



Università
Ca'Foscari
Venezia

Corso di Laurea magistrale in Scienze ambientali (LM-75)

-

Effetti a lungo termine derivanti dall'esposizione a tre pesticidi neonicotinoidi sul copepode calanoide *Acartia tonsa*

Relatori:

Prof. Marco Picone

Laureando:

Marco Baccichet

Matricola:

865242

Anno accademico:

2020/2021

INDICE

1) ABSTRACT	5
2) OBIETTIVI	6
3) INTRODUZIONE	7
3.1) I NEONICOTINOIDI.....	7
3.2) STRUTTURA E PROPRIETA CHIMICO-FISICHE.....	12
3.3) MECCANISMO DI AZIONE DEI NEONICOTINOIDI.....	16
3.4) ACETAMIPRID (ACE).....	18
3.5) THIAMETHOXAM (TMX).....	19
3.6) THIAACLOPRID (THI).....	20
3.7) L'IMPIEGO DI <i>ACARTIA TONSA</i> COME BIONDICATORE.....	21
3.8) BIONDICATORI: COPEPODI.....	23
3.9) <i>ACARTIA TONSA</i> - BIOLOGIA ED ECOLOGIA.....	24
3.10) DISTRIBUZIONE DI <i>ACARTIA TONSA</i>	25
3.11) MORFOLOGIA DI <i>ACARTIA TONSA</i>	25
3.12) <i>ACARTIA TONSA</i> NEI SAGGI DI TOSSICITA'.....	30
4) MATERIALI E METODI	31
4.1) TEST CRONICO – METOLODOLOGIE.....	34
4.2) TEST PRODUZIONE DI UOVA (Egg production test).....	36
4.3) TEST DI SVILUPPO LARVALE UTILIZZANDOLA GENERAZIONE PARENTALE F ₁	37
4.4) LDR-ESPRESSIONE DEL RISULTATO E ANALISI STATISTICA.....	40
5) RISULTATI	42
5.1) ACETAMIPRID.....	42
5.1.1) TEST - EGG PRODUCTION (ACE).....	42
5.1.2) TEST - LDR (ACE).....	43
5.2) THIAACLOPRID.....	46
5.2.1) TEST- EGG PRODUCTION (THI).....	46
5.2.2) TEST – LDR (THI).....	47

5.3) THIAMETHOXAM.....	49
5.3.1) TEST – EGG PRODUCTION (TMX).....	49
5.3.2) TEST – LDR (TMX)	50
6) DISCUSSIONE.....	53
6.1) ACETAMIPRID.....	53
6.2) THIACTOPRID.....	54
6.3) THIAMETHOXAM.....	55
6.4) CONFRONTO CON ALTRI INDICATORI PER AMBIENTI MARINI ED ESTUARINI.....	56
7) CONCLUSIONI.....	58
8) BIBLIOGRAFIA.....	60
9) SITOGRAFIA.....	69
10) ALLEGATI.....	70

1. ABSTRACT

I pesticidi neonicotinoidi sono tra gli insetticidi attualmente più diffusi e utilizzati. Le informazioni riguardanti la loro tossicità sono tutt'ora scarse e focalizzate prevalentemente negli ambienti marini. Lo scopo di questo lavoro quindi è stato quello di verificare, tramite un test di tossicità cronica, gli effetti derivanti da un'esposizione a lungo termine a tre prodotti appartenenti a questa classe di contaminanti, acetamiprid (ACE), thiacloprid (THI) e thiamethoxam (TMX). Il biondicatore utilizzato per questo test è *Acartia tonsa*, un copepode calanoide. Gli endopint tenuti in considerazione per stimare la tossicità sono: produzione giornaliera delle uova, schiusa di esse, mortalità larvale e variazioni nello sviluppo larvale. Per ciascun neonicotinoide sono state saggiate due differenti concentrazioni sub-letali, precisamente 10 e 100 ngL⁻¹, scelte sulla base di risultati precedentemente ottenuti con test di sviluppo larvale. TMX, alle concentrazioni utilizzate in questo lavoro, risulta non essere impattante per gli organismi. THI e ACE, invece, influiscono sulla quantità e sulla qualità delle uova, alterandone il corretto tasso di schiusa e il conseguente sviluppo larvale, incidendo anche sulla mortalità degli stadi giovanili.

2. OBIETTIVI

L'obiettivo di questo lavoro è l'identificazione, tramite test di tossicità, degli effetti derivanti da un'esposizione a lungo termine di alcuni pesticidi neonicotinoidi su di una specie di copepode calanoide, *Acartia tonsa*.

I contaminanti saggiati, i pesticidi neonicotinoidi, sono inseriti nella categoria dei contaminanti emergenti, ossia quei prodotti chimici di recente introduzione e per cui scarseggiano informazioni relative alla pericolosità. I neonicotinoidi, inoltre, sono stati identificati nel 2015 dalla Unione Europea come contaminanti di cui è necessario approfondire le conoscenze relative alla presenza nelle acque superficiali (Negrão et al. 2015). Essi sono ubiquitari e presenti in numerosi ambienti acquatici, ma i dati a disposizione relativi ai loro impatti, per quel che riguarda le acque salate, sono scarsi e tendenzialmente riguardanti solamente effetti studiati nel breve termine. L'obiettivo di questo lavoro dunque è la valutazione di quelli che potrebbero essere gli effetti derivanti da un'esposizione a lungo termine ad alcuni di questi pesticidi neonicotinoidi, nello specifico i principi attivi thiametoxam (TMX), thiacloprid (THI) e acetamiprid (ACE). Per valutare i danni generati da un'esposizione prolungata nel tempo, è stato realizzato un test di tossicità di tipologia cronica, ossia basato sulla somministrazione di piccole quantità di contaminante per un periodo esteso. La specie saggiata è *Acartia tonsa*, un copepode calanoide appartenente alla famiglia Acartidae, la quale, ricoprendo un ruolo di notevole importanza all'interno delle reti trofiche marine (ed estuarine), rende i dati ottenuti ecologicamente rilevanti. La tossicità è stata valutata analizzando la capacità riproduttiva dei copepodi, a seguito di una esposizione per l'intero ciclo vitale ai contaminanti. Nello specifico sono state valutate produzione di uova, la schiusa di esse, la mortalità larvale ed ipotetici ritardi nel normale sviluppo delle larve sopravvissute.

3. INTRODUZIONE

3.1 I NEONICOTINOIDI

I pesticidi neonicotinoidi sono la classe di insetticidi attualmente più utilizzata più in circolazione, con 120 paesi che ne permettono l'utilizzo. La versatilità di applicazione, l'efficacia di azione e la bassa quantità necessaria per ottenere risultati hanno reso questi prodotti gli insetticidi più diffusi e utilizzati in commercio. Essi, introdotti negli anni 90', hanno prevaricato prodotti precedenti quali pesticidi organoclorurati, organofosforici, carbammati e piretroidi. I neonicotinoidi nascono quindi per la necessità di contrastare problematiche riscontrate con altre classi di pesticidi, quali l'insorgenza di effetti derivanti da un'esposizione cumulativa, oppure la comparsa di forme di resistenza. Il primo tra questi ad essere prodotto e commercializzato è stato l'imidacloprid (IMI) nel 1991, a cui sono stati aggiunti successivamente acetamiprid (ACE), nitenpyram(NIT), thiamethoxam (TMX), thiacloprid (THI), clothianidin (CLO) e dinotefuran (DIN) (Jeschke et al. 2011). Caratteristica comune a tutti i prodotti di sintesi elencati è la derivazione dalla struttura della nicotina, molecola ad azione neurotossica in grado di interferire a livello di comunicazione intersinaptica. Questi pesticidi vengono utilizzati con diversi scopi e modalità, prevalentemente come insetticidi applicati direttamente sulle piante nelle colture, ma anche come prodotti veterinari (contro zecche, pulci, ecc.), nella protezione degli organismi nelle piscicoltura o per esercitare un controllo a livello di parassiti urbani (Chagnon et al. 2014). Uno dei principali punti di forza derivanti dall'utilizzo di neonicotinoidi è rappresentato dalla duttilità con cui possono essere eseguiti i vari trattamenti. Infatti, per quel che riguarda l'impiego in ambito agricolo esistono molteplici possibilità di uso, come ad esempio tramite applicazione fogliare, chemigazione, fertirrigazione, endoterapia o come trattamento per i semi (Thompson et al., 2020, Alford et al., 2017). In Europa si contano attualmente più di 200 prodotti (per la protezione vegetale) a base di IMI, TMX, CLO, ACE, e THI, applicati prevalentemente tramite trattamento spray (circa il 70% dei casi) (EFSA 2012). In Asia la modalità d'uso più utilizzata è, oltre al

