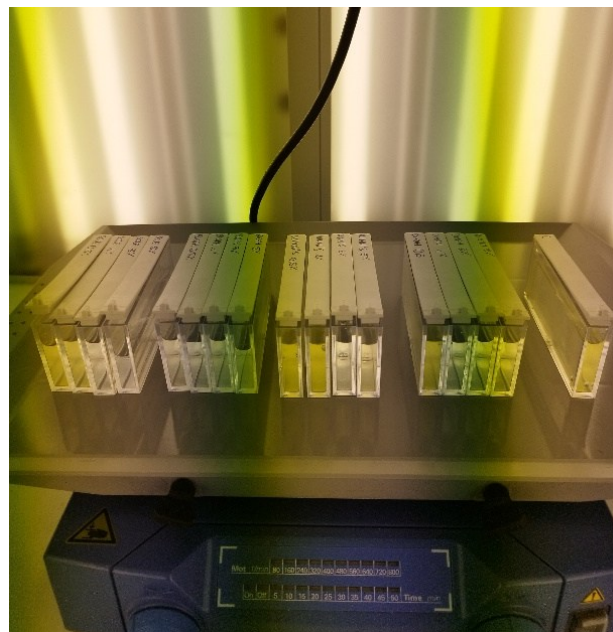


Figura n° 10: incubatore in cui le alghe, esposte a diverse concentrazioni del prodotto tossico, vengono mantenute in agitazione continua per 72 h.

Tre giorni dopo si può osservare se è avvenuta un'inibizione della crescita algale o se invece non si è verificata. A tal fine si utilizza uno spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 670 nm. Dapprima si procede alla lettura del campione controllo che contiene solo soluzione algale, in seguito si procede comparando ciascuna diluizione con il controllo. Lo spettrofotometro restituisce valori che, inseriti nel foglio di calcolo opportuno, permettono di ottenere la funzione che esprime la densità cellulare e la percentuale di inibizione dopo 72 h, indice di un effetto più o meno significativo.

Le percentuali così ottenute si inseriscono nel *software BSDM* per ottenere il valore di EC_{50} e la curva che descrive la relazione tra diluizione del prodotto e percentuale di inibizione.

3.4. MATERIALI E METODI DI VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ CON IL BATTERIO *VIBRIO FISCHERI*

3.4.1. Materiali utilizzati per i test condotti su *Vibrio Fischeri*

- Luminometro in grado di leggere a 490 nm
- Congelatore per la conservazione delle colture batteriche (- 20° C)
- Autoclave per la sterilizzazione
- Misuratore di ossigeno disciolto
- pHmetro
- Bilancia

3.4.2. Parametri per l'esecuzione del saggio

- Temperatura cuvette del saggio: 15±1° C
- Temperatura della fiala contenente il batterio: crioconservata a -20° C
- pH compreso tra 6 e 9

3.4.3. Organismo sottoposto al saggio: il batterio *Vibrio fischeri*

Per quanto riguarda i test eseguiti su *Vibrio fischeri* è stato utilizzato lo strumento *BioLight Toxy* che misura il livello di bioluminescenza naturale di questi batteri. In presenza di contaminanti l'emissione della luce da parte degli organismi diminuisce, il programma elabora il segnale letto e lo esprime in termini di inibizione % rispetto ad un controllo e ad un tempo zero (T₀).

Lo strumento contiene tutto il materiale necessario per l'esecuzione del test: la fiala crioconservata con il batterio, le cuvette di vetro usa e getta, i sali necessari (trattandosi di un organismo che vive in acqua salata) e un software di calcolo per elaborare i risultati.

Il batterio viene schiuso dalla fiala e successivamente inserito nello strumento per quaranta minuti, in modo tale che raggiunga la temperatura ottimale. Trascorso questo tempo, può essere impiegato per vari test di tossicità acuta.

3.4.4. METODO APAT CNR IRSA 8030 MAN 29 2003 - Valutazione della tossicità con *Vibrio fischeri*

Inizialmente, essendo ignota la tossicità dei prodotti da analizzare, si è partiti con procedure preliminari saggiando un intervallo ampio di diluizioni, rispetto a una soluzione di controllo.

Una volta individuato l'ambito di tossicità, si procede con i test definitivi condotti in triplo scegliendo una concentrazione di partenza da cui si partirà per effettuare una serie di diluizioni seriali (1:2).

Si inocula il batterio (100 µl) in ogni cuvetta e si procede alla lettura per ottenere il valore al T₀, successivamente si aggiungono le soluzioni da testare e si procede alla lettura dopo 5, 15 e 30 minuti dall'inizio del contatto. Al termine si può visualizzare il sommario con tutti i valori rilevati dallo strumento e le estrapolazioni che consentono di quantificare l'inibizione della bioluminescenza.

4. CASO STUDIO IN OGGETTO

4.1. PROCEDURA SPERIMENTALE PER I TEST CONDOTTI SU *DAPHNIA MAGNA* E *RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA*

I test preliminari e definitivi con *Daphnia magna* e *Raphidocelis subcapitata* sono stati condotti in triplo. A tal fine, sia le diluizioni dei test preliminari sia quelle dei test definitivi sono state preparate in un volume totale di 100 mL, da cui sono state ricavate 3 repliche da 25 mL, in modo tale da mantenere le medesime condizioni sperimentali in tutte e tre le ripetizioni.

Si è scelto di prendere in considerazione quattro concentrazioni definitive per ogni detersivo. Quindi, dopo aver seguito i metodi descritti precedentemente, si possono osservare in *tabella n° 6 e n° 7* le diluizioni definitive scelte nello specifico per la costruzione della curva da cui si ricava il valore di EC₅₀.

Concentrazioni testate su <i>Daphnia magna</i> (mg/L)						
	DIXAN	SOLE	CHANTECLAIR	WINNI'S	GREEN EMOTION	BIOPHURA
Test 1	5 mg/L	24 mg/L	11 mg/L	74 mg/L	35 mg/L	5 mg/L
Test 2	12,5 mg/L	48 mg/L	22 mg/L	148 mg/L	70 mg/L	10 mg/L
Test 3	20 mg/L	64 mg/L	33 mg/L	222 mg/L	105 mg/L	25 mg/L
Test 4	25 mg/L	80 mg/L	44 mg/L	296 mg/L	140 mg/L	35 mg/L

Tabella n° 6: concentrazioni definitive espresse in mg/L di tutti i detersivi utilizzati per i test acuti con *Daphnia magna*.

Concentrazioni testate su <i>Raphidocelis subcapitata</i> (mg/L)						
	DIXAN	SOLE	CHANTECLAIR	WINNI'S	GREEN EMOTION	BIOPHURA
Test 1	12,5 mg/L	40 mg/L	44 mg/L	18,5 mg/L	105 mg/L	5 mg/L
Test 2	25 mg/L	80 mg/L	55 mg/L	31 mg/L	175 mg/L	15 mg/L
Test 3	75 mg/L	240 mg/L	82,5 mg/L	111 mg/L	210 mg/L	25 mg/L
Test 4	125 mg/L	400 mg/L	110 mg/L	185 mg/L	245 mg/L	50 mg/L

Tabella n° 7: vengono riportate le concentrazioni espresse in mg/L di tutti i detersivi utilizzati per i test acuti definitivi con *Raphidocelis subcapitata*.

4.2. PROCEDURA SPERIMENTALE PER I TEST CONDOTTI SU *VIBRIO FISCHERI*

Per quanto riguarda i test condotti sul batterio *Vibrio fischeri*, ogni concentrazione da cui si è scelto di partire, è stata corretta del fattore “0,819” per prendere in considerazione il volume di soluzione salina aggiunto alla soluzione di partenza; in seguito, si è ottenuta quindi la concentrazione esatta.

I test definitivi, condotti sulla base di quelli preliminari, si possono osservare nella *tabella n° 8*.

Concentrazioni testate su <i>Vibrio fischeri</i> (mg/L)						
	DIXAN	SOLE	CHANTECLAIR	WINNI'S	GREEN EMOTION	BIOPHURA
Sample 1	3,84 mg/L	40,95 mg/L	2,82 mg/L	15,15 mg/L	3,58 mg/L	7,68 mg/L
Sample 2	7,68 mg/L	81,90 mg/L	5,63 mg/L	30,30 mg/L	7,17 mg/L	15,36 mg/L
Sample 3	15,36 mg/L	163,80 mg/L	11,26 mg/L	60,61 mg/L	14,33 mg/L	30,71 mg/L
Sample 4	30,71 mg/L	327,60 mg/L	22,52 mg/L	121,21 mg/L	28,67 mg/L	61,42 mg/L
Sample 5	/	/	45,04 mg/L	/	57,33 mg/L	/
Sample 6	/	/	90,09 mg/L	/	114,66 mg/L	/

Tabella n° 8: vengono riportate le concentrazioni espresse in mg/L di tutti i detersivi utilizzati per i test acuti definitivi con *Vibrio fischeri*. In grassetto le concentrazioni di partenza. I valori delle concentrazioni definitive da cui si è partiti per condurre i test su *Dixan*, *Sole*, *Winni's* e *Biophura*, sono indicati in “*Sample 4*”. Per quanto concerne, invece, i prodotti *Chanteclair* e *Green Emotion*, si è scelto di prendere in considerazione sei diluizioni. Pertanto, le concentrazioni di partenza sono indicate in “*Sample 6*”.

5. RISULTATI

5.1. RISULTATI TEST CONDOTTI SUL CROSTACEO *DAPHNIA MAGNA*

Le linee guida prevedono che le percentuali di immobilità registrate tra gli individui, vengano messe in relazione con le concentrazioni di esposizione, così da poter elaborare i risultati utilizzando il software *BSDM Analysis* e ricavare successivamente il valore che determina l'immobilità della metà degli organismi esposti al tossico (EC_{50}).

Il numero di individui ancora attivi in ciascun *becker* dopo 24 h di esposizione (*Figura n° 11*) in funzione della concentrazione dei sei detersivi presi in considerazione, è riportato nelle tabelle inserite successivamente.

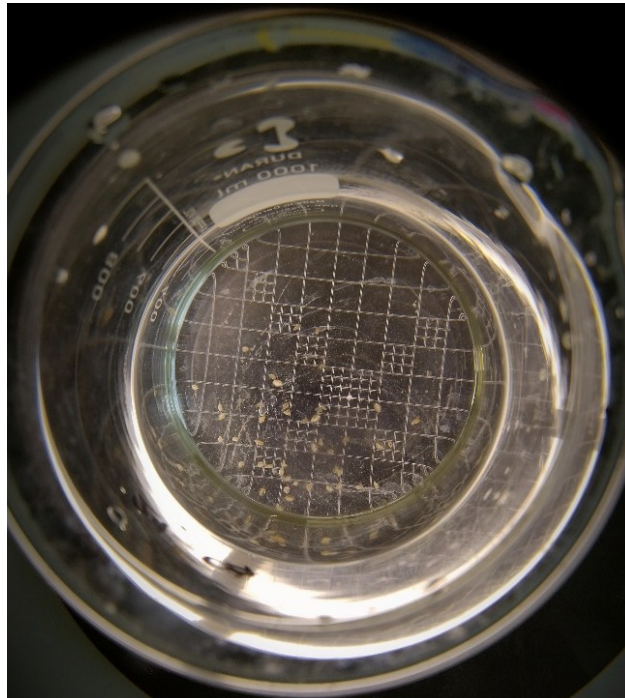


Figura n° 11: si osservano le *daphniae* con meno di 24 h in uno dei *becker* utilizzati per lo studio.

5.1.1. Detersivo Dixan

I test preliminari condotti hanno permesso di individuare una totale sopravvivenza degli individui intorno alla concentrazione di 2,5 mg/L e a tutte le concentrazioni inferiori e un'immobilità totale delle *daphniae* a tutte le concentrazioni superiori a 25 mg/L.

I risultati ottenuti hanno consentito di restringere il campo in un range compreso tra 5 mg/L e 25 mg/L, in cui si è riscontrato il valore di EC₅₀: 17,231 mg/L, come si osserva in *Tabella n° 9*.

I risultati ottenuti mostrano che fin dalla prima concentrazione testata si registra una mortalità minima (un solo individuo muore a 5 mg/L). Il numero di immobilizzati cresce, senza mai raggiungere una totalità di individui immobili, all'aumentare della concentrazione del detersivo (*Grafico n° 5*).

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	<i>Daphniae</i> esposte	N° immobili	% mortalità	Ec ₅₀
Dixan					17,231 mg/L
	(Controllo)	30	0	0%	
	5 mg/L	30	1	3,3%	
	12,5 mg/L	30	13	43,3%	
	20 mg/L	30	18	60%	
	25 mg/L	30	24	80%	

Tabella n° 9: tabella riassuntiva risultati *Dixan*.

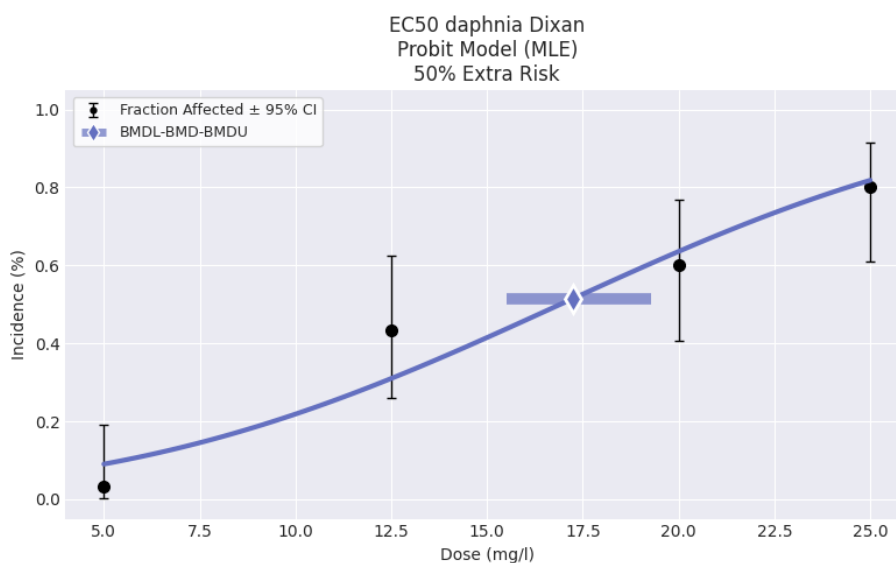


Grafico n° 5: il grafico mostra la relazione tra la dose di una sostanza (*Dixan*) e l'incidenza (%) dell'effetto osservato in *Daphnia magna*, utilizzando un modello probit (MLE) per stimare l'EC₅₀: 17,231 mg/L.

5.1.2. Detersivo Sole

I risultati dei test ecotossicologici preliminari hanno permesso di individuare una mortalità totale ad una concentrazione di 120 mg/L e superiori, e una sopravvivenza di tutti gli individui a diluizioni minori e uguali a 48 mg/L.

A fronte di questo, è stato definito il range di diluizioni definitive compreso tra i valori seguenti: 24 mg/L e 80 mg/L. Il valore dell'EC₅₀ ricavato è 69,168 mg/L (Tabella n° 10).

In questo caso la curva sottostante mostra un andamento piuttosto esponenziale (Grafico n° 6): come si osserva, infatti, nessun individuo è deceduto alle prime due concentrazioni testate. Dalla terza concentrazione, invece, si è registrata una mortalità che è aumentata, ma anche in questo caso non si arriva al 100% di immobili.

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	Daphniae esposte	N° immobili	% mortalità	Ec50
Sole					69,168 mg/L
	(Controllo)	30	0	0%	
	24 mg/L	30	0	0 %	
	48 mg/L	30	0	0 %	
	64 mg/L	30	12	40%	
	80 mg/L	30	24	80%	

Tabella n° 10: tabella riassuntiva risultati Sole.

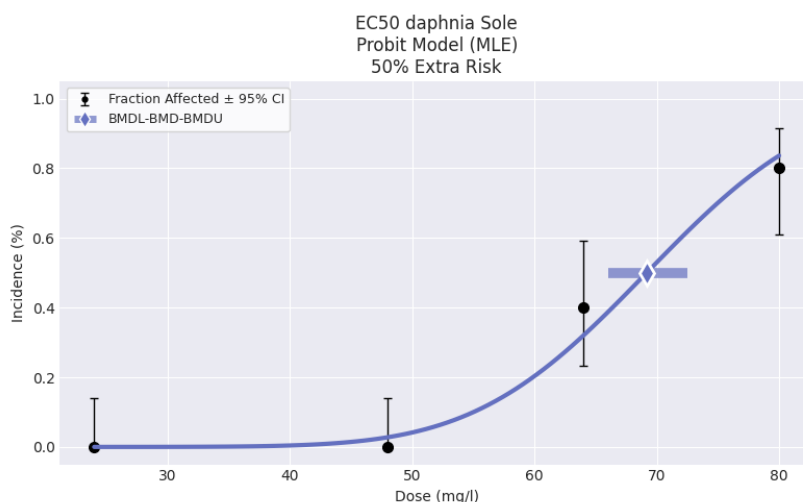


Grafico n° 6: il grafico mostra la relazione tra la dose di una sostanza (Sole) e l'incidenza (%) dell'effetto osservato in *Daphnia magna*, utilizzando un modello probit (MLE) per stimare l'EC₅₀: 69,168 mg/L.

5.1.3. Detersivo Chanteclair

Per quanto riguarda i risultati ottenuti esponendo questo prodotto ai crostacei, i test preliminari condotti hanno mostrato che tutti gli individui esposti, muoiono nella loro totalità intorno a concentrazioni di 55 mg/L e a tutte quelle superiori; mentre una totale sopravvivenza si è registrata intorno alle concentrazioni di 5,5 mg/L e a tutte quelle inferiori.

In seguito, quindi, è stato scelto di considerare una serie di diluizioni definitive comprese tra 11 mg/L e 44 mg/L (Tabella n° 11). Il valore dell'EC₅₀ restituito dal software è pari a 27,745 mg/L. La mortalità associata a queste diluizioni è misurabile fin dalla prima diluizione testata e, procedendo con le successive, arriva quasi al 100% (Grafico n° 7).

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	<i>Daphniae</i> esposte	N° immobili	% mortalità	Ec ₅₀
<i>Chanteclair</i>					27,745 mg/L
	(Controllo)	30	0	0%	
	11 mg/L	30	2	6,6%	
	22 mg/L	30	6	20%	
	33 mg/L	30	22	73,3%	
	44 mg/L	30	29	96,6%	

Tabella n° 11: tabella riassuntiva per *Chanteclair*.

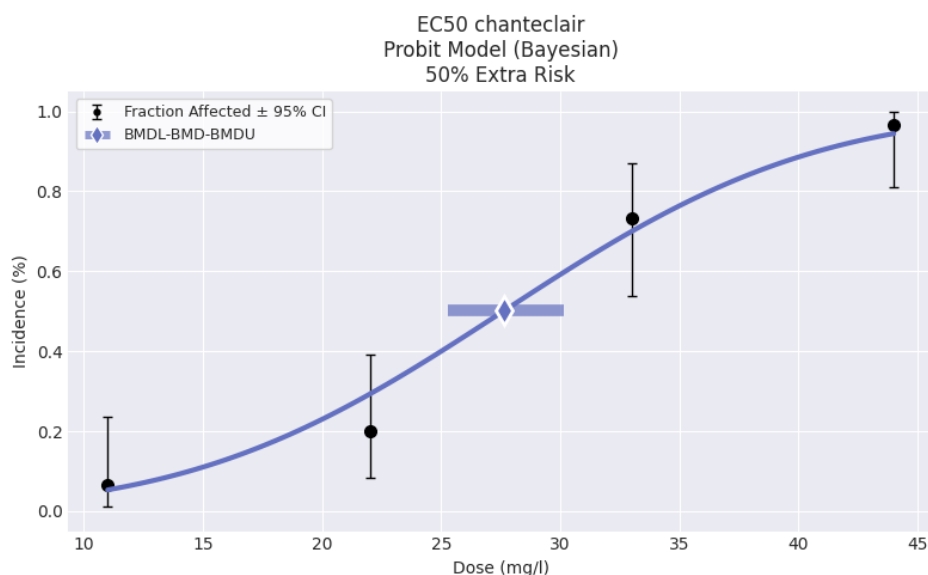


Grafico n° 7: il grafico mostra la relazione tra la dose di una sostanza (*Chanteclair*) e l'incidenza (%) dell'effetto osservato in *Daphnia magna*, utilizzando un modello probit (MLE) per stimare l'EC₅₀: 27,745 mg/L.

5.1.4. Detersivo Winni's

Il range di concentrazioni definitivo testato è compreso tra i valori 74 mg/L e 296 mg/L e il valore di EC₅₀ che il software ha restituito è 133,936 mg/L (Tabella n° 12).

La scelta di questo intervallo è dipesa dai test preliminari condotti che hanno restituito una mortalità totale degli individui intorno a concentrazioni maggiori e uguali a 370 mg/L e una sopravvivenza di tutti gli individui intorno a diluizioni minori e uguali a 37 mg/L.

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	<i>Daphniae</i> esposte	N° immobili	% mortalità	Ec ₅₀
Winni's					133,936 mg/L
	(Controllo)	30	0	0%	
	74 mg/L	30	5	16,6%	
	148 mg/L	30	22	73,3%	
	222 mg/L	30	27	90%	
	296 mg/L	30	28	93,3%	

Tabella n° 12: tabella riassuntiva per Winni's.

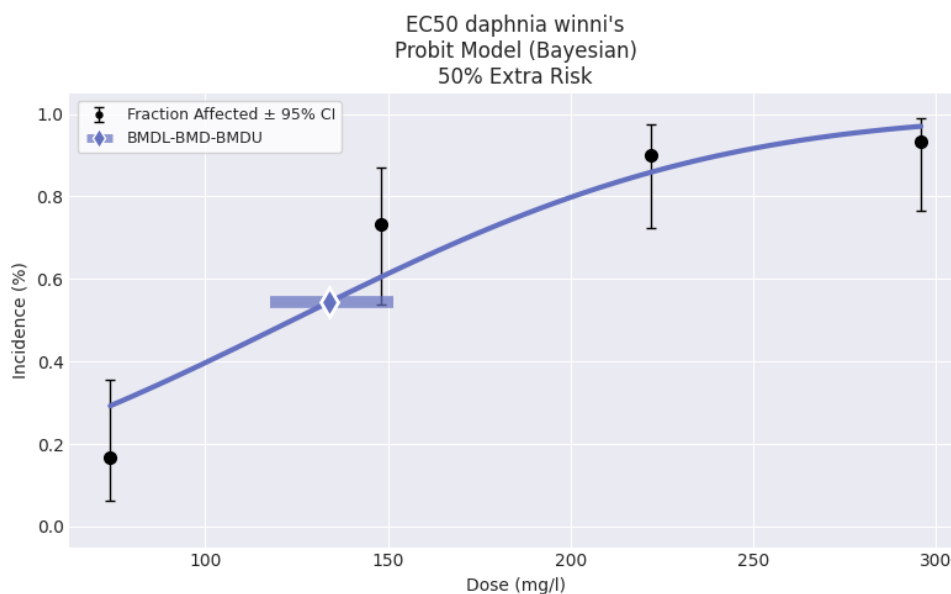


Grafico n° 8: il grafico mostra la relazione tra la dose di una sostanza (Winni's) e l'incidenza (%) dell'effetto osservato in *Daphnia magna*, utilizzando un Modello Probit (MLE) per stimare l'EC₅₀: 133,936 mg/L.

5.1.5. Detersivo Green Emotion

I saggi ecotossicologici preliminari hanno mostrato che tutti gli individui esposti per 24 ore alla sostanza in esame muoiono a partire da una concentrazione intorno a 175 mg/L e superiori, e una sopravvivenza totale intorno alla concentrazione 35 mg/L e inferiori.

Sulla base di quanto ottenuto, si è scelto definitivamente un intervallo di diluizioni compreso tra 35 mg/L e 140 mg/L, la cui concentrazione che determina la morte del 50% degli individui è 120,865 mg/L.

Tutti e trenta gli individui esposti sopravvivono nei *becker* per 24 ore fino alla concentrazione di 70 mg/L, dopodiché la mortalità inizia ad essere evidente, come si può osservare in *tabella n° 13* e nel *grafico n° 9*.

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	<i>Daphniae</i> esposte	N° immobili	% mortalità	Ec50
Green Emotion					120,865 mg/L
	(Controllo)	30	0	0%	
	35 mg/L	30	0	0%	
	70 mg/L	30	0	0%	
	105 mg/L	30	9	30%	
	140 mg/L	30	23	76,6%	

Tabella n° 13: tabella riassuntiva per *Green Emotion*.

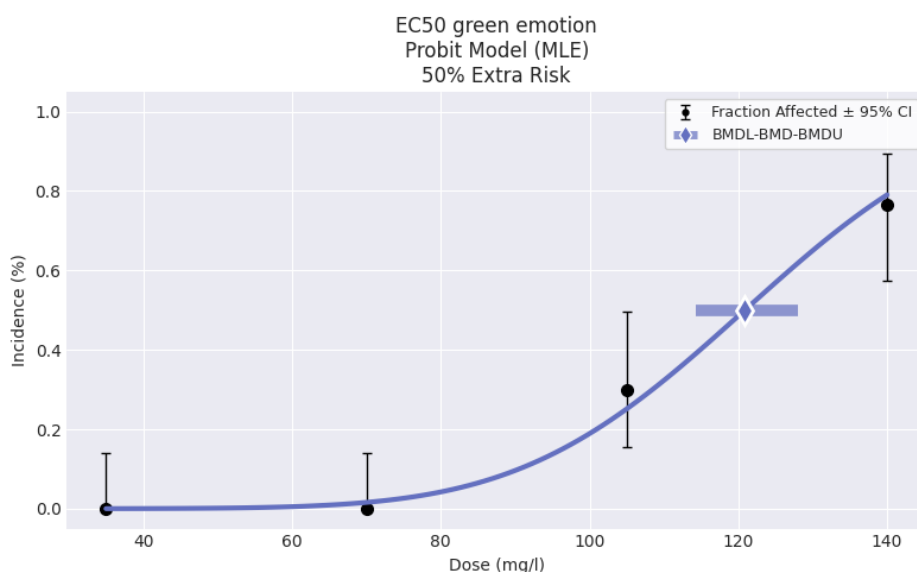


Grafico n° 9: il grafico mostra la relazione tra la dose di una sostanza (*Green Emotion*) e l'incidenza (%) dell'effetto osservato in *Daphnia magna*, utilizzando un Modello Probit (MLE) per stimare l'EC₅₀: 120,865 mg/L.

5.1.6. Detersivo Biophura

Dai test preliminari condotti si è registrata una mortalità totale intorno alla concentrazione di 50 mg/L e a tutte le concentrazioni superiori e una sopravvivenza registrata alla concentrazione 5 mg/L e a tutte le inferiori.

Come si può osservare nella *tabella n° 14*, il range di diluizioni definitivo testato è compreso tra 5 mg/L e 35 mg/L. Il valore di EC₅₀ risulta essere pari a 19,205 mg/L.

La curva risultante dal rapporto tra la concentrazione di *Biophura* testata e il n° di individui immobili si può osservare nel *grafico n° 10*. È interessante notare che, passando dalla seconda diluizione testata alla terza, la mortalità registrata aumenta esponenzialmente.

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	<i>Daphniae</i> esposte	N° immobili	% mortalità	Ec50
<i>Biophura</i>					19,205 mg/L
	(Controllo)	30	0	0%	
	5 mg/L	30	1	3,3%	
	10 mg/L	30	3	10%	
	25 mg/L	30	26	86,6%	
	35 mg/L	30	28	93,3%	

Tabella n° 14: tabella riassuntiva per *Biophura*.

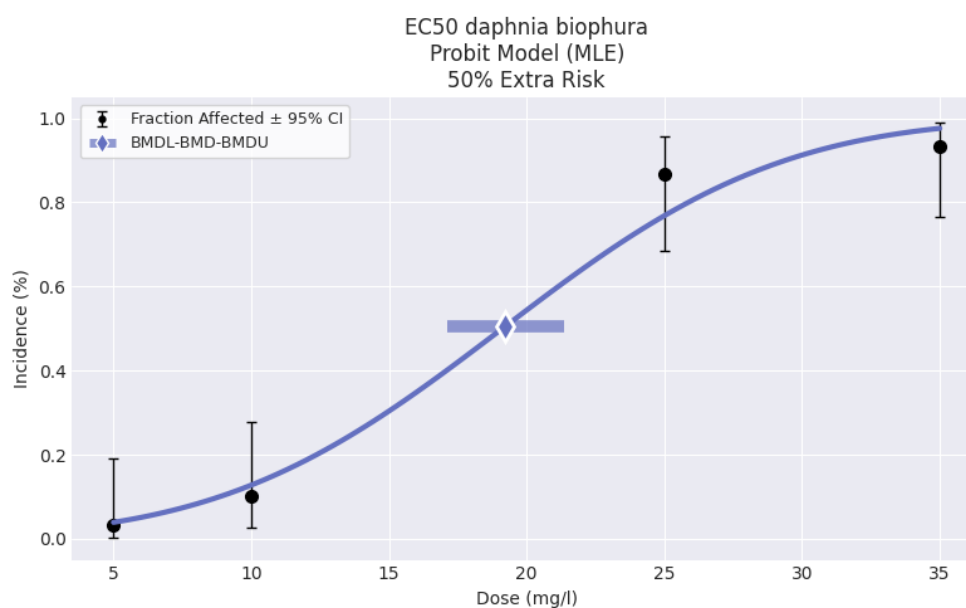


Grafico n° 10: il grafico mostra la relazione tra la dose di una sostanza (*Biophura*) e l'incidenza (%) dell'effetto osservato in *Daphnia magna*, utilizzando un Modello Probit (MLE) per stimare l'EC₅₀: 19,205 mg/L.