trattamento spray, l'applicazione direttamente sui semi, eseguita tendenzialmente per la difesa delle colture di riso (Taniguchi et al. 2012). Le caratteristiche chimico-fisiche dei neonicotinoidi, in particolare la K_{ow} (costante di ripartizione ottanolo-acqua) e la pK_a (costante di dissociazione acida), conferiscono alle molecole delle proprietà sistemiche tale per cui esse risultano essere persistenti, facilmente assimilabili da parte dei tessuti vegetali e conseguentemente traslocate in tutto l'organismo (sono pesticidi sistemici), rendendo la pianta tossica per tutti gli insetti che si nutrono di essa (Bromilow and Chamberlain 1995, Simon-Delso et al. 2015). I neonicotinoidi non risultano però essere tossici solo per gli organismi bersaglio, in quanto essi generano dinamiche di contaminazione ambientale e di esposizione anche ad organismi non target.

L'utilizzo di questi pesticidi su suoli agricoli, prati o strutture antropiche quali campi sportivi può creare successivamente generare la mobilitazione delle molecole di pesticida, per runoff e contaminare quindi le acque, superficiali e, giungere sino in quelle sotterranee. Situazioni simili possono verificarsi anche a seguito di lisciviazione, scarichi, presenza di reflui, applicazione mediante spray o tramite la polvere generata in seguito all'applicazione dei prodotti sulla superficie delle foglie o direttamente sui semi (Gerecke et al. 2002).

Alcuni problemi relativi all'uso dei neonicotinoidi sono legati dalla persistenza che queste molecole hanno in ambiente. La loro degradazione può avvenire con tempistiche parecchio variabili, dipendentemente da quelle che sono le caratteristiche della matrice ambientale in cui i pesticidi si trovano. Per i suoli ad esempio, la degradazione dipende prevalentemente dalla concentrazione stessa di pesticidi utilizzati, dalla quantità di radiazioni ultraviolette, dall'umidità, dalla temperatura, dal pH e dal contenuto di carbonio organico. Nelle regioni a media o alta latitudine, il tempo di dimezzamento delle molecole di pesticidi sarà superiore rispetto a quelle presenti in aree tropicali, a causa delle minori temperature, la ridotta intensità della radiazione solare e del numero di ore di sole giornaliere più ridotto (Bonmatin et al. 2015). Il tempo di dimezzamento

è inoltre dipendente anche dalle caratteristiche di ciascuna delle molecole di neonicotinoidi utilizzate. Per IMI, ad esempio, le tempistiche rilevate nei suoli si attestano in un intervallo compreso tra i 100 e i 1230 giorni, mentre per CLO tra i 148 e i 7000 giorni (Baskaran et al. 1999, DeCant 2010). Nel caso di IMI un ruolo di notevole importanza la temperatura, infatti sono stati registrati tempi di emivita di 547, 153 e 85 giorni, rispettivamente corrispondenti a temperature di 5, 10 e 25°C (Scorza et al. 2004). I tempi di dimezzamento di ACE e TMX sono fortemente influenzati dal tenore di umidità del suolo, con valori che possono essere dieci volte maggiori in condizioni di siccità (Gupta and Gajbhiye 2007). Le modalità principali con cui le molecole di neonicotinoidi vengono degradate (nei suoli) sono tramite idrolisi, fotolisi, degradazione microbica, uptake da parte degli organismi vegetali e lisciviazione. In alcune particolari situazioni, però, non ci sono le condizioni perché le molecole possano essere naturalmente degradate e quindi si favorisce l'accumulo nell'ambiente.

In ambiente marino la persistenza dei neonicotinoidi è governata da fattori quali luce, pH, temperatura, tipologia e quantità utilizzata e composizione della comunità microbica (Bonmatin et al. 2015). Le reazioni di idrolisi vengono catalizzate dalla temperatura, diminuendo quindi i tempi di dimezzamento delle molecole. Il pH, allo stesso modo, aumentando, contribuisce alla diminuzione del tempo di dimezzamento.

La degradazione dei neonicotinoidi, tuttavia, non sempre rende le matrici ambientali meno tossiche, in quanto vengono generati dei metaboliti secondari che possono avere una tossicità uguale o addirittura maggiore rispetto ai composti di partenza (Suchail et al. 2001). Alcuni prodotti sono stati modellati sulla base di questo principio, come CLO, metabolita di TMX, reso successivamente prodotto di commercio a sé stante. Il metabolismo dei neonicotinoidi, analogamente alle tipiche reazioni di biotrasformazione dei composti organici, può essere suddiviso in due differenti fasi. La prima è dipendente dall'azione della famiglia di citocromi P450, appartenente, insieme al NADPH-cytP450 riduttasi, alla classe enzimatica delle monossigenasi a funzione mista (MFO). I citocromi innescano reazioni quali dimetilazione, idrolisi,

idrossilazione, dealchilazione e ossidazione (Casida 2011). La seconda fase, invece, è caratterizzata dalla formazione di composti definiti coniugati, formati, tramite legami covalenti, da molecole endogene e prodotti della trasformazione di fase 1.

La pericolosità legata alla formazione di metaboliti come prodotti di scarto nella trasformazione di composti organici quali i neonicotinoidi è particolarmente difficile da monitorare e risulta parecchio oneroso studiare e verificare la tossicità per ciascuno di essi. Alcuni metaboliti, avendo caratteristiche chimico-fisiche differenti rispetto alle molecole originali, potrebbero avere delle proprietà tali da risultare più biodisponibili per alcuni organismi e talvolta maggiormente tossici. La diversa disponibilità potrebbe comportare dinamiche di tossicità differente oppure risultare più impattante per gli organismi non target rispetto a quelli bersaglio. L'esposizione degli organismi non bersaglio rappresenta una tematica di notevole importanza, in particolare quando le specie in questione sono principalmente insetti impollinatori.

Le prime segnalazioni riguardanti situazioni anomale seguenti l'applicazione dei neonicotinoidi sono datate 1994, quando alcuni apicoltori francesi hanno riportato modifiche nel comportamento delle api, con marcati cali in termini di produzione di miele o nel numero di individui presenti nelle colonie (UNEP, 2010). La causa di questa problematica, è stato ipotizzato, essere l'utilizzo di un trattamento per i semi a base di neonicotinoidi. Le api sono entrate in contatto con i neonicotinoidi (applicato come prodotto commerciale Gaucho) tramite polline e nettare contaminati (Maxim e van der Sluijs, 2013). In seguito a questi avvenimenti la Francia decise di sospendere l'utilizzo su girasoli prima (1999) e mais poi (2004). Negli anni successivi, conseguentemente ad ulteriori segnalazioni relative a situazioni anormali rispetto alla salute delle api, Italia, Germania e Slovenia decisero di limitare l'utilizzo di IMI, TMX e CLO. Alcuni studi hanno rafforzato il nesso tra utilizzo di pesticidi neonicotinoidi e danni sugli organismi non target (Whitehorn et al., 2012). E' stato dimostrato che, colonie di bombo esposte a neonicotinoidi, crescono più lentamente e producono una quantità minore di regine.

Altri gruppi di invertebrati hanno ricevuto meno attenzione rispetto agli impollinatori nello studio della tossicità di questi pesticidi, nonostante i dati a disposizione mettano in evidenza parecchie criticità. Per alcune specie di anellidi, ad esempio, le LC50 (Lethal Concentration 50, ovvero le concentrazioni che determinano mortalità nel 50% degli individui esposti) misurate risultano tra le più basse tra quelle rilevate negli invertebrati, con soglia di effetto espressa come lowest observed effect concentrations (LOEC) nella scala dei ppb (van der Sluijs et al., 2015). IMI e CLO sono risultati essere tossici anche per organismi in posizioni più elevate della catena trofica, quali pesci o piccoli uccelli, che, nutrendosi di semi trattati hanno avuto effetti quali riduzione della capacità riproduttiva e aumento della mortalità (Gibbson et al., 2014). E' stato inoltre dimostrato che, a livello di popolazione (di insetti impollinatori o di generici invertebrati marini o del suolo), gli impatti sono ipotizzabili già alle concentrazioni ambientali attuali (Pisa et al., 2014). Ciò induce a pensare che i neonicotinoidi possano effettivamente causare danni anche a livello ecosistemico, alterando la struttura delle comunità, intaccando la resilienza e compromettendo quindi i servizi ecosistemici derivati, con conseguenti danni anche a livello economico (van der Sluijs et al., 2015). La prima restrizione all'utilizzo dei neonicotinoidi è stata introdotta dal Regolamento 485/2013/EU, limitando l'impiego outdoor di IMI, TMX, CLO ad alcune specifiche colture e in situazioni particolari. Con la Decisione esecutiva 2015/495/EU è stata redatta una prima Watch List di sostanze per cui l'Unione Europea richiede l'istituzione di un costante monitoraggio. In questa lista, sono stati inseriti: methiocarb, oxadiazon, imidacloprid, thiacloprid, thiamethoxam, clothianidin e acetamiprid (Pietrzak et al., 2019). I criteri affinché una sostanza sia inserita nella Watch List sono i seguenti:

- 1) la sostanza si sospetta possa comportare un rischio per le matrici ambientali acquatiche, creando quindi un rischio per gli organismi marini (mammiferi compresi);
- 2) non ci sono sufficienti informazioni per poter affermare con certezza che la sostanza in questione non crei nessun tipo di danno ambientale.

In accordo con l'articolo 8b della direttiva 2008/105/CE, la commissione preposta alla redazione della Watch List si prepone un aggiornamento costante, da effettuare ogni due anni. Nel 2018, con la Decisione esecutiva 2018/840/EU, è stata composta una seconda Watch List. Nello stesso anno, la European Food Safety Authority decise, sulla base dei risultati raccolti e quindi sulle linee di evidenza relative alla pericolosità di questi pesticidi, di rendere proibito, per tutti i paesi membri dell'unione europea, l'utilizzo dei tre neonicotinoidi in applicazioni all'aperto (EFSA, 2018; Sgolastra et al., 2020). Linee guida simili sono state prese anche da Canada e Stati Uniti (Butcherine et al., 2019).

3.2 STRUTTURA E PROPRIETA CHIMICO-FISICHE

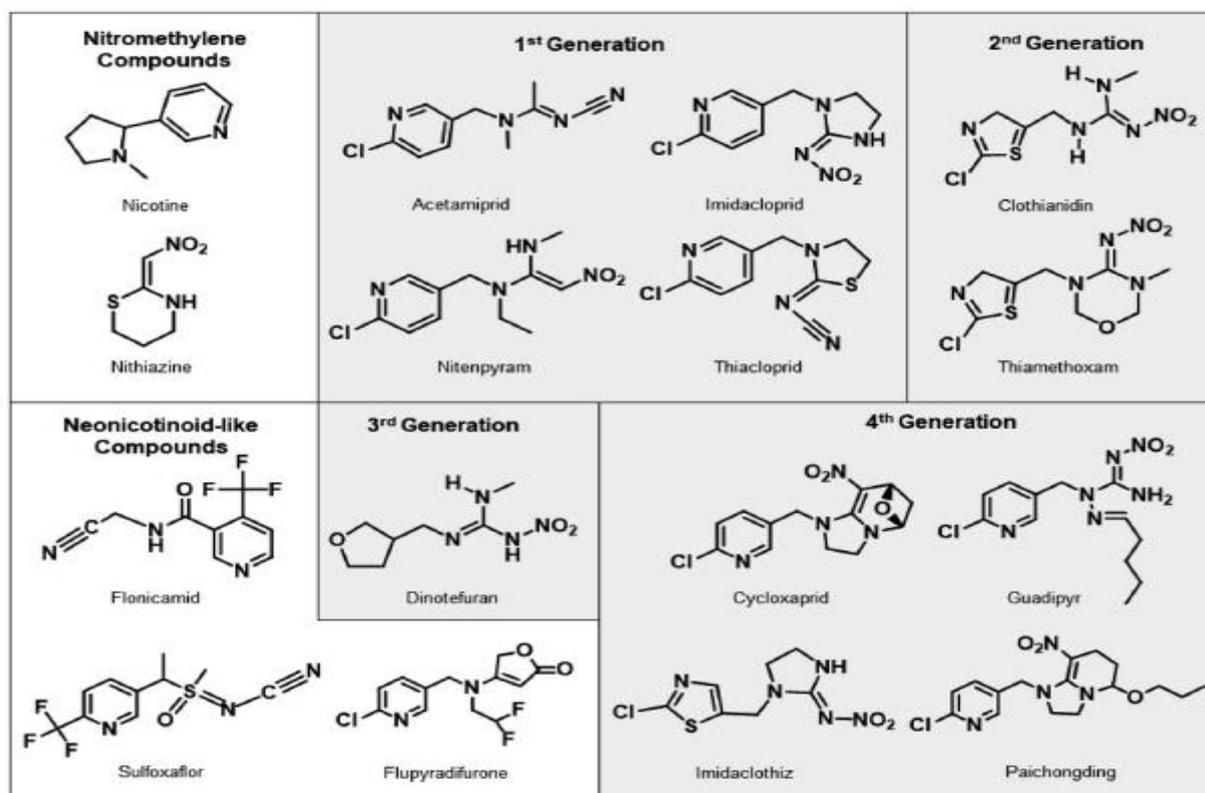


Fig. 1 – Struttura chimica nicotina, nitiagina e neonicotinoidi dalla prima alla quarta generazione (Thompson et al., 2020).

I neonicotinoidi sono prodotti di sintesi, realizzati all'inizio degli anni 90'. Essi sono stati modellati a partire dalla struttura di base della nicotina. Caratteristica peculiare di questi composti (**fig.1**), è la presenza di un azoto ibridato sp^3 facente parte di un anello

eterociclico. Tale azoto, associato ad un coniugato elettro attrattore conferisce le varie proprietà chimico-fisiche alla molecola (Ewere et al., 2021). I sette principali neonicotinoidi possono essere divisi in due gruppi, sulla base della loro struttura. Il primo (NIT, ACE, CLO, DIN) presenta delle catene aperte, mentre il secondo (IMI, THI, TMX) delle strutture ad anello con 5 o 6 molecole diverse a seconda del caso (Jeschke e Nauen, 2008). In entrambi i casi la struttura del pesticida ha delle componenti analoghe per tutti i principi attivi, come riportato in seguito (**fig.2**):

- (i) Nel caso dei composti a catena aperta, due differenti gruppi (R1 e R2), mentre per i prodotti ad anello delle porzioni che formano un ponte;
- (ii) Gruppi eterociclici o eteroalicyclici (A) che formano un ponte con il gruppo R;
- (iii) Gruppo funzionale [=X-Y] come una delle porzioni che compongono i vari tipi di farmacoforo es [-N-C(E)=X-Y].