5.2. RISULTATI TEST CONDOTTI SULL'ALGA *RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA*

Seguendo i protocolli descritti precedentemente, la densità cellulare delle soluzioni di saggio e di controllo è stata determinata 72 ore dopo l'inizio del test, con metodo spettrofotometrico misurando l'assorbanza di ciascuna soluzione alla lunghezza d'onda di 670 nm.

La rielaborazione dei dati con *BSDM Analysis* ha restituito, per tutti i detersivi saggiati, la percentuale di inibizione della crescita di *Raphidocelis subcapitata* da cui si è potuto ricavare il valore EC_{50} .

È interessante notare che una prima idea del potenziale inibitorio del campione, era già deducibile visivamente (*Figura n° 12.*) confrontando i valori di assorbanze ottenute per le soluzioni a concentrazione maggiore con quelle del controllo negativo; tuttavia, soltanto i metodi statistici applicati hanno in seguito conferito significatività al risultato.

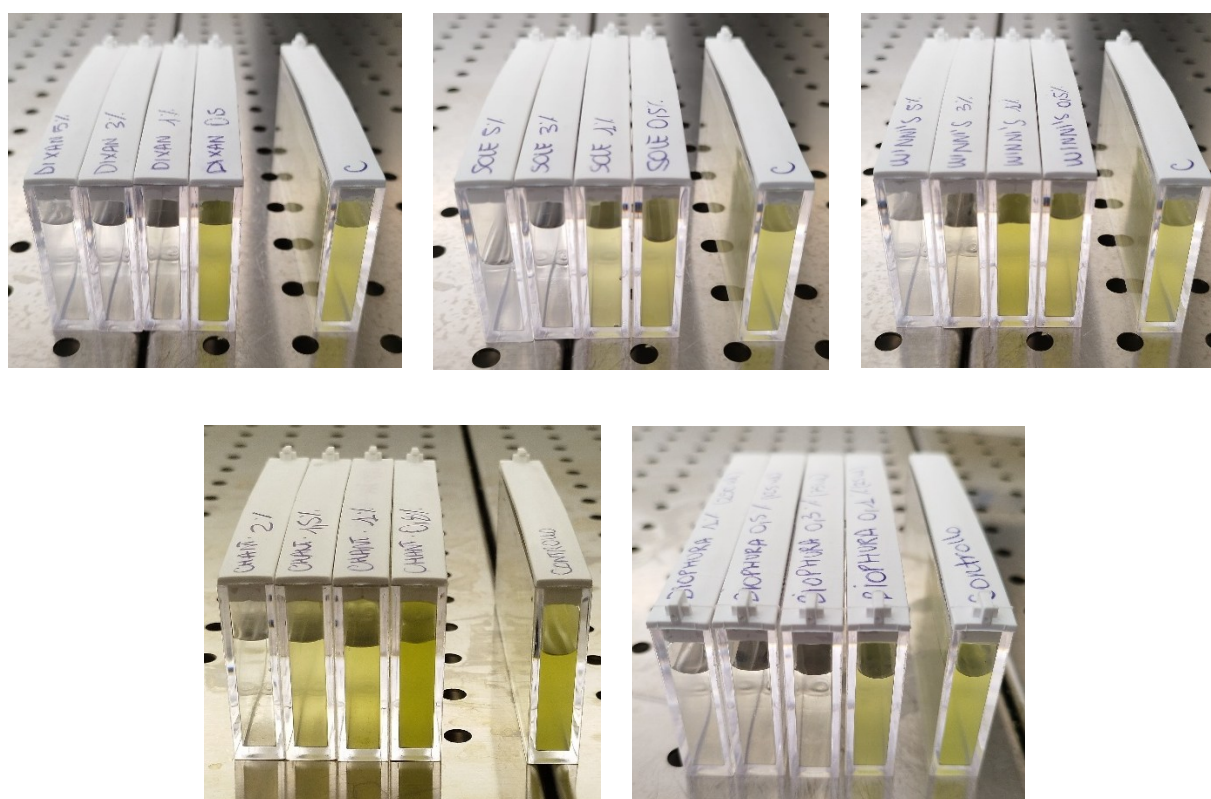


Figura n° 12: l'inibizione della crescita di *Raphidocelis subcapitata* si è potuta osservare già ad occhio nudo rispetto al controllo negativo: procedendo per ogni prodotto, da destra (soluzioni più diluite) verso sinistra (soluzioni più concentrate). In foto sono rappresentati cinque dei sei detersivi sottoposti a questo studio.

5.2.1. Detersivo Dixan

Il test è stato condotto definitivamente in un intervallo di valori compreso tra 12,5 mg/L e 125 mg/L. La scelta di questi valori è stata determinata dai risultati delle prove preliminari, che hanno permesso di calcolare lo 0% e il 100% di inibizione della crescita algale e di restringere pertanto l'intervallo, in modo da ritrovare con maggiore precisione il valore di EC₅₀ che, in questo caso specifico, è risultato essere 24,565 mg/L (Tabella n° 15).

Si può osservare la curva nel grafico n° 11: un picco esponenziale si è verificato perché la percentuale di inibizione, passando dalla prima alla seconda concentrazione, subisce un forte incremento: la prima diluizione testata (12,5 mg/L) non risulta essere tossica per l'organismo, diversamente da quanto si osserva nella seconda diluizione (15 mg/L), il doppio più concentrata.

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	Letture Spettrofotometriche (OD t ₇₂)	% Inibizione Crescita	EC ₅₀
Dixan				24,565 mg/L
	(Controllo)	1,210	—	
	12,5 mg/L	1,189; 1,186; 1,191	0,4 %	
	25 mg/L	0,128; 0,122; 0,13	53,0 %	
	75 mg/L	0,049; 0,044; 0,051	77,4 %	
	125 mg/L	0,032; 0,029; 0,026	91,9 %	

Tabella n° 15: tabella riassuntiva per Dixan.

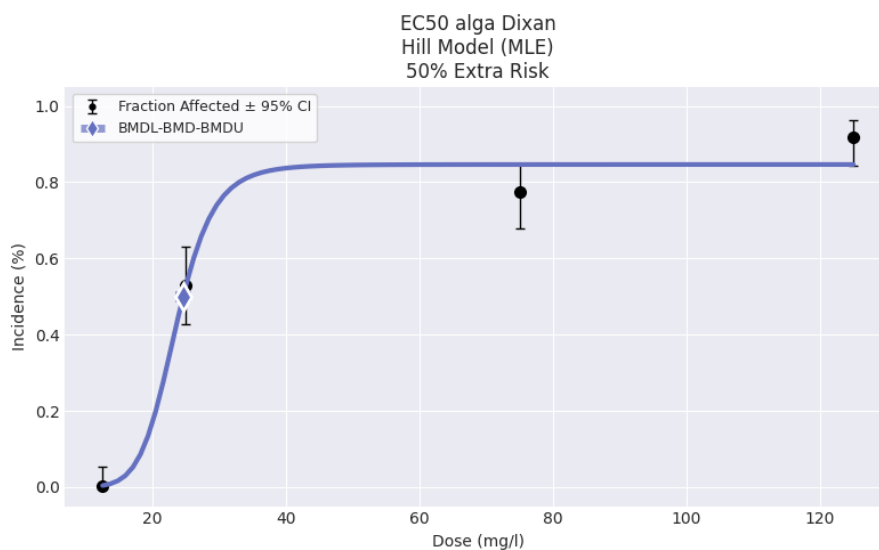


Grafico n° 11: il grafico mostra la relazione tra la dose di una sostanza (Dixan) e l'incidenza (%) dell'effetto osservato in *Raphidocelis subcapitata*, utilizzando un Modello Hill (MLE) per stimare l'EC₅₀: 24,565 mg/L.

5.2.2. Detersivo Sole

I test preliminari hanno evidenziato la dose che risulta essere tossica per l'alga sottoposta ai saggi, per cui si è potuto scegliere un range di diluizioni definitive testate compreso tra 40 mg/L e 400 mg/L. In questo caso il campione è risultato tossico (4,7%) fin dalla prima concentrazione testata (40 mg/L) dieci volte meno concentrata rispetto all'ultima (400 mg/L), che ha registrato un'inibizione chiaramente maggiore (83,1%), come si osserva in *tabella n° 16* e nel grafico inserito successivamente (*Grafico n° 12*).

Il valore che ha determinato un'inibizione del tasso di crescita del 50% è 169,037 mg/L.

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	Letture Spettrofotometriche (OD t72)	% Inibizione Crescita	EC50
Sole				169,037 mg/L
	(Controllo)	1,210	—	
	40 mg/l	0,988; 0,986; 0,99	4,7 %	
	80 mg/l	0,713; 0,716; 0,71	12,3 %	
	240 mg/l	0,061; 0,058; 0,063	71,3 %	
	400 mg/l	0,042; 0,039; 0,04	83,1 %	

Tabella n° 16: tabella riassuntiva per *Sole*.

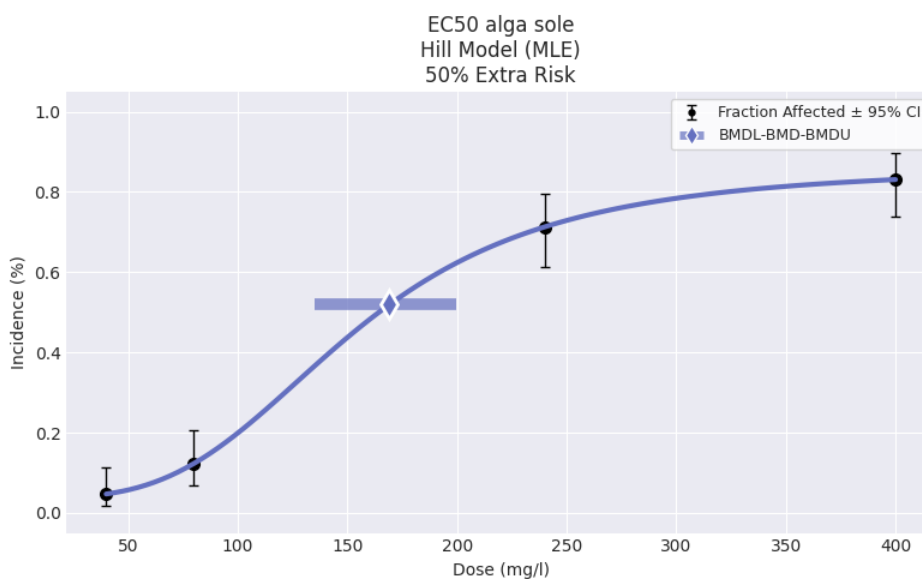


Grafico n° 12: il grafico mostra la relazione tra la dose di una sostanza (*Sole*) e l'incidenza (%) dell'effetto osservato in *Raphidocelis subcapitata*, utilizzando un Modello Hill (MLE) per stimare l'EC₅₀: 169,037 mg/L.

5.2.3. Detersivo Chanteclair

Il detersivo *Chanteclair* non risulta essere tossico per l'organismo alla prima concentrazione definitiva testata: ovvero 44 mg/L, come si osserva in *tabella n° 17* e nel *grafico n° 13*. Infatti, la percentuale di inibizione è un valore negativo (-2,2%).

La foto inserita (*Figura n° 13*) anticipa quanto appena affermato. Inoltre, si può vedere come il campione di partenza (44 mg/L) presenti un colore verde più intenso rispetto al controllo negativo.

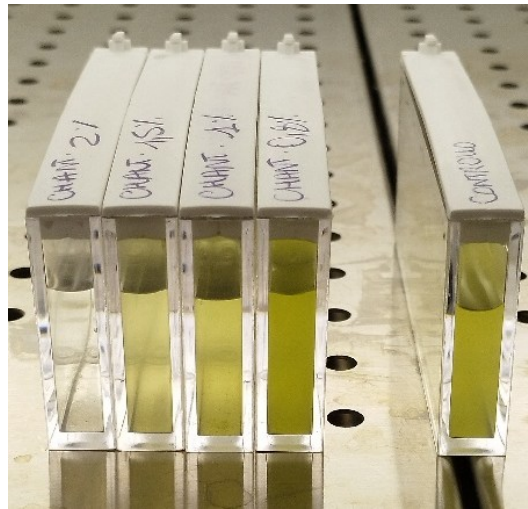


Figura n° 13: procedendo da destra verso sinistra si osserva l'inibizione della crescita algale rispetto al controllo negativo, in seguito all'esposizione di *Raphidocelis subcapitata* al detersivo *Chanteclair*.

Una minima tossicità si è potuta rilevare dalla seconda diluizione successiva in poi. Il valore EC₅₀ (106,744 mg/L), ricade tra la terza e l'ultima diluizione testate: la percentuale di inibizione dell'ultima concentrazione testata, supera di poco il 50% di effetto.

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	Letture Spettrofotometriche (OD t ₇₂)	% Inibizione Crescita	EC ₅₀
<i>Chanteclair</i>				106,744 mg/L
	(Controllo)	1,886; 1,885; 1,880	—	
	44 mg/L	2,095; 2,091; 2,089	-2,2%	
	55 mg/L	1,148; 1,136; 1,134	10,5%	
	82,5 mg/L	0,872; 0,870; 0,866	16,2%	
	110 mg/L	0,116; 0,117; 0,116	57,3%	

Tabella n° 17: Tabella riassuntiva per *Chanteclair*.