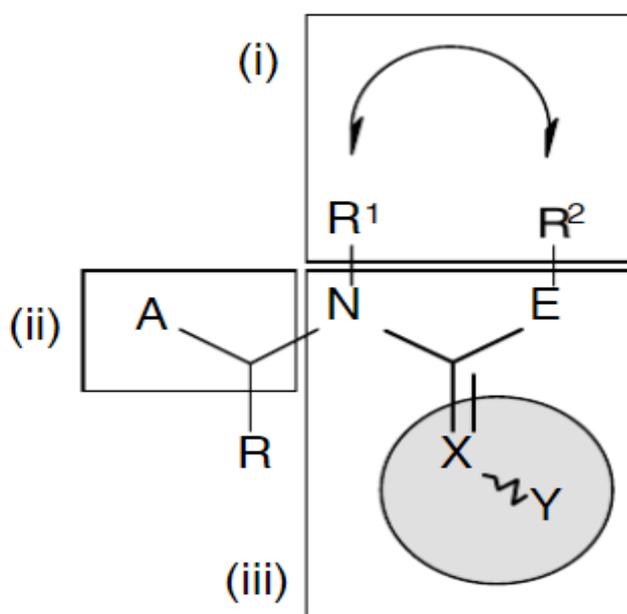


Fig.2 – Struttura chimica neonicotinoidi, suddivisione in porzioni (Jeschke e Nauen, 2008).

Il farmacoforo (nella **fig. 2** indicato con (iii)), è tendenzialmente rappresentato come gruppo [-N-C(E)=X-Y], dove [=X-Y] corrisponde ad un gruppo elettron-attrattore ed E generalmente è NH, N-CH₃, un metile o un atomo di zolfo.

IMI, NIT, THI e ACE sono accomunati dall'averne una cloropiridina (gruppo –CH₂ tra essa e le altre parti) mentre TMX e CLO presentano, nella medesima posizione, un gruppo clorotiazolo (Thompson et al., 2020). La presenza di questi gruppi permette ai neonicotinoidi di essere più “selettivi” nei confronti degli organismi target, creando negli insetti legami più forti coi recettori nicotinici postsinaptici (Tomizawa and Casida, 2005).

La struttura chimica precedentemente descritta, definisce quelli che sono i parametri chimico-fisici delle varie molecole. Le differenze strutturali conferiscono ai prodotti caratteristiche peculiari.

I parametri chimico-fisici dei principali neonicotinoidi sul mercato sono evidenziati nella tabella 1 (**tab. 1**). Tali caratteristiche, quali alta solubilità in acqua e basso assorbimento nei suoli, rendono questi prodotti pericolosi per l'ambiente, creando dinamiche di persistenza, che quindi potrebbero comportare numerose difficoltà anche per gli organismi non target, diffondendosi sino a contaminare altre matrici.

Tab. 1 – Parametri chimico-fisici dei principali neonicotinoidi (Ewera et al., 2021)

Proprietà	IMI	ACE	NIT	TMX	THI	CLO
Anno di rilascio in commercio	1991	1995	1995	1998	2000	2002
Peso molecolare (g/mol)	255.7	222.67	270.72	291.72	252.72	249.68
Pressione di vapore (mm Hg)	1×10^{-7}	4.5×10^{-05}	8.2×10^{-12}	6.6×10^{-06}	6×10^{-22}	1.3×10^{-07}
Tempo di emitiva tramite idrolisi a pH 7 (giorni)	>2000	na	na	>572	10-63	na
Coefficiente ottanolo-acqua (K_{ow})	3.7	6.27	-0.66	-0.13	1.26	5
Costante di Henry (atm m³/mole)	6.5×10^{-11}	7.92×10^{-08}	7.9×10^{-11}	4.7×10^{-10}	1.08×10^{-14}	2.9×10^{-16}
Punto di fusione (°C)	136.4-143.8	98.9	82	139.1	136	176.8
Solubilità in acqua (mg/L a 20°C)	510-610	4200	5.7×10^{05}	4100	185	327

Dalla tabella 1 si evince come i valori relativi ai coefficienti di adsorbimento, alla costante di Henry e alla pressione di vapore siano particolarmente bassi, determinando quindi bassa volatilità e scarsa dispersione di particelle nell'aria. L'alta solubilità in acqua e i modesti valori di costante ottanolo-acqua (K_{ow} compresa tra -0,55 e 1,26) rendono questi prodotti soggetti a dinamiche di trasporto tramite “runoff” superficiale e tendenza a giungere sino ad acque sotterranee. Deflusso superficiale che avviene per vie naturali, quali precipitazioni oppure causa attività, tendenzialmente in ambito agricolo, come l'irrigazione (Hladik et al., 2014).

3.3 MECCANISMO DI AZIONE DEI NEONICOTINOIDI

I pesticidi neonicotinoidi possono essere considerati neurotossine, in quanto interferiscono con la trasmissione neuronale del sistema nervoso (sia per gli organismi invertebrati che vertebrati). Essi nascono come sostanze in grado di agire come agonisti dell'acetilcolina (ACh) nei recettori nicotinici (nAChR) postsinaptici, posti nel sistema nervoso centrale, competendo con il neurotrasmettitore naturale acetilcolina e capaci quindi di causare uno stimolo nervoso costante, operando nell'apertura dei canali ionici (Casida e Durkin, 2013). Questa sovrastimolazione degli impulsi nervosi può comportare effetti a livello comportamentale, subletali o addirittura condurre alla morte dell'organismo (Morrissey et al., 2015). I neonicotinoidi inoltre agiscono anche a livello di attività dei canali voltaggio-dipendenti del calcio. Le differenti strutture relative alle varie subunità tra insetti e mammiferi comportano proprietà diverse e sensibilità dell'organismo differente nei confronti dei pesticidi. E' stato verificato infatti che i neonicotinoidi hanno un'affinità maggiore per gli artropodi, generando una tossicità minore per i vertebrati (Tennekes, 2010). L'acetilcolina (ACh) è una molecola la cui funzione è quella di permettere la trasmissione dell'impulso tra il neurone pre-sinaptico e quello post-sinaptico, agendo nella porzione tra essi, chiamata spazio intersinaptico. Qui ACh si diffonderà sino a legarsi ai recettori colinergici (ad esempio nAChR), attivandoli e generando quindi la risposta (post-sinaptica) fondamentale affinché l'impulso non si interrompa. Quando l'impulso cessa, devono essere eliminati i neurotrasmettitori, per evitare la sovrastimolazione e permettere quindi che un nuovo segnale possa essere conseguentemente trasmesso. L'ACh viene degradata dall'azione dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE), che la scinde in acetato e colina. In questo modo l'impulso viene interrotto.

I neonicotinoidi agiscono interferendo proprio su questo meccanismo, legandosi ai recettori post-sinaptici e non permettendo di conseguenza che le AChE possano degradare ACh. La molecola di neonicotinoide, rimanendo legata ai recettori nAChR, non permette la chiusura del canale, causando così una stimolazione continua del sistema nervoso. Ovviamente questo meccanismo fa sì che il consumo di ATP sia

elevatissimo, comportando conseguenze progressivamente gravi, fino alla morte dell'organismo (Morrissey et al., 2015).

Gli organismi invertebrati sono maggiormente sensibili a questa tipologia di molecole, in quanto il legame tra neonicotinoide e recettori è di lunga durata e quindi più difficilmente scindibile. Gli effetti letali generalmente si manifestano in seguito ad un effetto cumulativo, quindi risultato di un'esposizione cronica (Tennekes, 2010). Come affermato precedentemente, la maggior parte degli artropodi è decisamente sensibile all'azione dei neonicotinoidi e quindi l'utilizzo massivo di questi prodotti può comportare seri danni anche ad organismi non target quali insetti impollinatori o alcune specie acquatiche, la cui mancanza crea problematiche nella struttura delle comunità e quindi poi anche a livello ecosistemico. Per i vertebrati, invece, la tossicità risulta essere minore, causa legame tra neonicotinoide e nAChR più debole e quindi più tendente alla rottura.

In questo lavoro sono stato testati, sul copepode *Acartia tonsa*, tre neonicotinoidi: ACE, THI e TMX.