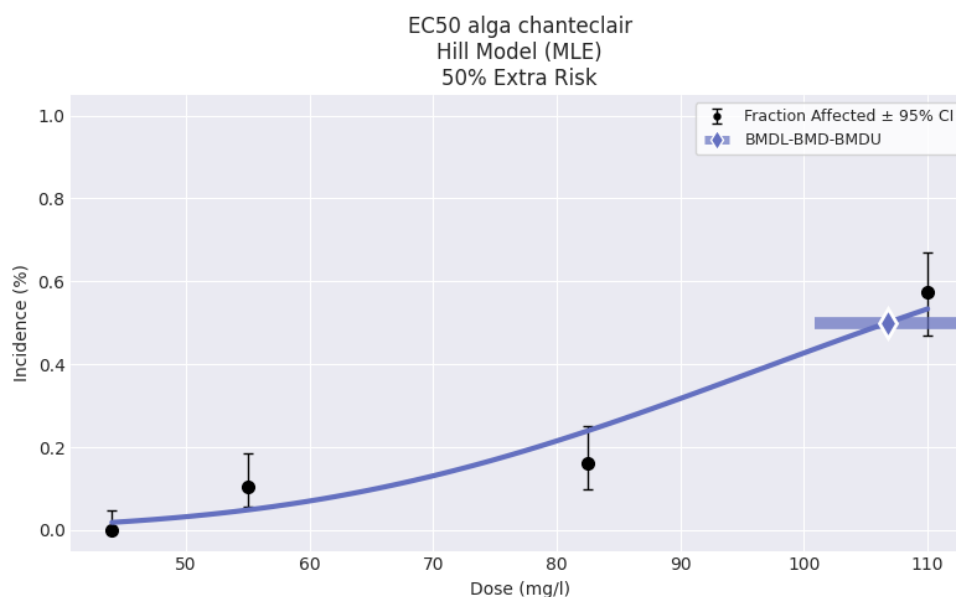


Grafico n° 13: il grafico mostra la relazione tra la dose di una sostanza (*Chanteclair*) e l'incidenza (%) dell'effetto osservato in *Raphidocelis subcapitata*, utilizzando un Modello Hill (MLE) per stimare l'EC₅₀: 106,744 mg/L.

5.2.4. Detersivo Winni's

Il primo detersivo “green” a cui è stata sottoposta l'alga *Raphidocelis subcapitata* è Winni's. Anche in questo caso la prima diluizione definitiva testata non risulta essere tossica per l'organismo, con una percentuale di inibizione della crescita algale negativa, pari a -1,5%.

Come si può osservare nella *tabella n° 18* e nel *grafico n° 14*, un rapido incremento dell'inibizione della crescita algale si osserva passando dalla seconda concentrazione testata (31 mg/L) alla terza (111 mg/L); tra queste due diluizioni si ritrova inoltre il valore di EC₅₀, pari a 120,806 mg/L.

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	Letture Spettrofotometriche (OD t ₇₂)	% Inibizione Crescita	EC ₅₀
Winni's				120,806 mg/L
	(Controllo)	1,210	—	
	18,5 mg/L	1,290; 1,292; 1,288	-1,5%	
	31 mg/L	1,084; 1,086; 1,082	2,5%	
	111 mg/L	0,174; 0,171; 0,177	45,4 %	
	185 mg/L	0,086; 0,082; 0,091	64,4 %	

Tabella n° 18: tabella riassuntiva per Winni's.

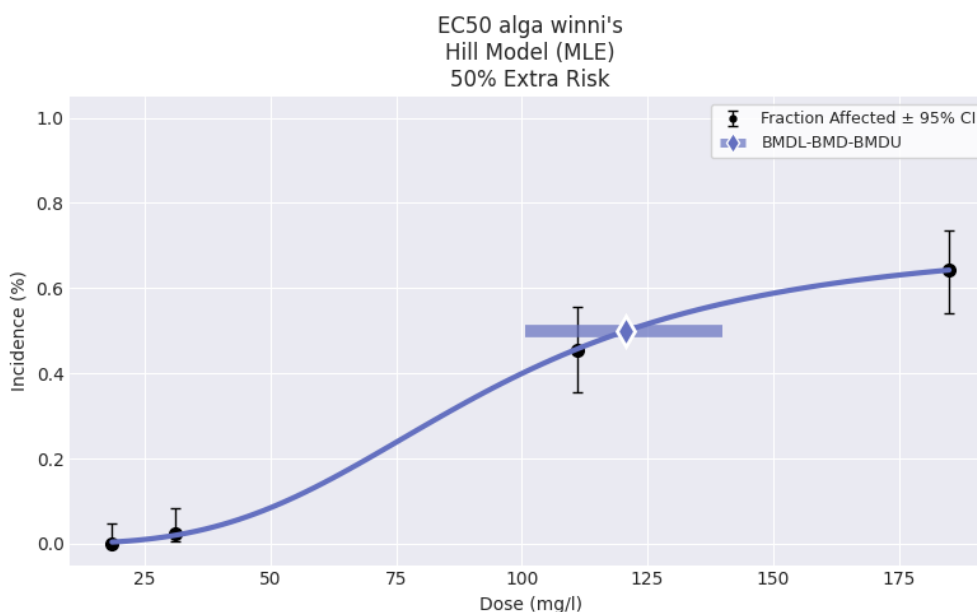


Grafico n° 14: il grafico mostra la relazione tra la dose di una sostanza (Winni's) e l'incidenza (%) dell'effetto osservato in *Raphidocelis subcapitata*, utilizzando un Modello Hill (MLE) per stimare l'EC₅₀: 120,806 mg/L.

5.2.5. Detersivo Green Emotion

I test condotti su questo prodotto hanno permesso di ricavare il valore di EC₅₀ più alto: 235 mg/L (Tabella n° 19). La curva riportata nel grafico n° 15, mostra un andamento abbastanza lineare: fin dalla prima diluizione testata (105 mg/L) si è registrata un'inibizione della crescita algale (11,2%) che raggiunge un breve equilibrio dalla concentrazione di 175 mg/L a 210 mg/L, per poi aumentare (60,1%) alla soluzione più concentrata testata (245 mg/L).

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	Letture Spettrofotometriche (OD t ₇₂)	% Inibizione Crescita	EC ₅₀
Green Emotion				235,181 mg/L
	(Controllo)	1,869; 1,862; 1,859	—	
	105 mg/L	1,108; 1,093; 1,087	11,2 %	
	175 mg/L	0,433; 0,405; 0,400	31,8 %	
	210 mg/L	0,296; 0,291; 0,289	39,2%	
	245 mg/L	0,116; 0,111; 0,108	60,1%	

Tabella n° 19: tabella riassuntiva per Green Emotion.

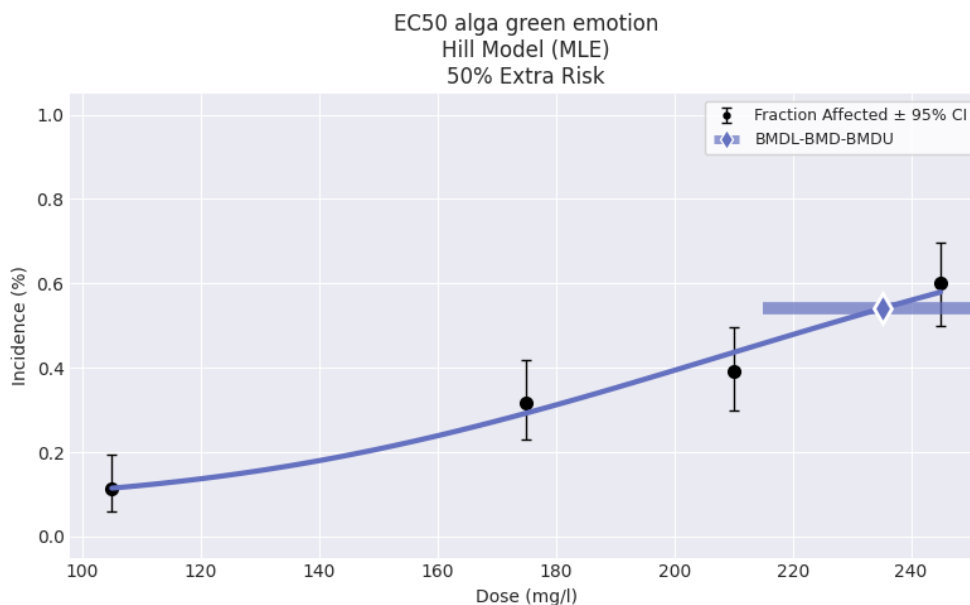


Grafico n° 15: il grafico mostra la relazione tra la dose di una sostanza (Green Emotion) e l'incidenza (%) dell'effetto osservato in *Raphidocelis subcapitata*, utilizzando un Modello Hill (MLE) per stimare l'EC₅₀: 235,181 mg/L.

5.2.6. Detersivo Biophura

Raphidocelis subcapitata esposta a *Biophura*, ha ottenuto il più basso valore di EC₅₀ registrato: 11,525 mg/L.

È interessante osservare dalla *tabella n° 20*, che si registra un'inibizione rilevante nel passaggio da 5 mg/L a 15 mg/L che passa rispettivamente da 4,1% a 61,3%.

Da 25 mg/L a 50 mg/L, invece, la percentuale di inibizione della crescita algale aumenta relativamente poco, passando da 66,5% a 68,3% (*Grafico n° 16*). La curva ben si adatta ai valori e mostra, pertanto, quanto appena descritto: un aumento esponenziale dell'inibizione della crescita seguito da una fase di saturazione.

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	Letture Spettrofotometriche (OD t ₇₂)	% Inibizione Crescita	EC ₅₀
Biophura				11,525 mg/L
	(Controllo)	1,273; 1,271; 1,27	-	
	5 mg/L	1,061	4,1%	
	15 mg/L	0,091	61,3%	
	25 mg/L	0,076	66,5%	
	50 mg/L	0,071	68,3%	

Tabella n° 20: tabella riassuntiva per *Biophura*.

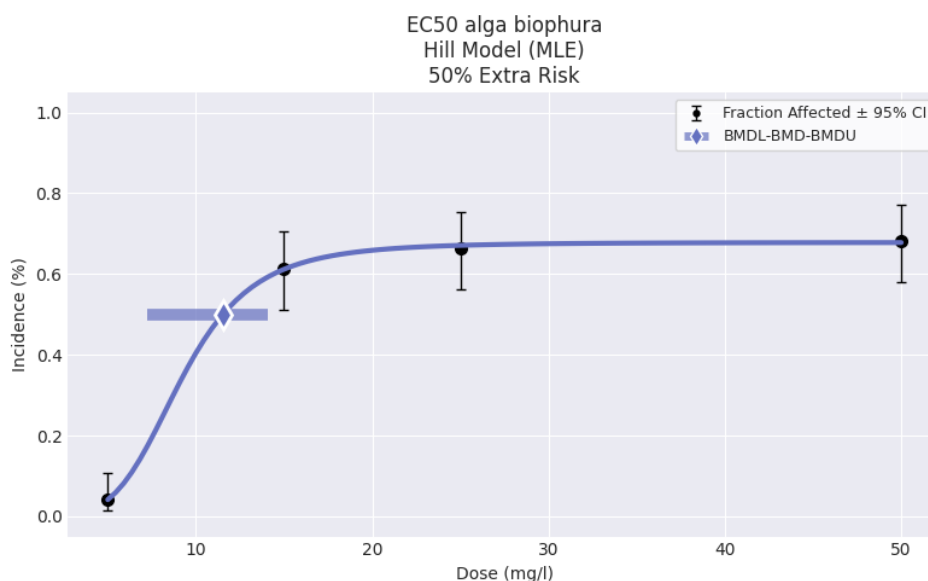


Grafico n° 16: il grafico mostra la relazione tra la dose di una sostanza (*Dixan*) e l'incidenza (%) dell'effetto osservato in *Raphidocelis subcapitata*, utilizzando un Modello Hill (MLE) per stimare l'EC₅₀: 11,525 mg/L.

5.3. RISULTATI TEST CONDOTTI SUL BATTERIO *VIBRIO FISCHERI*

In seguito, vengono riportati i risultati ottenuti in seguito all'esposizione di *Vibrio fischeri* ai sei detersivi per il bucato testati nell'esperimento.

Come già descritto nel metodo di riferimento, lo strumento *BioLight Toxy* (Figura n° 14), misura l'emissione luminosa di *Vibrio fischeri* dopo 5' (l₁), 15' (l₂) e 30' (l₃) di esposizione al campione analizzato.

Come si evince dalle tabelle inserite successivamente, per questo studio si è scelto di considerare la terza lettura (l₃), che corrisponde ad un tempo di esposizione pari a 30', confrontata con la bioluminescenza dei batteri esposti al controllo negativo. Lo strumento restituisce anche una rappresentazione grafica della correlazione dose/effetto.

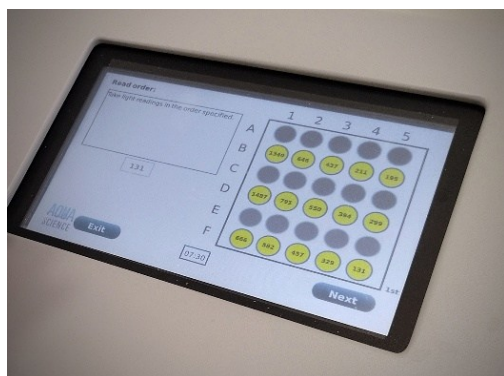


Figura n° 14: lo strumento *BioLight Toxy*

5.3.1. Detersivo Dixan

Come si osserva nella tabella sottostante (*Tabella n° 21*), la concentrazione efficace (EC_{50}) ricavata, si ritrova tra la seconda e la terza soluzione. Inoltre, fin dalle prime concentrazioni testate si osserva una diminuzione della bioluminescenza naturale del batterio che progressivamente subisce un incremento.

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	l ₃	% Effect	EC ₅₀
Dixan				11,2047 mg/L
	(Controllo)	1417	0.00	
	3,84 mg/L	1049	21,49	
	7,68 mg/L	747	46,20	
	15,36 mg/L	566	57.83	
	30,71 mg/L	394	72,99	

Tabella n° 21: tabella riassuntiva per *Dixan*.

Il grafico a dispersione (*Grafico n° 17*) mostra un andamento crescente e quasi lineare, che indica una correlazione positiva tra concentrazione % *Effect*.

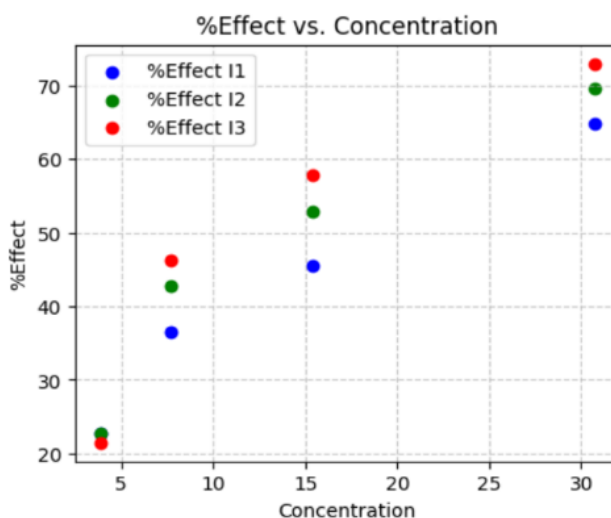


Grafico n° 17: relazione tra la concentrazione del detersivo *Dixan* e la % di effetto nel batterio *Vibrio Fischeri*.

5.3.2. Detersivo Sole

I risultati dei test condotti sul secondo prodotto tradizionale, si possono osservare nella tabella inserita in seguito (*Tabella n° 22*). Il valore di EC₅₀ che il software ha restituito è quasi cinque volte maggiore rispetto al test precedente (51,4424 mg/L vs 11,2047 mg/L). Questo fornisce sicuramente una prima informazione sulla diversa sensibilità dell'organismo ai prodotti, nonostante rientrino entrambi nella categoria di quelli più comunemente utilizzati.

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	l ₃	% Effect	EC ₅₀
Sole				51,4424 mg/L
	(Controllo)	1612	0.00	
	40,95 mg/L	695	47,72	
	81,90 mg/L	454	64,58	
	163,80 mg/L	327	73,92	
	327,60 mg/L	129	91,97	

Tabella n° 22: tabella riassuntiva per *Sole*.

In questo caso si osserva un incremento più rapido (*Grafico n° 18*). Si può evincere che la % Effect parte già da un valore alto (47,72%) alla prima diluizione (40,95 mg/L), per poi arrivare a 91,97% a 327,60 mg/L.

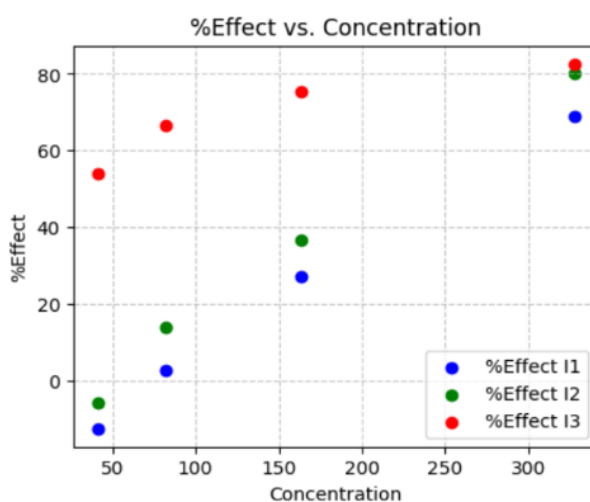


Grafico n° 18: relazione tra la concentrazione del detersivo *Sole* e la % di effetto nel batterio *Vibrio Fischeri*.

5.3.3. Detersivo Chanteclair

Dalla tabella inserita successivamente (*Tabella n° 23*) si nota subito che il valore di EC₅₀ è tre volte maggiore rispetto ai test condotti su *Dixan* (33,7896 mg/L vs 11,2047 mg/L).

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	Is	% Effect	EC ₅₀
Chanteclair				33,7896 mg/L
	(Controllo)	1108	0,00	
	2,82 mg/L	1012	1,64%	
	5,63 mg/L	1139	-4,80%	
	11,26 mg/L	920	11,82%	
	22,52 mg/L	604	44,37%	
	45,04 mg/L	355	67,77%	
	90,09 mg/L	276	75,17%	

Tabella n° 23: tabella riassuntiva per *Chanteclair*.

I risultati ottenuti e la rappresentazione grafica (*Grafico n° 19*), mostrano che in questo caso non si è in presenza di una relazione lineare. Analizzando la relazione *concentrazione - % Effect* si evince che la percentuale di effetto a basse concentrazioni (2,82 mg/L – 5,63 mg/L) è quasi nulla e in un caso negativa (- 4,80%). Procedendo con diluizioni più concentrate (11,26 mg/L), invece, aumenta rapidamente (11,82 %). Inoltre, oltre la concentrazione di 45,04 mg/L, si verifica un aumento più lento che raggiunge quasi un *plateau* (75,17%) intorno a 90 mg/L.

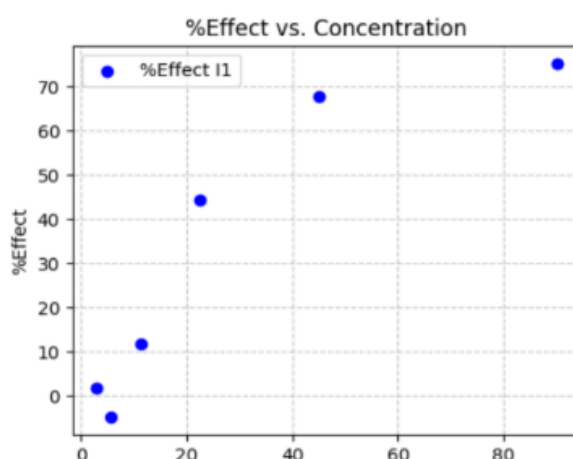


Grafico n° 19: relazione tra la concentrazione del detersivo *Chanteclair* e la % di effetto nel batterio *Vibrio Fischeri*.

5.3.4. Detersivo Winni's

I risultati ottenuti dai test esponendo *Vibrio fischeri* al primo detersivo “bio” sono riportati in tabella (Tabella n° 24). Si riscontra un valore di EC₅₀ simile a quello ricavato nei test effettuati sul detersivo tradizionale Sole (51,4424 mg/L). Questo risultato fornisce informazioni circa la stessa sensibilità dell'organismo esposto ai due prodotti, nonostante appartengano a due categorie differenti, rispettivamente “green” e “tradizionale”.

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	l ₃	% Effect	EC ₅₀
Winni's				52,0383 mg/L
	(Controllo)	1438	0.00	
	15,15 mg/L	1205	20,25 %	
	30,30 mg/L	994	32,52 %	
	60,61 mg/L	696	52,85 %	
	121,21 mg/L	378	74,39 %	

Tabella n° 24: tabella riassuntiva per Winni's.

La relazione raffigurata nel grafico a dispersione (Grafico n° 20) mostra la relazione concentrazione - % Effect: quest'ultima parte da un valore di 20,25% alla prima concentrazione testata (15,15 mg/L) e cresce rapidamente a oltre 74% in 121,21 mg/L.

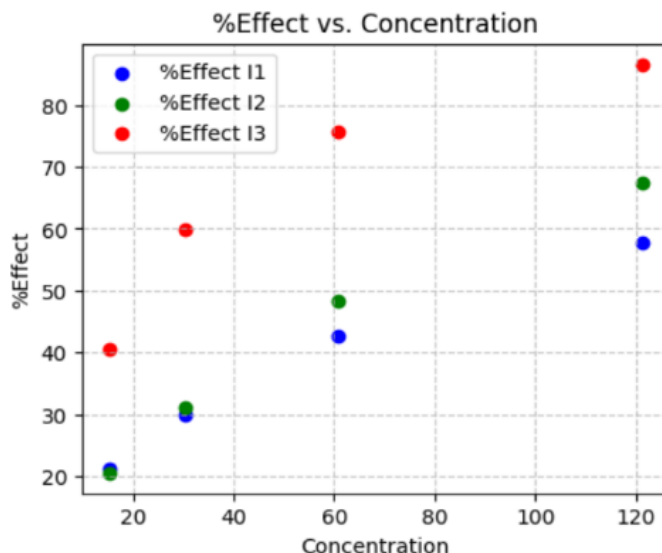


Grafico n° 20: relazione tra la concentrazione del detersivo Winni's e la % di effetto nel batterio *Vibrio Fischeri*.

5.3.5. Detersivo Green Emotion

I risultati evidenziati in tabella (Tabella n° 25), mostrano un valore di EC₅₀ insolito, trattandosi del secondo detersivo testato appartenente alla categoria “green”: si può notare come questo sia molto più basso rispetto al precedente test condotto (52,0383 mg/L).

Detersivo	Concentrazione(mg/L)	Is	% Effect	EC ₅₀
Green Emotion				19,2632 mg/L
	(Controllo)	1483	0.00	
	3,58 mg/L	1349	2,32 %	
	7,17 mg/L	993	37,19 %	
	14,33 mg/L	928	30,15 %	
	28,67 mg/L	514	71,35 %	
	57,33 mg/L	331	71,41 %	
	114,66 mg/L	239	83,66 %	

Tabella n° 25: tabella riassuntiva per Green Emotion.

Per quanto riguarda la relazione concentrazione - % Effect, si evince dal grafico (Grafico n° 21) che a basse concentrazioni (in particolare alla concentrazione di 3,58 mg/L) l'effetto è molto basso (2,32%) e che la percentuale subisce un rapido incremento (37,19%) passando dalla prima alla seconda concentrazione (3,58 mg/L – 7,17 mg/L) ma poi ritorna ad abbassarsi (30,15%) alla terza concentrazione (14,33 mg/L). A concentrazioni più elevate invece l'effetto raggiunge un breve *plateau* al termine del quale si osserva la percentuale più elevata (83,66%) rilevata nell'ultima concentrazione testata (114,66 mg/L).

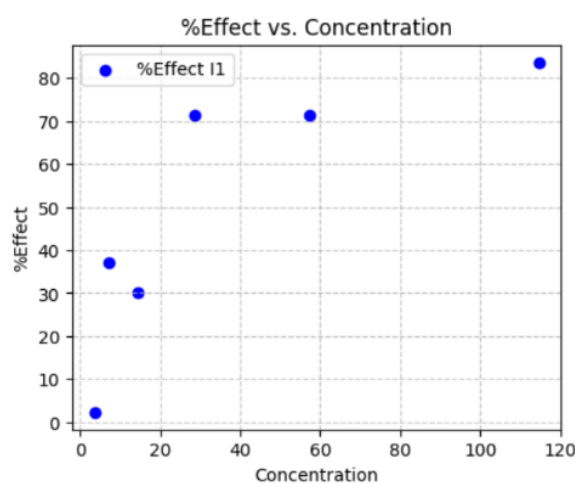


Grafico n° 21: relazione tra la concentrazione del detersivo Green Emotion e la % di effetto nel batterio *Vibrio Fischeri*.

5.3.6. Detersivo *Biophura*

I risultati riportati in *tabella n° 26* mostrano il valore di EC₅₀ ricavato, che in questi test rappresenta il dato più basso ottenuto, nonostante la categoria di appartenenza del prodotto (“green”).

Detersivo	Concentrazione (mg/L)	l ₃	% Effect	EC ₅₀
<i>Biophura</i>				10,8130 mg/L
	(Controllo)	1433	0.00	
	7,68 mg/L	889	40,52 %	
	15,36 mg/L	557	59,82 %	
	30,71 mg/L	351	75,61 %	
	61,42 mg/L	185	86,58 %	

Tabella n° 26: tabella riassuntiva per *Biophura*.

Si può affermare osservando il grafico (*Grafico n° 22*) che il parametro % *Effect* aumenta più gradualmente, raggiungendo valori massimi (86,58 %) intorno all’ultima concentrazione testata (61,42 mg/L).

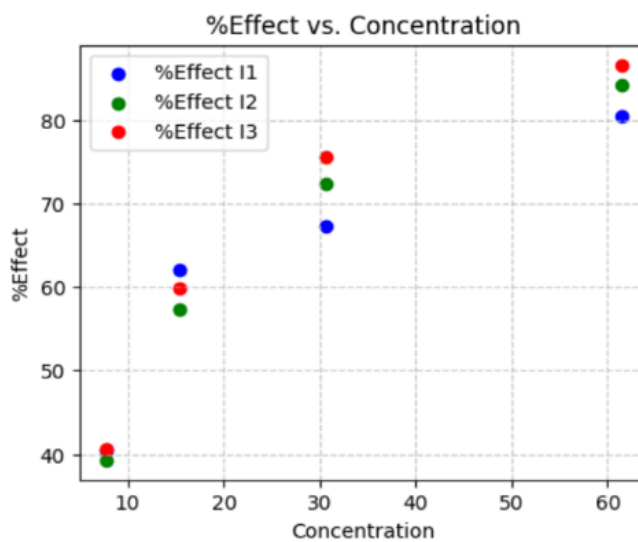


Grafico n° 22: relazione tra la concentrazione del detersivo *Biophura* e la % di effetto nel batterio *Vibrio Fischeri*.

6. DISCUSSIONE

Per tutte e tre le condizioni si osserva un comportamento coerente: avviene un incremento dell'effetto tossico all'aumentare della concentrazione, che si manifesta con un'immobilità più accentuata in *Daphnia magna*, una maggiore inibizione del tasso di crescita di *Raphidocelis subcapitata* e della bioluminescenza di *Vibrio fischeri*.

6.1. TEST CONDOTTI SUL CROSTACEO *DAPHNIA MAGNA*

I test condotti sottoponendo *Daphnia magna* ai detersivi tradizionali, ovvero *Dixan*, *Sole* e *Chanteclair*, hanno restituito valori di EC₅₀ più bassi rispetto ai saggi effettuati testando i detersivi “green”, ovvero *Winni's*, *Green Emotion* e *Biophura*.

Dal grafico n° 23 si evince pertanto che i risultati ottenuti sono coerenti e in linea con le aspettative: in individui sottoposti a detersivi tradizionali, a più basse concentrazioni, si misura la mortalità della metà degli individui, in particolare il detergente *Sole* risulta essere quello meno tossico tra i detersivi tradizionali.