3.4 ACETAMIPRID (ACE)

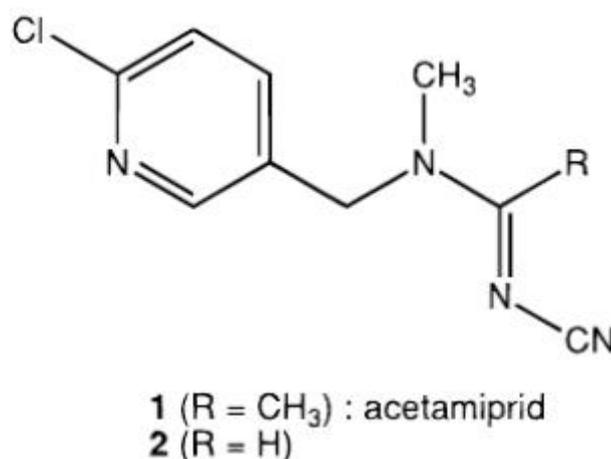


Fig.3 – Struttura acetamiprid (Nakayama et al., 1997)

ACE, rilasciato in commercio nel 1995, è tra i primi neonicotinoidi ad essere stati sintetizzati (**fig.3**). Come gli altri composti appartenenti alla stessa famiglia, agisce come agonista della nicotina, nei recettori post-sinaptici dell'acetilcolina. Il nome commerciale del prodotto è “Assail” oppure “Chipco” (Aventis CropSciences). Esso viene applicato prevalentemente per il controllo degli insetti nelle attività agricole, quali ortaggi, uva, piantagioni di cotone o coltivazioni di cole, ma trova un largo utilizzo anche nei trattamenti per gli animali domestici. Questo prodotto appartiene alla famiglia dei neonicotinoidi a base di cloropiridina. Ci sono due isomeri di acetamiprid, differenziati in base alla conformazione E o Z del gruppo cianoammino. La conformazione ad E è decisamente più stabile rispetto alla corrispettiva a Z (Nakayama et al., 1997). ACE ha un elevato potenziale di bioaccumulo ed è decisamente tossico per organismi acquatici e uccelli (University of Hertfordshire, 2018). Infatti l'uso massivo di questi prodotti può comportare effetti a diversi livelli della catena trofica. Il suo tempo di emivita, generalmente inferiore rispetto agli altri neonicotinoidi, si aggira intorno ai 25-30 minuti. Alcuni metaboliti però possono persistere all'interno dell'organismo anche per 72 ore. L'EPA nel 2002 ha attribuito ad ACE un rischio inferiore rispetto agli altri neonicotinoidi. Alcuni studi hanno messo in evidenza, infatti, come i valori di LD50 (concentrazione che determina la morte del 50% degli

individui esposti) calcolati su ACE, testato su api, siano mediamente di 7.1 µg/ape. Lo stesso test ha riportato per imidacloprid valori di 17,9 ng per ape. Questa differenza è attribuibile alla minor affinità di legame tra acetamiprid e nAChR (Tomizawa et al., 2003).

3.5 THIAMETHOXAM (TMX)

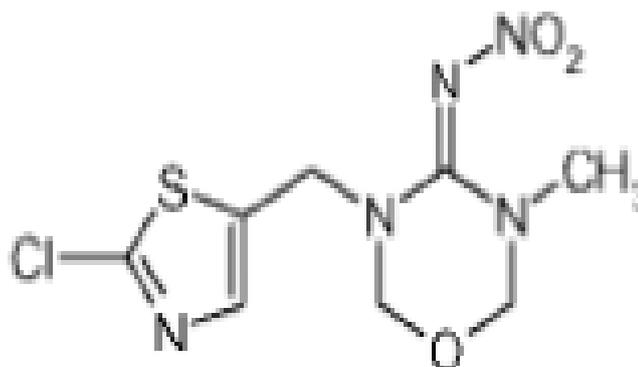


Fig.4 – Struttura thiamethoxam (Maienfisch et al, 2001)

TMX, a differenza di ACE, è un neonicotinoide di seconda generazione, disponibile sul mercato dal 1998 (**fig.4**). I prodotti commerciali a base di TMX più impiegati erano Actara, per i prodotti a trattamento foliare e dei suoli e Cruiser per quelli di applicazione sui semi. Esso è stato definito dalla Food and Agriculture Organization (FAO) come “*moderatamente pericoloso per gli esseri umani*” e non tossico per pesci o alghe. Per uccelli risulta essere mediamente tossico e molto tossico per alcuni insetti come le api e i moscerini (FAO, 2000). Uno dei metaboliti, derivanti dalla degradazione di questo prodotto è CLO, commercializzato anche come prodotto a sé stante. TMX possiede alcune caratteristiche particolari, quali alta solubilità e basso coefficiente di ripartizione, che ne favoriscono l’uptake da parte della pianta e conseguentemente il trasporto nello xilema (Widmer et al., 1999). Le “performance” dei TMX sono molto simili a quelle di IMI. Alcuni test, effettuati su alcuni insetti sono stati svolti per determinare le tossicità dei diversi neonicotinoidi (Maienfisch et al., 2001). I risultati ottenuti (**tab.2**) hanno messo in evidenza come i valori di tossicità,

espressa come concentrazione necessaria all'inibizione del 50% dell'attività dell'acetilcolina, siano parecchio eterogenei. TMX risulta essere, in tutte e tre le specie saggiate, decisamente meno tossico rispetto ad IMI, che mostra valori molto simili a quelli relativi ad ACE.

Tab.2 – Valori di IC_{50} . Trattamenti effettuati con diversi neonicotinoidi su tre specie di insetti (Maienfisch et al., 2001).

Composti	IC_{50} (nM) ^b		
	<i>A. craccivora</i>	<i>M. persicae</i>	<i>L. migratoria</i>
Imidacloprid	2.3 (± 0.8)	3.1 (± 0.8)	1.5 (± 0.2)
Nitenpyram	21.7	33.5 (± 14.6)	6.8
Acetamiprid	4.8 (± 2.9)	6.3 (± 2.4)	2.9 (± 0.2)
Thiamethoxam	260 (± 70)	4800 (± 320)	28000 (± 6000)

3.6 THIACTOPRID (THI)

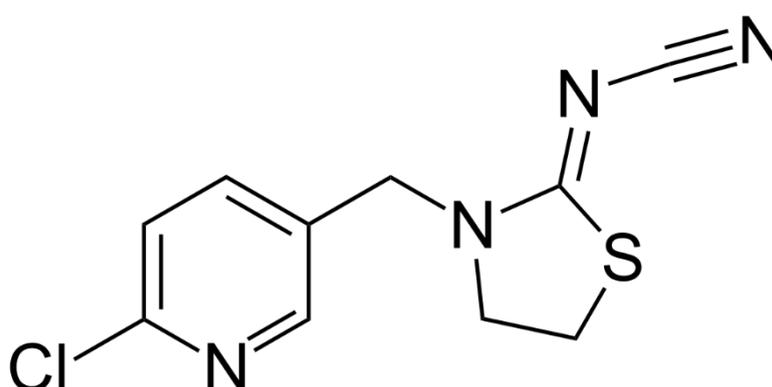


Fig.5 – Struttura chimica thiacloprid (Verebova et al., 2019)

THI (fig.5), insieme ad ACE, IMI E NIT, fa parte dei pesticidi neonicotinoidi di prima generazione. I nomi con cui il prodotto è stato diffuso sul mercato sono i seguenti:

Alanto, Bariard, Biscaya, CaLypso, Monarca e Proteus (Bayer Cropscience S.R.L). Esso è caratterizzato da un'alta solubilità, che, unita ad una costante di ripartizione particolarmente bassa, determina la probabilità che questo prodotto possa effettivamente contaminare acque superficiali in seguito ad eventi meteorici o, come affermato anche per TMX e ACE, causa attività agricole. Alcuni studi hanno verificato una maggior tossicità per gli insetti piuttosto che per crostacei (Beketon e Liess, 2007). Altri invece, hanno approfondito la tossicità di thiacloprid, studiando come esso possano influire sull'immunodeficienza di *Apis mellifera*. Con un'esposizione di 24 ore, THI ha comportato una diminuzione della densità degli emociti e un'interferenza a livello di attività antimicrobica (Brandt et al., 2016).

3.7 L'IMPIEGO DI *ACARTIA TONSA* COME BIONDICATORE

La specie utilizzata, come biondicatore, in questo lavoro è *A. tonsa*, un copepode calanoide. Per biondicatore si intende un qualsiasi organismo (o anche sistema biologico) utilizzato al fine di poter valutare una modifica, una variazione a livello di qualità dell'ambiente (Iserentant and De sloover, 1976). Gli esseri viventi vengono utilizzati quindi per monitorare, per fornire un'informazione sullo stato di salute di un determinato ambiente. Il loro adattamento è il risultato integrato di una serie di stimoli, o stress, provenienti sia dalla componente abiotica che da quella biotica. Se lo stress a cui gli organismi sono sottoposti è particolarmente intenso, non necessariamente riescono ad adattarsi e si innescano quindi perturbazioni a livello sub-individuale, individuale e danni all'interno delle popolazioni, fino alla scomparsa di alcune di esse, con conseguente alterazione a livello di comunità. Il biondicatore consente quindi di interpretare un determinato fenomeno ambientale, che risulterebbe in altri casi di difficile comprensione, causa elevato numero di variabili presenti. Sarà dunque possibile, tramite l'integrazione con i risultati provenienti dalle analisi chimico-fisiche, fornire una valutazione migliore sulla qualità ambientale. Gli indicatori vengono utilizzati quindi come ottimo strumento per il monitoraggio dello stato di salute di un ambiente. Tendenzialmente ogni specie, reagendo a stress chimico-fisico, potrebbe

considerata come bioindicatore. La scelta, tuttavia, ricade su quelle di cui si possiedono più informazioni dettagliate. Per alcune infatti mancano alcuni dati sulla fisiologia o sull'ecologia, per cui risulterebbe complesso il riconoscimento di variazioni a livello individuale e dei nessi causa-effetto che hanno generato una determinata risposta da parte dell'individuo. Le analisi di ciascuna risposta biologica, che sia utilizzabile come indicatore, dev'essere supportata da un'apposita valutazione di quelli che sono definiti "fattori di confusione", che potrebbero mascherare i risultati ottenuti, sovrapponendo gli effetti derivanti da cause naturali con quelli di origine antropica (Gray, 1989).

Nella scelta delle specie da utilizzare come indicatori biologici ci sono diversi parametri da tenere in considerazione. Lambertson nel 1992 compilò la lista seguente, con i criteri da seguire nella scelta dell'indicatore più idoneo ai propri fini (Lamberston et al., 1992):

- conoscenza della biologia e dell'ecologia della specie;
- sensibilità ad un ampio spettro di contaminanti;
- breve ciclo vitale per consentire l'esecuzione di test cronici;
- possibilità di impiego degli stadi vitali più sensibili;
- endpoints facilmente osservabili, risposte riconducibili a precise cause di alterazione ambientale;
- omogeneità della popolazione (genetica, fisiologica, stadio di sviluppo);
- disponibilità degli organismi nel corso dell'intero anno perché allevabili o perché continuamente reperibili in ambienti incontaminati;
- facilità di mantenimento in laboratorio;
- rilevanza ecologica.

3.8 BIONDICATORI: COPEPODI

La specie utilizzata in questo lavoro è *A. tonsa*, un crostaceo copepode appartenente all'ordine dei calanoidi. I copepodi marini rappresentano una componente significativa degli ecosistemi marini e hanno un ruolo chiave all'interno delle reti trofiche marine (o costiere), in quanto la dieta di molte specie marina è composta, in buona parte da

questo *taxa*. (Turner, 2004). Essi sono riconosciuti come i più abbondanti metazoi presenti sulla Terra e nella catena alimentare sono inseriti tra il fitoplancton e gli organismi predatori, quali pesci, uccelli o mammiferi (Turner, 2004). La loro lunghezza, nella maggior parte dei casi, è compresa tra 1 mm (o poco meno) e 2 mm, ma in alcuni casi fino a 5 mm. Tra le principali caratteristiche morfologiche dei copepodi figura il corpo cilindrico (o ovale) e antenne particolarmente sviluppate. Il primo paio viene usato prevalentemente per le attività motorie, ma anche per il miglioramento della respirazione e dell'alimentazione. Il torace è dotato di arti, biramificati, mentre l'addome è spesso sottile con assenza di appendici. Quest'ultime, invece, si trovano nelle zone terminali del corpo, tendenzialmente associate a delle setole (Ruppert e Barnes, 1994).

Le seguenti caratteristiche fanno sì che i copepodi siano degli ottimi organismi da utilizzare come bioindicatore (Picone et al., 2018):

- la loro ubiquità;
- la facilità di gestione e di mantenimento nelle colture in laboratorio;
- la versatilità con cui possono essere utilizzati (possibilità di eseguire test acuti, cronici e sub-cronici);
- sensibilità a composti organici (tra cui quindi pesticidi neonicotinoidi);
- breve ciclo vitale ed elevata rilevanza ecologica.

Tutto ciò ha reso possibile lo sviluppo di adeguati protocolli, standardizzati, per eseguire test di tossicità, tendenzialmente acuti, utilizzando i copepodi come bioindicatori. Le specie più utilizzate per questi fini sono: *Acartia tonsa* Dana, *Nitocra spinosa* Boeck e *Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco (ISO, 1999). Esse vengono usate in questi modi sin dalla fine degli anni 70' (USEPA, 1978; Bengtsson, 1978). Studi più recenti hanno evidenziato l'esistenza di diversi parametri (endpoint) idonei da utilizzare nei saggi di tossicità, quali produzione delle uova, la loro schiusa e lo sviluppo degli stadi larvali (Early life stage) (Hutchinson et al., 1994). Tra le specie di

copepodi precedentemente citate, la scelta per questo lavoro è ricaduta su *A. tonsa*, presente, a livello mondiale, in diverse acque marine ed estuarine.

3.9 ACARTIA TONSA - BIOLOGIA ED ECOLOGIA

A. tonsa (Dana, 1848) è una specie di copepode calanoide, diffusa in moltissimi ambienti (prevalentemente estuarini) situati in regioni subtropicali o temperate. Essa è presente nel Pacifico, nell'Atlantico, ma anche nel Mediterraneo, dove è stata introdotta negli anni 80' (Gaudy e Vinas, 1985). *A. tonsa* è stata segnalata anche in lagune italiane, quali quella di Lesina e di Venezia, dove è diventata una specie dominante (Sei et al., 1996). Essa è capace di adattarsi a temperature comprese tra i -1 e i 32 °C e le sue uova possono svilupparsi allo stadio di nauplio tra i 5 e i 25°C (Gonzalez et al., 1974, Uye e Fleminger, 1976). La sua distribuzione sembra non essere intaccata da parametri abiotici quali temperatura e salinità, tuttavia alcuni studi hanno messo in evidenza come, a salinità superiori al 25‰, diminuisce anche la sopravvivenza dei giovani naupli (Tester e Turner, 1991). Questa specie non è capace di ottenere quantità sufficienti di cibo in ambienti oligotrofici, in particolare quando le concentrazioni presenti in ambienti sono basse, nello specifico $<0.25 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$ di particellato o $< 1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ di clorofilla. (Paffenhofer e Steams, 1988; Reeve e Walter 1977). Queste caratteristiche fanno sì che *A. tonsa* sia presente principalmente in zone estuarine, o comunque in zone soggette ad upwelling, caratterizzate quindi da molti nutrienti in ricircolo (Sei et al., 2006). La dieta di questa specie è basata prevalentemente su cibo proteico, come dimostrato dall'elevata presenza di ammoniaca nelle feci. *A. tonsa*, come molti altri copepodi, è un consumatore primario, che si nutre di fitoplancton, ma è anche un consumatore di detrito. A sua volta, è oggetto di predazione da parte di consumatori secondari, tra cui altri invertebrati, pesci e soprattutto le fasi larvali dei pesci. (Ruppert e Barnes, 1994). Essa è una specie erbivora, filtratrice e che non accumula in nessun modo riserve energetiche, per poter investire, in condizioni idonee, tutte le risorse in produzione di uova. Il tasso di riproduzione si riduce al diminuire della concentrazione di microalghe e al variare della qualità di quest'ultime (Kiorboe et al., 1985, Medina e Barata, 2004).