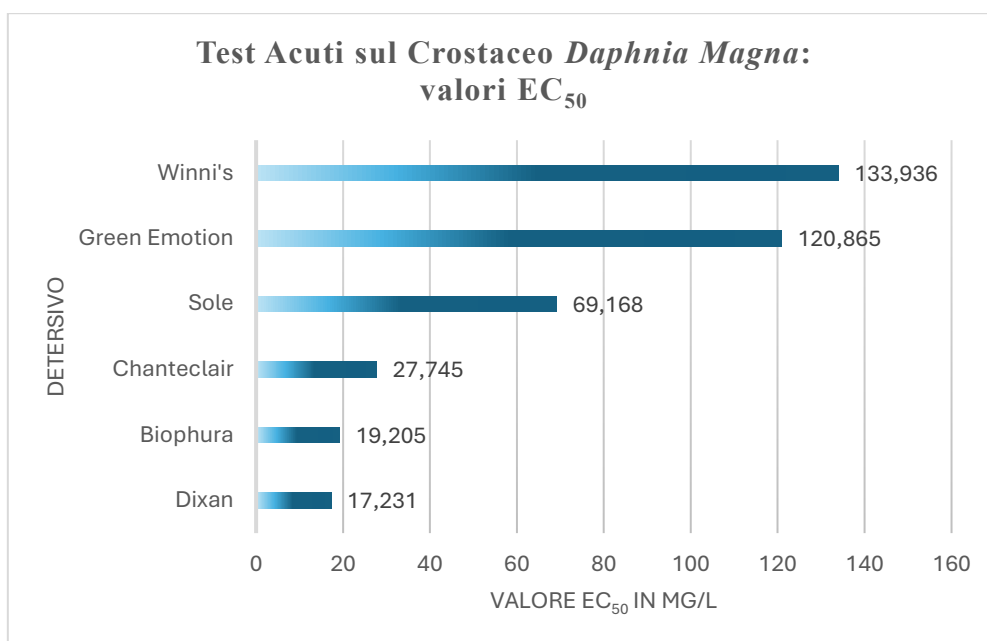


Grafico n° 23: vengono riportati in ordine crescente i valori di EC₅₀ per ogni detergente, ottenuti dai test acuti condotti sul crostaceo *Daphnia magna*.

I saggi effettuati sui detersivi “green”, hanno restituito invece valori di EC₅₀ più alti, associati a soluzioni più concentrate. È presente però un'eccezione: i test condotti sul prodotto *Biophura* identificato dai produttori “green”, sebbene possieda la relativa etichettatura, hanno ricavato un valore di EC₅₀ non in linea con le aspettative.

Il detergente risulta essere infatti molto tossico per questi organismi già a basse concentrazioni; pertanto, il valore di EC₅₀ misurato è molto basso (19,205 mg/L).

I valori di EC₅₀ osservabili nel *grafico n° 23* sono riportati in ordine crescente: questo per mettere in evidenza che le *Daphniae* risultano essere meno sensibili al detersivo *Winni's*, il cui valore che ha provocato la morte del 50% degli individui è il più alto osservato rispetto a tutti gli altri (133,936 mg/L); per questo prodotto si arriva inoltre a testare la concentrazione più alta saggiata: 296 mg/L, senza riscontrare una mortalità totale (93,3%).

Al contrario, si può affermare che il detersivo *Dixan*, risulta essere il prodotto più tossico per questo organismo: infatti, il valore di EC₅₀ più basso è stato ricavato da questo test. A tal proposito, la più bassa concentrazione a cui sono stati esposti gli animali è 5 mg/L, testata sia per questo prodotto che per *Biophura*.

6.2. TEST CONDOTTI SULL'ALGA *RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA*

Dai risultati ottenuti dai test di tossicità acuta con *Raphidocelis subcapitata*, si può affermare che in generale questo organismo, rispetto al crostaceo *Daphnia magna*, è più tollerante nei confronti di questi detersivi per il bucato. Infatti, le concentrazioni in mg/L in cui si è ritrovato il valore di EC₅₀ sono più elevate soprattutto nei prodotti *Sole* e *Green Emotion*.

Non si può affermare che i risultati ottenuti da questi test siano in linea con quanto ci si aspettava: in questo caso il detersivo *Sole* si interpone tra i due detersivi “green”, come si evince dal *grafico n° 24*. Nonostante sia considerato un detersivo tradizionale, infatti, risulta essere meno tossico per questo organismo rispetto a *Winni's*, che è stato il meglio tollerato da *Daphnia magna*.

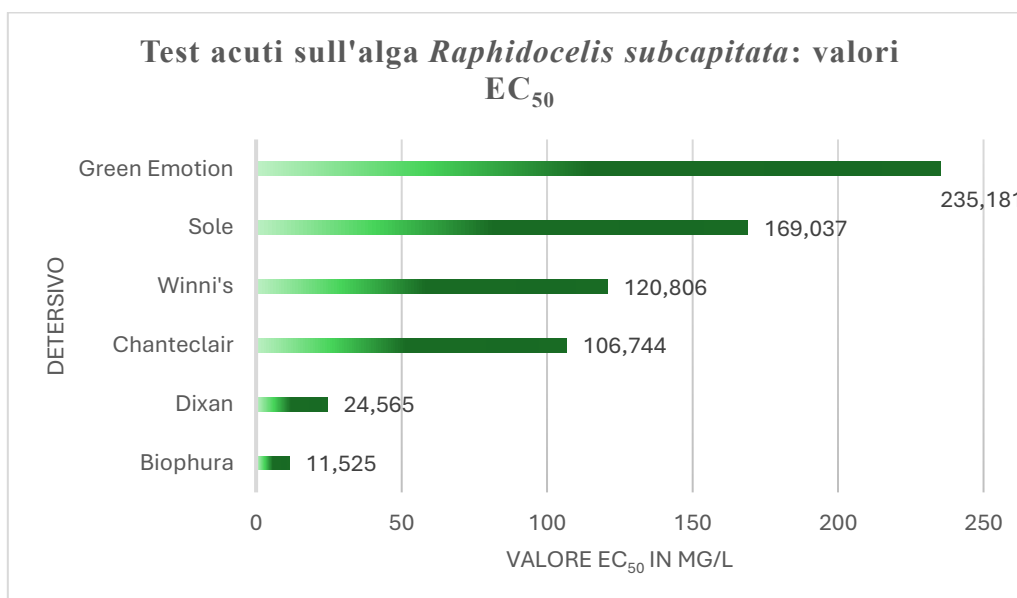


Grafico n° 24: vengono riportati in ordine crescente i valori di EC₅₀ per ogni detersivo, ottenuti dai test acuti condotti sull'alga *Raphidocelis subcapitata*.

Per *Green Emotion* si è ricavato il valore di EC₅₀ più alto tra tutti (235,181 mg/L).

Anche in questi test, il detersivo *Biophura* rappresenta un'anomalia rispetto agli altri detersivi "green": in questo caso addirittura si ricava il valore di EC₅₀ più basso (11,525 mg/L). Questo fornisce informazioni circa la sensibilità di entrambi gli organismi sottoposti ai saggi, i quali risultano essere entrambi poco tolleranti nei confronti di questo prodotto.

Una considerazione comune ai due test si può fare per *Dixan* e *Sole*: anche in questi saggi rappresentano rispettivamente il più e il meno tossico tra i detersivi tradizionali.

6.3. TEST CONDOTTI SUL BATTERIO *VIBRIO FISCHERI*

Come si può evincere dal grafico n° 25, i valori di EC₅₀ estrapolati dai test condotti sul batterio *Vibrio fischeri*, sono più bassi rispetto ai test effettuati sottoponendo gli organismi precedentemente considerati. Si può affermare pertanto che questo organismo risulta essere, tra i tre, quello che possiede una sensibilità maggiore nei confronti di questi prodotti.

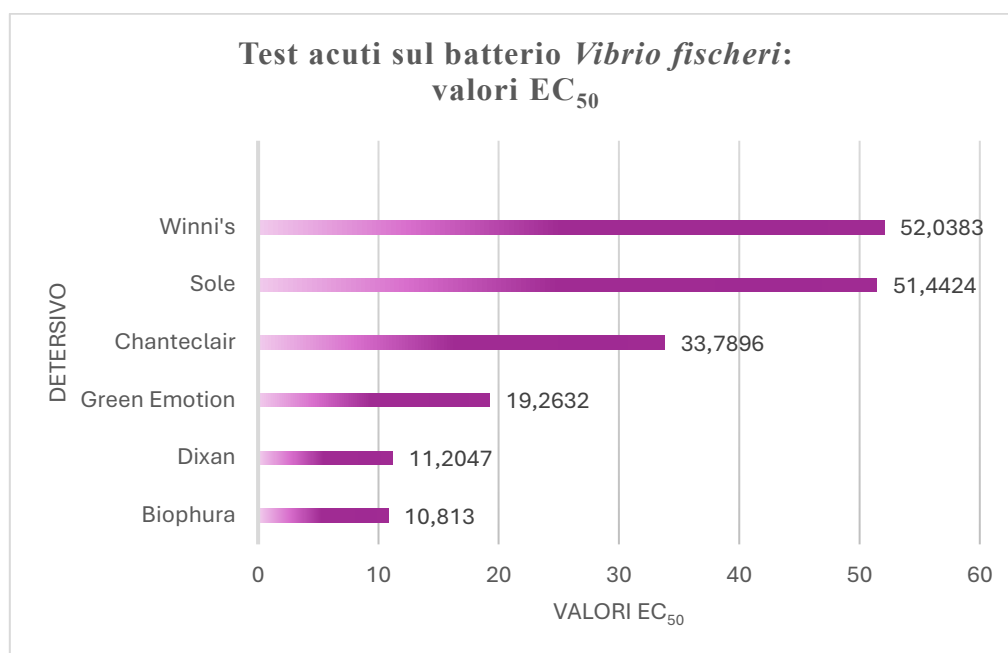


Grafico n° 25: vengono riportati in ordine crescente i valori di EC₅₀ per ogni detersivo, ottenuti dai test acuti condotti sul batterio *Vibrio fischeri*.

I risultati non sono in linea con le aspettative: non si riscontra una differenza sostanziale tra prodotti "green" e tradizionali. In particolare, *Green Emotion* in questo caso presenta un valore di EC₅₀ più basso rispetto ai test condotti precedentemente (19,2632 mg/L). Inoltre, il batterio risulta essere più tollerante nei confronti di *Chanteclair*, diversamente da quanto ottenuto nei saggi precedenti.

I detersivi *Dixan* e *Biophura* invece risultano i prodotti "tradizionali" e "green" rispettivamente più impattanti anche per quanto concerne i test condotti su questo organismo.

Un'altra considerazione comune con gli altri test è la seguente: il prodotto *Sole* risulta essere, ancora una volta, il detergente tradizionale più tollerato; al contrario *Dixan* per la terza volta è il detersivo tradizionale meno sopportato.

Il valore di EC₅₀ più basso è risultato essere, anche in questo caso, quello ricavato dal detersivo *Biophura*, che si riconferma essere il più tossico in assoluto. Il batterio risulta essere più tollerante nei confronti di *Winni's* che occupa la posizione più alta come per i test condotti su *Daphnia magna*.

7. CONCLUSIONE

I risultati ottenuti da questo esperimento permettono di confrontare gli effetti di detersivi “green” e tradizionali rappresentativi, attraverso una batteria di saggi ecotossicologici (*Grafico n° 26*).

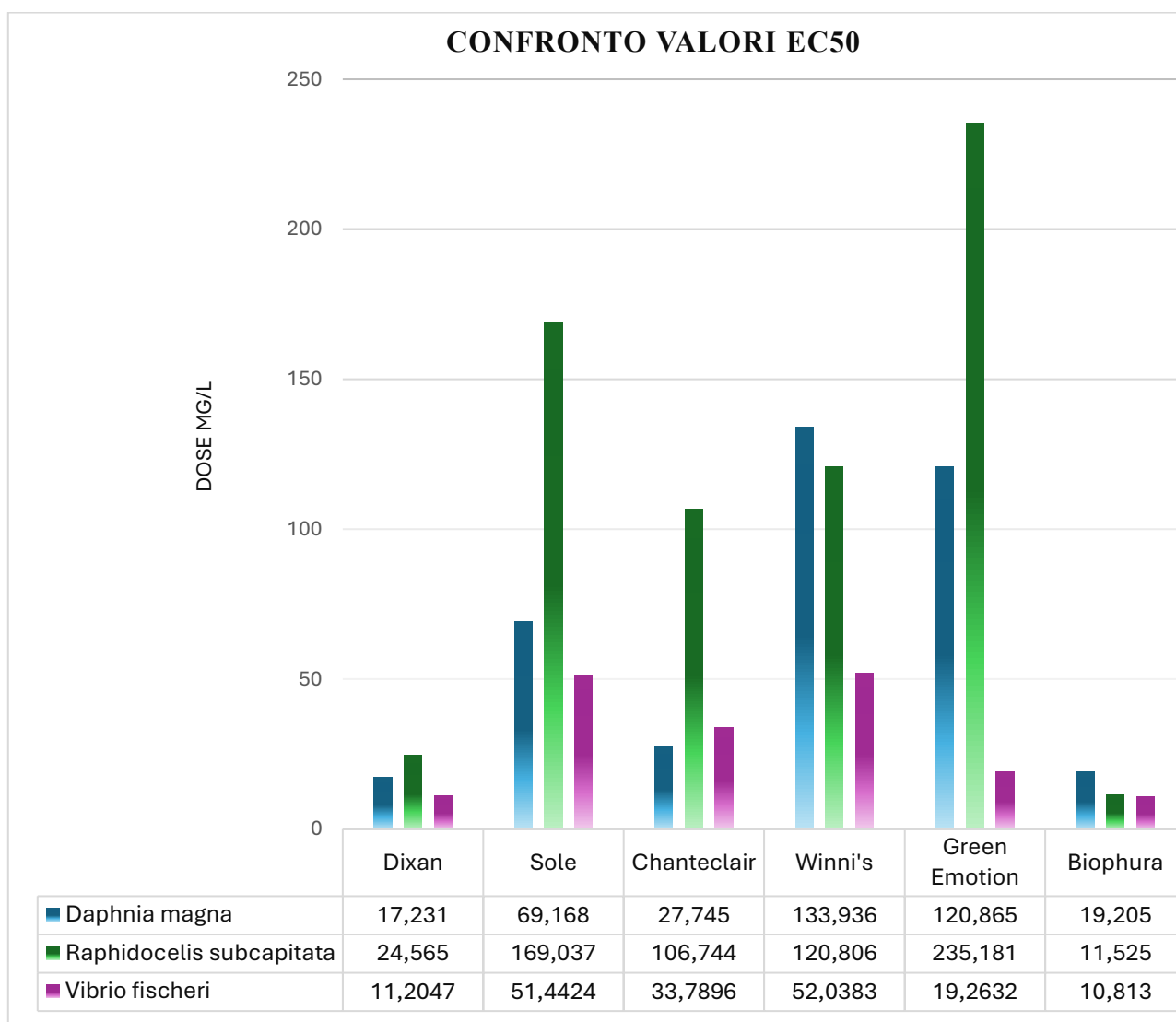


Grafico n° 26: valori di EC₅₀ estratti dai test condotti su: *Daphnia magna*, *Raphidocelis subcapitata* e *Vibrio fischeri* raggruppati per detersivo. I primi tre prodotti sono di uso “tradizionale” mentre gli ultimi tre “green”.