3.10 DISTRIBUZIONE DI *ACARTIA TONSA*

I primi avvistamenti di *A. tonsa* riportano la sua presenza esclusivamente in zone corrispondenti agli oceani indiano e pacifico. Ad oggi, invece, la specie è stata segnalata a livello mondiale in molteplici località, quali (oltre agli oceani) Mar Baltico, mar Nero, mar Caspio, mar Mediterraneo, mare del Nord, mare di Azov anche nelle acque del Golfo del Messico. L'ampia diffusione della specie può essere imputata al trasporto nelle acque di zavorra delle navi (Mauchline, 1998). *A. tonsa* è stata segnalata in Italia dalla fine degli anni 80', nella laguna di Lesina e nelle zone settentrionali dell'Adriatico (Sei et al., 1996).

3.11 MORFOLOGIA DI *ACARTIA TONSA*

A. tonsa è appartenente al phylum *Arthropoda*, subphylum *Crustacea*, ordine *Calanoida*, sottoclasse Copepoda. I copepodi sono caratterizzati dall'aver di forma cilindrica, con un corpo metameric formato da 11 segmenti. Il corpo (**fig.8**) può essere suddiviso prevalentemente in tre regioni: testa, torace e addome. Le prime due sono unite, fino a formare una regione definita prosoma. L'addome, invece, risulta essere più stretto e distinto dalle altre porzioni. Nella testa è presente un unico occhio, definito naupliare e un rostro (generalmente orientato all'indietro), posto nel lato ventrale, che, nella maggior parte dei casi termina con due punte. Sempre nella regione corrispondente alla testa sono presenti, in lato ventrale, due paia di antenne. Le prime sono munite di sete e possono essere suddivise in un numero di porzioni compreso tra 3 e 25. Esse, di dimensioni maggiori negli organismi di sesso maschile, hanno molteplici funzioni, tra cui quella natatoria e sensoriale (nei maschi inoltre può servire per attrarre le femmine). Il secondo paio di antenne, al contrario delle prime, è decisamente più piccolo e ciascuna antenna risulta composta da due rami, uno esterno e uno più interno, denominati rispettivamente esopodite ed endopodite. In posizione ventrale, sulla linea mediana, si trova la bocca, costituita da un "labrum," un "labium", e 4 coppie di appendici masticatrici, mandibole, due diverse mascelle e dei massillipedi. L'addome è composto da cinque somiti, privi di appendici. Il primo e

l'ultimo comprendenti, rispettivamente, apertura genitale e anale. Quest'ultima termina con la furca, comprendendo due ramificazioni dotate di 6 setole. In *A. tonsa*, la femmina, con dimensioni comprese tra 1 e 1,5 mm, generalmente è più grande del maschio (0,8-1,1mm), che possiede antenne piegate. Non sempre è facile distinguere tra maschio e femmina, se non per alcune caratteristiche peculiari quali (per le femmine) testa dalla forma arrotondata, bordo del prosoma avente piccole spinule e primo paio di antenne tendenzialmente dritte. Nei maschi, inoltre, l'ultima appendice natatoria è diversificata, per l'accoppiamento. Le femmine possiedono il primo segmento dell'urosoma più sviluppato rispetto a quello maschile (**fig.6 e 7**) (ISPRA, 2019).

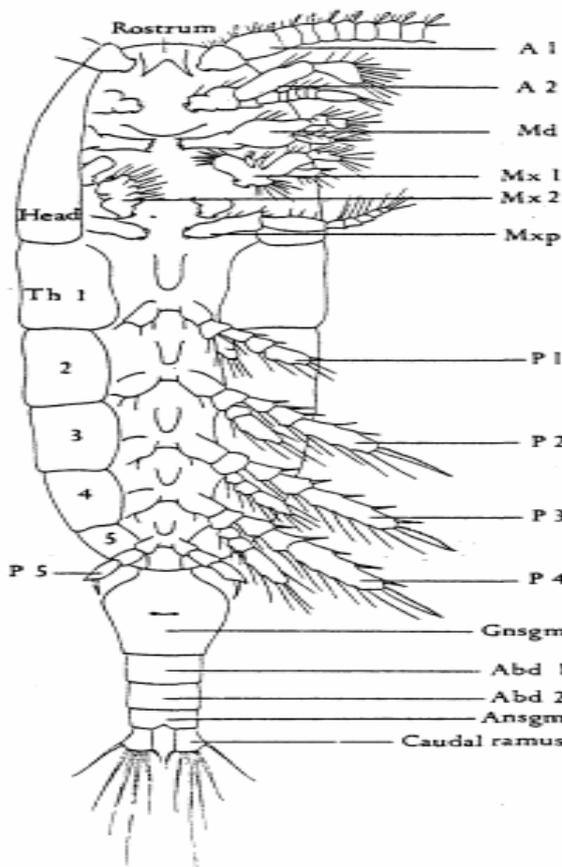


Fig.6 – *Urosoma maschile* (Sabatini, 1990)



Fig.7 – *Urosoma femminile* (Sabatini, 1990)

Fig.8 – *Morfologia di un copepode calanoide* (Murphy e Coen, 1978)

I copepodi hanno diverse modalità di movimento, tra cui uno lento, coadiuvato dalle antenne (o da alcune appendici cefaliche) e uno più rapido, chiamato “fast jumping”, eseguito per mezzo delle appendici situate sul torace (ISPRA, 2019).

Il sistema digerente risulta essere tripartito, con una prima parte corrispondente ad apparato boccale ed esofago, una intermedia comprendente lo stomaco ed una terminale con intestino e ano. Il sistema circolatorio, invece, è assente e la circolazione avviene mediante numerose contrazioni muscolari e pulsazioni dell'intestino. Anche il sistema respiratorio è parecchio semplice, infatti mancano alcune delle strutture tipiche che caratterizzano i crostacei. La respirazione avviene attraverso cavità poste al di sotto degli strati del tegumento. L'apparato riproduttivo maschile è composto unicamente da un testicolo, situato in posizione dorsale, nei pressi del cuore, dal quale poi inizia il vaso deferente che termina nella vescicola seminale (ICRAM, 2006). La femmina, nella porzione di corpo corrispondente alla testa, presenta un unico grande ovaio, diviso in tre zone. In quella posteriore avviene la formazione degli oociti mentre quella centrale viene considerata zona di accrescimento, dove si sviluppano e maturano le uova. Durante le fasi di accoppiamento, il maschio non feconda la femmina in modo diretto, bensì, attacca la propria spermatofora ai pori genitali femminili. Le uova vengono fecondate quando gli spermatozoi, provenienti dalla spermatofora, giungono ai pori (ISPRA, 2019).

Il ciclo vitale di *A. tonsa* è analogo a quello della maggior parte degli altri copepodi calanoidi. Le uova, per quel che riguarda le specie mediterranee, sono sferiche e hanno un diametro compreso tra i 70 e gli 80 μm . La produzione di uova dipende tendenzialmente dalla quantità e dalla qualità del fitoplancton, ma anche dal numero di individui presenti. Lo sviluppo larvale di *A. tonsa* è indiretto ed è suddivisibile in 6 stadi (**fig.9**) naupliari (**fig.10**), a cui ne conseguono 6 di copepodite (**fig.12**). La durata dello sviluppo è dipendente dalla temperatura e dalla latitudine. Infatti, a temperature comprese tra i 15 e i 20 gradi, lo sviluppo, da nauplio a copepodite, avrà una durata media di circa 5 o 6 giorni. Lo stadio adulto, invece, verrà raggiunto al giorno 12-20 dalla schiusa delle uova, anche in questo caso sulla base della temperatura e della densità di popolazione presente (Invidia et al., 2004). Tutti gli stadi di nauplio sono morfologicamente diversi dall'adulto. L'organismo, infatti, si presenta con una forma triangolare, con dimensioni approssimativamente simili a quelle delle uova e

caratterizzate da assenza di segmentazione. Gli stadi successivi al primo mantengono la tipica forma triangolare. In seguito alla fase naupliare, inizia quella di copepodite, in cui gli organismi appaiono con caratteristiche morfologiche simili a quelle degli adulti. Qui inizia ad essere evidente la distinzione tra le appendici e i vari metameri che compongono il corpo. Il sesto stadio di copepodite corrisponde effettivamente allo stadio di adulto. In questo lavoro, le tematiche relative a produzione di uova e sviluppo larvale assumono notevole importanza, in quanto gli endpoint utilizzati per la misura e valutazione della tossicità sono effettivamente produzione giornaliera di uova, schiusa di esse, mortalità larvale e variazioni nello sviluppo larvale.