Per quanto concerne i prodotti meno tollerati:

- In media i detersivi *Dixan* e *Biophura* si sono rivelati i prodotti rispettivamente “*tradizionali*” e “*green*” più tossici in tutti e tre i test condotti.
- *Biophura* per ben due organismi (*Raphidocelis subcapitata* e *Vibrio fischeri*) è il meno tollerato in assoluto.

Si può sicuramente affermare che l’etichettatura presente nel prodotto non lo rappresenti nella sua totalità, almeno per quanto riguarda gli effetti considerati nei test condotti sui tre organismi selezionati per questo studio: tutti e tre gli individui percepiscono la tossicità del detergente e si sono dimostrate conseguenze letali già a partire da basse concentrazioni.

- *Dixan* si è dimostrato il più tossico dalla specie *Daphnia magna*, anche se la differenza con *Biophura* è minima.

Per quanto concerne i prodotti meglio tollerati:

- In generale si può affermare che, ad eccezione di *Biophura*, i detersivi meglio sopportati da tutti e tre gli organismi rientrano nella categoria “*green*”.
- Il prodotto tradizionale meno tossico è *Sole* per tutti e tre gli organismi.
- *Winni’s* risulta essere il più tollerato sia per la specie *Daphnia magna* che per la specie *Vibrio fischeri*.
- *Green Emotion* risulta essere meglio sopportato da *Raphidocelis subcapitata*.

8. PROSPETTIVE FUTURE

Le conclusioni tratte da questo studio sperimentale avvalorano la necessità di compiere studi sperimentali su altri detersivi e in generale su altre categorie di prodotti emergenti, in quanto, i risultati ottenuti per alcuni composti, non possono assumere valore di carattere generale.

In futuro, sarebbe interessante approfondire con test di tossicità cronica considerando altri aspetti quali: il comportamento, la riproduzione, l'alimentazione, la mutagenicità e gli effetti cumulativi di detersivi diversi.

Inoltre, sarebbe auspicabile ampliare la gamma di organismi modello e valutare il destino dei vari prodotti nei comparti ambientali, studiando sia il fenomeno del bioaccumulo, sia il processo di *biorisanamento*¹⁰.

Per quanto concerne quest'ultima tecnica, in letteratura emergono diversi studi in cui le microalghe vengono utilizzate per trattare le acque reflue contenenti prodotti farmaceutici e per la cura personale (Sasmitha et. al., 2023; Lijian et.al; 2020). In particolare, negli ultimi tre anni si è registrato un aumento del numero di pubblicazioni relative ai processi che utilizzano questi microrganismi per la rimozione degli antibiotici; sebbene ci si trovi ancora in una fase iniziale (Lijian et.al; 2020).

¹⁰ Con il termine "*biorisanamento*" si fa riferimento alle tecniche che sfruttano il processo di degradazione biologico, ovvero il potenziale metabolico dei microrganismi con lo scopo di trasformare un'ampia varietà di composti organici inquinanti attraverso reazioni chimiche che si svolgono come parte dei processi metabolici di questi organismi, batteri, funghi e piante; i quali possono essere autoctoni o inoculati direttamente nel sito contaminato. È una tecnica poco invasiva che non provoca alterazioni dell'ecosistema (Carabillò, 2025).

9. BIBLIOGRAFIA

Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., Iqbal, M. (2018). *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: a review. *Science of the Total Environment*, 626, 1295-1309.

Arnot, J.A. and Gobas, F.A.P.C. (2006) A Review of Bioconcentration Factor (BCF) and Bioaccumulation Factor (BAF) Assessments for Organic Chemicals in Aquatic Organisms. *Environmental Reviews*, 14, 257-297.

Balzamo, Stefania & Finocchiaro, Giovanni & Frizza, Cristina & Conti, Daniela & Martone, Cristina & Cadoni, Fabio. (2010). Proposta di una batteria minima di biosaggi per valutazioni di ecotossicità ambientale mediante analisi statistica multivariata.

Bajpai, D., & Tyagi, V. K. (2007). Laundry detergents: an overview. *Journal of oleo science*, 56(7), 327–340. <https://doi.org/10.5650/jos.56.327>.

Bazerman, Charles & Santos, René. (2005). Measuring Incommensurability: Are toxicology and ecotoxicology blind to what the other sees?.

Beijerinck MW. (1889). *Le Photobacterium luminosum*, Bactérie lumineuse de la Mer du Nord. *Arch Néerl Sci Exact Nat*, 23, 401-427.

Blaise, Christian & Vasseur, Paule. (2005). Algal Microplate Toxicity Test. 10.1007/1-4020-3120-3_4.

Bongrand C, Moriano-Gutierrez S, Arevalo P, McFall-Ngai M, Visick KL, Polz M, Ruby EG. Using Colonization Assays and Comparative Genomics To Discover Symbiosis Behaviors and Factors in *Vibrio fischeri*. *mBio*. 2020 Mar 3;11(2):e03407-19. doi: 10.1128/mBio.03407-19. PMID: 32127462; PMCID: PMC7064787.

Butler G.C., 1978 - Principles of Toxicology. SCOPE 12. John Wiley and Sons. Chichester.

Canesi, L., Borghi, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Lorusso, L. C., Vergani, L., Marcomini, A., & Poiana, G. (2008). Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 87(4), 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.02.007>.

Carpenter, Kathleen. (2008). A study of the fauna of rivers polluted by lead mining in the Aberystwyth District of Cardiganshire. *Annals of Applied Biology*. 11. 1 - 23. [10.1111/j.1744-7348.1924.tb05689.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1924.tb05689.x).

Chavoshani A., M. Hashemi, MM. Amin, SC. Ameta. Elsevier (2020) *Micropollutants and Challenges. Emerging in the Aquatic Environments and Treatment Processes*. 1st Edition - June 12, 2020. Paperback ISBN: 9780128186121. eBook ISBN: 9780128186138.

Chen, S. S., Sun, Y., Tsang, D. C., Graham, N. J., Ok, Y. S., Feng, Y., & Li, X. D. (2017). Potenziale impatto dell'acqua di ritorno derivante dalla fratturazione idraulica sulla qualità del suolo agricolo: bioaccessibilità metallo/metalloide, bioassay microtox e attività enzimatiche. *Scienza dell'ambiente totale*, 579, 1419-1426.

Chèvre N, Gregorio V (2013) Effetti delle miscele in ecotossicologia. In: Férard J-F, Blaise C (a cura di) *Enciclopedia di ecotossicologia acquatica*. Springer, Paesi Bassi, Dordrecht, pp 729–736

Cizmas, L., Sharma, V. K., Gray, C. M., & McDonald, T. J. (2015). Pharmaceuticals and personal care products in waters: occurrence, toxicity, and risk. *Environmental chemistry letters*, 13(4), 381–394. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0524-4>.

Cooper, S. (2001), Helical growth and the curved shape of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiology Letters*, 198: 123-124. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10629.x>.

Daughton, C. G., & Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?. *Environmental health perspectives*, 107 Suppl 6(Suppl 6), 907–938. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s6907>.

Ducrot Virginie, Philippe Usseglio-Polatera, Alexandre R.R. Pery, Jacques Mouthon, Michel Lafont, et al.. Using Aquatic Macroinvertebrate Species Traits To Build Test Batteries For Sediment Toxicity Assessment: Accounting For The Diversity Of Potential Biological Responses To Toxicants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2005, 24 (9), pp.2306. {10.1897/04-559R.1}. {hal-03102349}.

Dunn A. K. (2012). *Vibrio fischeri* metabolism: symbiosis and beyond. *Advances in microbial physiology*, 61, 37–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394423-8.00002-0>.

Ebert D. (2022). *Daphnia* as a versatile model system in ecology and evolution. *EvoDevo*, 13(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13227-022-00199-0>.

- Echazarreta, M. A., & Klose, K. E. (2019). Vibrio Flagellar Synthesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 131. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00131>.
- Fawley, M.W., Dean, M.L., Dimmer, S.K. and Fawley, K.P. (2006), Evaluating The Morphospecies Concept In The Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta)1. *Journal of Phycology*, 42: 142-154. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00169.x>
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxēaus, N., Giudice, R. L., ... & Garric, J. (2004). Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment?. *Environmental toxicology and chemistry*, 23(5), 1344-1354.
- Fogg Gordon Elliott, Thake Brenda. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*.. Editore: Univ of Wisconsin Press, 1987. ISBN 0299105601, 9780299105600. Lunghezza 269 pagine
- Forbes V.E., Forbes T.L., 1994 - *Ecotoxicology in theory and practice*. London: Chapman & Hall.
- Gaggi C., 1998 - Saggi ecotossicologici di laboratorio. In: *Ecotossicologia – Trattato di farmacologia e terapia*, Utet Edizioni.
- Global Web Index. (2018). The rise of green consumerism: What do brands need to know. *Global Web Index*. Retrieved March 19, 2020, from: <https://blog.globalwebindex.com/chart-of-the-week/green-consumerism>.
- Gray, A. D., Miller, J. A., & Weinstein, J. E. (2022). Are Green Household Consumer Products Less Toxic than Conventional Products? An Assessment Involving Grass Shrimp (*Palaemon pugio*) and *Daphnia magna*. *Environmental toxicology and chemistry*, 41(10), 2444–2453. <https://doi.org/10.1002/etc.5435>.
- Gros, M., Petrović, M., Ginebreda, A., & Barceló, D. (2010). Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment international*, 36(1), 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.09.002>.
- Gu, M. B., Mitchell, R. J., & Kim, B. C. (2004). Biosensori a base di cellule intere per il biomonitoraggio ambientale e l'applicazione. *Biochimica e biotecnologia*, 269-305.
- Harris, J. B., LaRocque, R. C., Qadri, F., Ryan, E. T., & Calderwood, S. B. (2012). Cholera. *Lancet* (London, England), 379(9835), 2466–2476. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60436-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60436-X).

Hindák Frantisek. Autore: Veda, Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, 1977. Studies on the Chlorococcal Algae (Chlorophyceae). Volume 36. ISBN: 8022401374, 9788022401371.

Holt JG (1994). Manuale di Batteriologia Determinativa di Bergey, 9^a ed., Williams & Wilkins. ISBN 0-683-00603-7.

Jianchao Liu, Jie Shen, Guanghua Lu, Xinlei Xu, Haohan Yang, Zhenhua Yan, Wei Chen, Multilevel ecotoxicity assessment of environmentally relevant bisphenol F concentrations in *Daphnia magna*, *Chemosphere*, Volume 240, 2020, 124917, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124917>.

Jyoti, D., & Sinha, R. (2023). Physiological impact of personal care product constituents on non-target aquatic organisms. *The Science of the total environment*, 905, 167229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167229>.

Kenaga Eugene E. Aquatic test organisms and methods useful for assessment of chronic toxicity of chemicals, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Volume 1, Issue 3, 1981, Pages 277-292, ISSN 0273-2300, [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(81\)90077-5](https://doi.org/10.1016/0273-2300(81)90077-5). (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0273230081900775>).

Körner W, Hanf V, Schuller W, et al. Validation and application of a rapid in vitro assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals. *Chemosphere*. 1998 Oct-Nov;37(9-12):2395-2407. DOI: 10.1016/s0045-6535(98)00297-5. PMID: 9828346.

Krienitz, Lothar & Bock, Christina. (2012). Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. *Hydrobiologia*. 698. 10.1007/s10750-012-1079-z.

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 Crescent-Shaped Chlorophyta (1). *Journal of phycology*, 47(4), 880–893. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01010.x>.

Leusch, F. D., Neale, P. A., Busetti, F., Card, M., Humpage, A., Orbell, J. D., Neale P.A. Busetti F., Card M. Humpage A., Ridgway H.F., Stewart M.B., van de Merwe J. P., Escher, B. I. (2019). Transformation of endocrine disrupting chemicals, pharmaceutical and personal care products during drinking water disinfection. *Science of The Total Environment*, 657, 1480-1490.

Lewis, M.A. (1990) I dati di tossicità derivati in laboratorio per le alghe d'acqua dolce valgono lo sforzo? *Ambiente. Tossicologia. Chimica.* 1990, 9, pp. 1279-1284.

Lijian Leng, Liang Wei, Qin Xiong, Siyu Xu, Wenting Li, Sen Lv, Qian Lu, Liping Wan, Zhiyou Wen, Wenguang Zhou, Use of microalgae based technology for the removal of antibiotics from wastewater: A review, *Chemosphere*, Volume 238, 2020, 124680, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124680>.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653519319046>).

Lippi, D., & Gotuzzo, E. (2014). The greatest steps towards the discovery of *Vibrio cholerae*. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(3), 191–195. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12390>

Luo, L., Zhang, Q., Kong, X., Huang, H., & Ke, C. (2017). Differential effects of bisphenol A toxicity on oyster (*Crassostrea angulata*) gonads as revealed by label-free quantitative proteomics. *Chemosphere*, 176, 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.146>.

Machado, M. D., & Soares, E. V. (2024). Features of the microalga *Raphidocelis subcapitata*: physiology and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 108(1), 219. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13038-0>.

Macedo, S., Torres, T., & Santos, M. M. (2017). Methyl-triclosan and triclosan impact embryonic development of *Danio rerio* and *Paracentrotus lividus*. *Ecotoxicology (London, England)*, 26(4), 482–489. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1778-3>.

Madigan, Michael; Martinko, John (editori) (2005). *Brock Biologia dei microrganismi*, 11^a ed., Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-1.

Marchini S. (2005). Ecotossicologia e qualità delle acque [Ecotoxicology and water quality]. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 41(3), 371–379.

Matozzo, V., & Marin, M. G. (2025). Feature Papers in Ecotoxicology. *Journal of xenobiotics*, 15(3), 62. <https://doi.org/10.3390/jox15030062>.

Montes-Grajales, D., Fennix-Agudelo, M., & Miranda-Castro, W. (2017). Occurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources: A review. *The Science of the total environment*, 595, 601–614. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.286>.

Morales M., Martínez-Paz P., Sánchez-Argüello P., Morcillo G., Martínez-Guitarte J.L. Bisphenol A (BPA) modulates the expression of endocrine and stress response genes in the freshwater snail *Physa acuta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 152 (2018), pp. 132-138.

Moriarty, F. *Ecotoxicology: The Study of Pollutants in Ecosystems*. 2nd ed., Academic Press, 1988.

Mushtaq, N. & Singh, Dig & Bhat, Rouf & Dervash, Moonisa & Hameed, Omar. (2020). *Freshwater Contamination: Sources and Hazards to Aquatic Biota*. 10.1007/978-981-13-8277-2_3.

Payne, A.G., Hall, R.H. Un metodo per misurare la tossicità algale e la sua applicazione nella valutazione della sicurezza di nuove sostanze chimiche. In: Marking, L.L., editore. *Tossicologia acquatica*, pp. 171-180. Società Americana per i Test e i Materiali, Philadelphia, PA, 1979. (Pubblicazione Tecnica Speciale 667.).

Parolini, M., Magni, S., Traversi, I., Villa, S., Finizio, A., & Binelli, A. (2015). Environmentally relevant concentrations of galaxolide (HHCB) and tonalide (AHTN) induced oxidative and genetic damage in *Dreissena polymorpha*. *Journal of hazardous materials*, 285, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.11.037>.

Peng, X., Fan, Y., Jin, J., Xiong, S., Liu, J., & Tang, C. (2017). Bioaccumulation and biomagnification of ultraviolet absorbents in marine wildlife of the Pearl River Estuarine, South China Sea. *Environmental pollution* (Barking, Essex : 1987), 225, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.035>.

Priyanka Priyanka, Gemma K. Kinsella, Gary T. Henehan, Barry J. Ryan, Enzymatic in-situ transesterification of neutral lipids from simulated wastewater cultured *Chlorella emersonii* and *Pseudokirchneriella subcapitata* to sustainably produce fatty acid methyl esters, *Bioresource Technology Reports*, Volume 11, 2020, 100489, ISSN 2589-014X, <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100489>.

Renaud, F., Warnau, M., Oberhänsli, F., Teyssié, J. L., Temara, A., Rouleau, C., & Metian, M. (2014). Bioconcentration of the anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in the marine shrimp *Palaemonetes varians*: a radiotracer study. *Marine pollution bulletin*, 85(1), 244–247. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.023>.

Rilievo, G.; Fabrello, J.; Roverso, M.; Bogialli, S.; Matozzo, V. Effects of the Fragrance Galaxolide on the Biomarker Responses of the Clam *Ruditapes philippinarum*. *J. Mar. Sci. Eng.* 2021, 9, 509.

Salmani, M. H., Garzegar, S., Ehrampoush, M. H., & Askarishahi, M. (2021). Predicting anionic surfactant toxicity to *Daphnia magna* in aquatic environment: a green approach for evaluation of EC₅₀ values. *Environmental science and pollution research international*, 28(36), 50731–50746. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14107-x>.

Santos, L. H., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., & Montenegro, M. C. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, 175(1-3), 45–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>.

Sarter, S., Metayer, I., & Zakhia, N. (2008). Effects of mycotoxins, aflatoxin B1 and deoxynivalenol, on the bioluminescence of *Vibrio fischeri*. *World mycotoxin journal*, 1(2), 189-193.

Sasmitha Aulia Zahra, Imran Ahmad, Norhayati Abdullah, Koji Iwamoto, Ali Yuzir, 9 - Microalgae-based bioremediation of pharmaceuticals wastewater, Editor(s): Afzal Husain Khan, Nadeem A. Khan, Mu. Naushad, Hamidi Abdul Aziz, *The Treatment of Pharmaceutical Wastewater*, Elsevier, 2023, Pages 277-309, ISBN 9780323991605, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99160-5.00014-X>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978032399160500014X>).

Septer, A. N., & Visick, K. L. (2024). Lighting the way: how the *Vibrio fischeri* model microbe reveals the complexity of Earth's "simplest" life forms. *Journal of bacteriology*, 206(5), e0003524. <https://doi.org/10.1128/jb.00035-24>.

Shahnawaz Ahmed. (2023). Applications of *Daphnia magna* in Ecotoxicological Studies: A Review. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*. 6. 16-35.

Susmi, T.S. & Rebello, Sharrel & Shanavas, Jisha & Sherief, Panickenparampil. (2010). Toxic effects of sodium dodecyl sulfate on grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Fish Technol.* 47. 157-162.

Suzuki, Shigekatsu & Yamaguchi, Haruyo & Nakajima, Nobuyoshi & Kawachi, Masanobu. (2018). *Raphidocelis subcapitata* (=Pseudokirchneriella subcapitata) provides an insight into genome evolution and environmental adaptations in the Sphaeropleales. *Scientific Reports*. 8. [10.1038/s41598-018-26331-6](https://doi.org/10.1038/s41598-018-26331-6).

Trantallidi, M., Dimitroulopoulou, C., Wolkoff, P., Kephelopoulos, S., & Carrer, P. (2015). EPHECT III: Health risk assessment of exposure to household consumer products. *The Science of the total environment*, 536, 903–913. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.123>.

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*, 57(Pt 12), 2823–2829. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65081-0>.

Wang Wenting, Hyeon-Seo Cho, Kyungtae Kim, Kyunghwa Park, Jeong-Eun Oh, Tissue-specific distribution and bioaccumulation of cyclic and linear siloxanes in South Korean crucian carp (*carassius carassius*), *Environmental Pollution*, Volume 288, 2021, 117789, ISSN 0269-7491, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117789>.

Warne, M. S., & Schifko, A. D. (1999). Toxicity of laundry detergent components to a freshwater cladoceran and their contribution to detergent toxicity. *Ecotoxicology and environmental safety*, 44(2), 196–206. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1824>.

Weyers, A., Vollmer, G. Inibizione della crescita delle alghe: effetto della scelta del tasso di crescita o della biomassa come endpoint sulla classificazione ed etichettatura delle nuove sostanze notificate nell'UE. *Chemosphere* 2000, 41, pp. 1007-1010.

Wuerz, Maggie & Huebner, Erwin & Huebner, Judith. (2017). The morphology of the male reproductive system, spermatogenesis and the spermatozoon of *Daphnia magna* (Crustacea: Branchiopoda). *Journal of morphology*. 278. [10.1002/jmor.20729](https://doi.org/10.1002/jmor.20729).

Wilkinson, J., Hooda, P. S., Barker, J., Barton, S., & Swinden, J. (2017). Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 231(Pt 1), 954–970. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.032>.

Xie, H., Hao, H., Xu, N., Liang, X., Gao, D., Xu, Y., Gao, Y., Tao, H., & Wong, M. (2019). Pharmaceuticals and personal care products in water, sediments, aquatic organisms, and fish feeds in the Pearl River Delta: Occurrence, distribution, potential sources, and health risk assessment. *The Science of the total environment*, 659, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.222>.

Xu X, Xu Y, Xu N, Pan B, Ni J. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water, sediment and freshwater mollusks of the Dongting Lake downstream the Three Gorges Dam. *Chemosphere*. 2022 Aug;301:134721. doi: [10.1016/j.chemosphere.2022.134721](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134721). Epub 2022 Apr 26. PMID: 35483658.

10. MANUALI, LINEE GUIDA E NORME

Mancini L, Lacchetti I, Cacioli S, Carere M (Ed.). Ecotossicologia e salute: approcci metodologici. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporti ISTISAN 20/6).

APAT (Agenzia per la Protezione Dell'ambiente e Per i Servizi Tecnici) Rapporti 71/2006. L'Ecotossicologia negli ambienti acquatici. Prima ricognizione dello stato dell'arte nelle Agenzie. www.apat.it ISBN 88-448-0188-4. Autori: Amendola Antonella, Cerioli Nadia Lucia, Conca Claudia, Testa Simona e Lisi Angelo.

Russo Francesca. Università degli studi di Napoli Federico II. Dottorato in Salvaguardia e Gestione delle Risorse Naturali per uno Sviluppo Sostenibile. Anno Accademico 2007-2008. “*Sviluppo di metodiche per la caratterizzazione ecotossicologica di miscele di farmaci: protocolli sperimentali*”.

APAT - IRSA/CNR. (Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici, Istituto di Ricerca sulle Acque Consiglio Nazionale delle Ricerche) Manuali e linee guida. 29/2003. ISBN: 88-448-0083-7. Autori: Maria Belli, Damiano Centioli, Paolo de Zorzi, Umberto Sansone (Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici - APAT) Silvio Capri, Romano Pagnotta, Maurizio Pettine (Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR-IRSA). Volume Terzo, sezione 8000 - Metodi Ecotossicologici.

ANPA (2001) RTI CTN_AIM 04/2001. Elementi per la caratterizzazione fisicochimica biologica ed ecotossicologica dei parametri addizionali (D.Lgs. 152/99) nella matrice acquosa, nel sedimento e nel biota.

ECETOC, 1993. *Aquatic Toxicity Data Evaluation*. ECETOC: 64 pp.

ASTM, 1994. Standard Guide for Designing Biological Tests With Sediments. ASTM E1525: 22 pp.

Baudo, Renato & Faimali, Marco & Onorati, Fulvio & Pellegrini, David. (2011). Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre. I manuali di ecotossicologia. Manuali e linee guida 67/2011. ((Arrays of ecotoxicological assays for salt and brackish waters sediments. Manuals of ecotoxicology. Manuals and guidelines 67/2011).

Buttino Isabella. (2011). Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre. ISPRA Manuali e linee guida. 88/2013. ISBN: 978-88-448-0607-1.

ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti e acque interne. I manuali di ecotossicologia. Manuali e Linee Guida 88/2013. www.ispramambiente.it ISBN 978-88-448-0607-1. Autori: Baudo Renato, Faimani Marco; Onorati Fulvio; Pellegrini David e Mugnai Cristian.

Direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 23 ottobre 2000, che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. Gazzetta ufficiale n. L 327 del 22/12/2000 pag. 0001 – 0073.

ISO, 2012b. Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO 8692:2012.

ISO/DIS, 13308, 2011. Water quality - Toxicity test based on reproduction inhibition of the green macroalga *Ulva pertusa*.

UNICHIM, 2003. Qualità dell'acqua – Determinazione dell'inibizione della germinazione e allungamento radicale *Cucumis sativus* L. (Cetriolo), *Lepidium sativum* L. (Crescione), *Sorghum saccharatum* Moench (Sorgo) (Saggio di tossicità cronica breve). MU N. 1651, Edizione 2003.

APAT-IRSA, 2003b. 8020. Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia* In: *Metodi analitici per le acque*, 8000 – Metodi ecotossicologici. Manuali e Linee Guida 29/2003.

ISO 20665:2008. Water quality — Determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia*. Published (Edition 1, 2008)

APAT-IRSA, 2003c. 8100. Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con *Ceriodaphnia dubia*. In: *Metodi analitici per le acque*, 8000 – Metodi ecotossicologici. Manuali e Linee Guida 29/2003.

APAT-IRSA, 2003d. 8040. Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Ceriodaphnia dubia*. In: *Metodi analitici per le acque*, 8000 – Metodi ecotossicologici. Manuali e Linee Guida 29/2003.

APAT-IRSA, 2003a. 8030 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con batteri bioluminescenti. In: *Metodi analitici per le acque*, 8000 – Metodi ecotossicologici. Manuali e Linee Guida 29/2003.

APAT-IRSA, 2003e. 8010. Metodi di valutazione della tossicità con pesci. In: *Metodi analitici per le acque*, 8000 – Metodi ecotossicologici. Manuali e Linee Guida 29/2003.

Stignani Valentina. Tesi di laurea in Metodi Ecologici per l'Analisi e la Gestione dell'Ambiente. Anno Accademico 2011/2012. Alma Mater Studiorum Università Di Bologna. Facoltà Di Scienze Matematiche, Fisiche E Naturali. Corso Di Laurea Magistrale In Analisi E Gestione Dell'ambiente *“Valutazione del rischio ecologico di residui di farmaci nell'ambiente: analisi sperimentale della tossicità sul crostaceo Daphnia magna”*.

Azzolin Alice. Elaborato di laurea. Anno accademico 2022/2023. Università Degli Studi Di Padova. Dipartimento Di Biologia. Corso di Laurea in Scienze Naturali *“Indagini ecotossicologiche con organismi di acqua dolce per la determinazione della classe di pericolo dei rifiuti”*.

UNI EN ISO 7346-1, 2000. Qualità dell'acqua - Determinazione della tossicità letale acuta di sostanze su pesce di acqua dolce [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Parte 1: Metodo statico – Parte 2: Metodo semistatico – Parte 3: Metodo in flusso continuo.

OECD (2025), Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>.

Direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.

NORCCA (2023a) *Raphidocelis subcapitata*. Strain NIVA-CHL 1. La Collezione Norvegese di Alghe. . <https://norcca.scrol.net/strain/niva-chl-1>.

OECD (2019), Pharmaceutical Residues in Freshwater: Hazards and Policy Responses, OECD Studies on Water, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/c936f42d-en>.

Porretti Miriam. Corso di dottorato di ricerca in Biologia Applicata e Medicina sperimentale. Università degli studi di Messina. Dipartimento di scienze chimiche biologiche farmaceutiche ed ambientali. Anno accademico 2023/2024. *“Contaminanti Organici nei Prodotti per la Cura Personale: bioaccumulo ed effetti in vivo e in vitro su organismi acquatici e sull'uomo”*. <https://hdl.handle.net/20.500.14242/354789>.

Carabillò Michele, 2025. PhD Course in Chemical, Environmental, Biomedical, Hydraulic and Materials Engineering. Dipartimento di Ingegneria. Settore Scientifico Disciplinare (S:S:D: ICAR/03). Università Degli Studi Di Palermo. *“Biorisanamento di acque di falda contaminate da solventi clorurati nell'ottica dell'economia circolare”*.

11. RINGRAZIAMENTI

Dedico il primo ringraziamento alla mia relatrice: la prof.ssa Pastoris Ornella, per avermi aiutato nella ricerca di un ente esterno presso cui svolgere il mio internato di tesi e per il suo supporto durante la stesura della stessa.

Un ringraziamento speciale è rivolto a Laura, a Giulia e a tutto il laboratorio di microbiologia ambientale ed ecotossicologia dell'azienda *LabAnalysis*, che mi hanno accolto durante il mio percorso guidandomi con cura nella stesura di questo elaborato.

Alla mia famiglia, che mi è sempre stata accanto; e, ancora una volta, ha creduto in me prima che lo facessi io.

A chi ha fatto parte di questo percorso e a chi continua a farne parte. A chi c'è stato anche solamente con una parola di conforto. Voi sapete.

A chi - non respirando più con me - continua a vivere al mio fianco guardandomi da un posto che io non vedo.

Infine, grazie a me stessa.

“Per la forza che ho trovato dentro di me quando sono stata costretta a farlo. E per la speranza indomabile.”