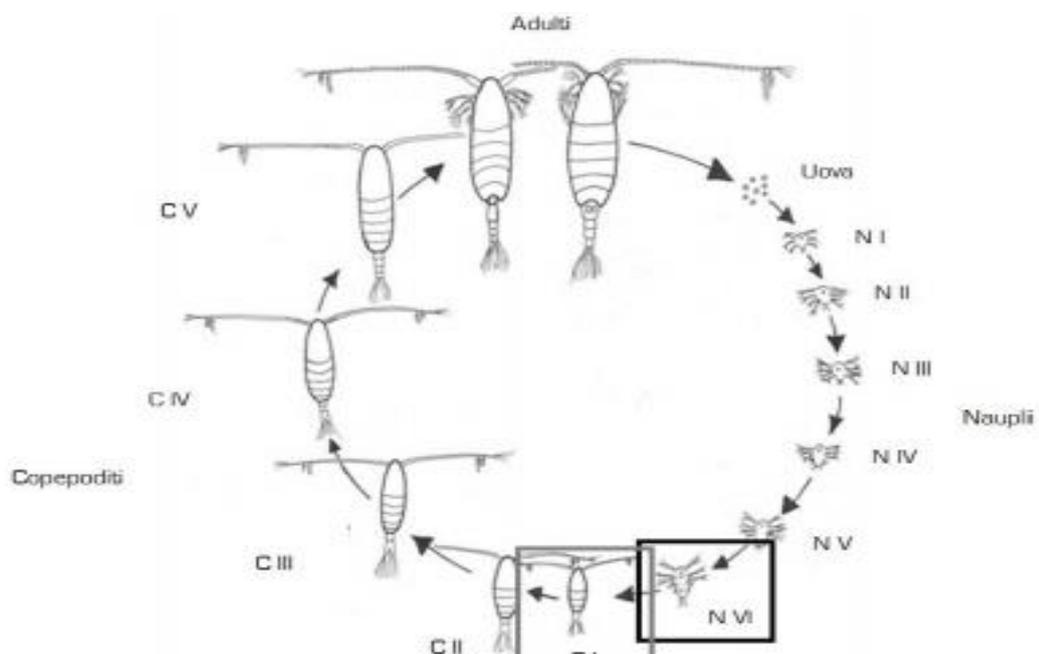


Fig.9 – Ciclo di vita di *Acartia tonsa* (Alver et al., 2011)

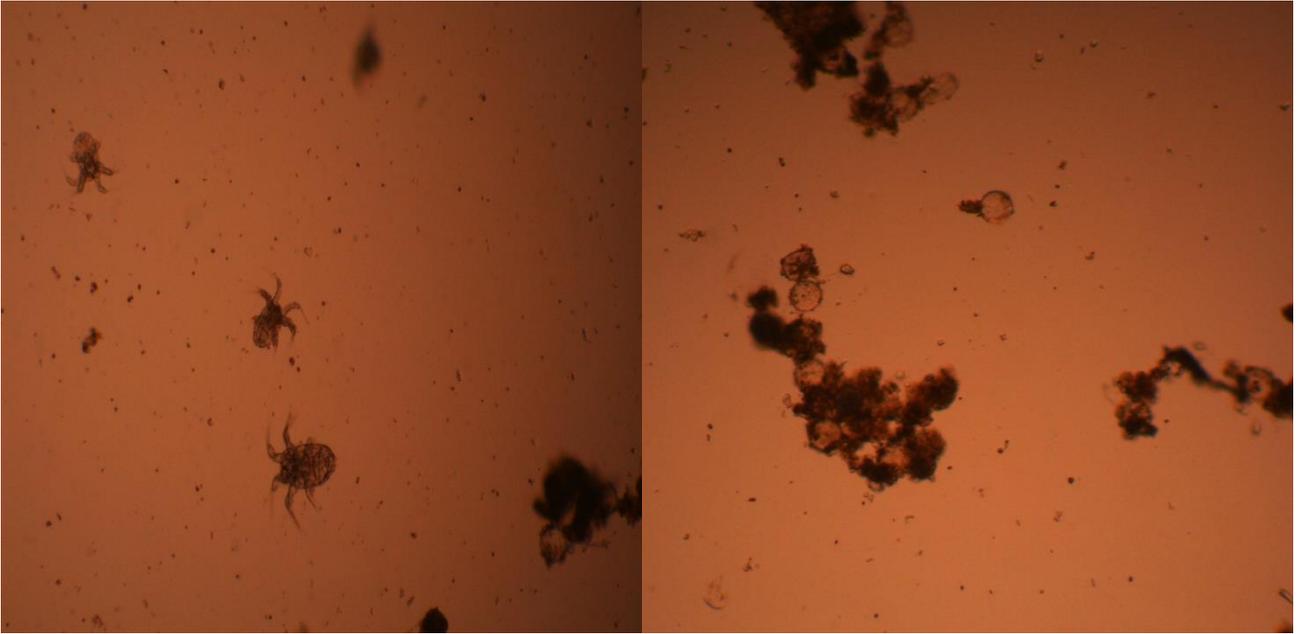


Fig. 10 e 11 – Nauplii e uova di Acartia tonsa (foto di M. Baccichet)



Fig.12 – Copepodite di Acartia tonsa (foto di M. Baccichet)

3.12 ACARTIA TONSA NEI SAGGI DI TOSSICITA'

A. tonsa è stata utilizzata, sia in Europa che negli Stati Uniti, come biondicatore nei test di tossicità sin dalla fine negli anni 70' (Lee, 1977). Essa rientra tra le specie previste dalla ISO (International Organization for Standardization) per lo svolgimento di alcune tipologie di saggi ecotossicologici, per testare la tossicità in ambienti salmastri e marini (ISO 14669, 1999). Questo test ISO è basato sulle metodologie adottate precedentemente in altri lavori (Andersen et al., 2001; Kusk e Wollemborg, 2007). Esso prevede l'utilizzo di organismi appartenenti agli stadi 5 o 6 di copepodite o di giovani adulti. Successivamente, sono stati introdotti altri test, che prevedevano l'esposizione degli organismi a partire dallo stadio di uovo, per valutare la resistenza degli stadi larvali, in quanto esse, risultando più sensibili degli adulti ai contaminanti, forniscono valori di tossicità più precisi. Successivamente sono state proposte altre tipologie di test utilizzando le uova, quali un acuto a 24 e 48 h e un subcronico a 7 giorni (Gorbi et al., 2012). In seguito, sono stati sviluppati ulteriori protocolli, che prevedono l'utilizzo di endpoint, per misurare la tossicità, quali fecondità, espressa come numero di uova prodotte per individuo, vitalità delle uova e sviluppo larvale (ISO 16778, 2015; Picone et al., 2018; Zhou et al., 2018).

4. MATERIALI E METODI

Questo lavoro segue le metodologie indicate nell'ISO 16778 (2015) basate sul lavoro originale di Andersen et al. (2001) per l'allevamento di *A. tonsa* in laboratorio, che per la struttura e per le procedure per i test da eseguire. I copepodì sono mantenuti in un'acqua di mare sintetica, a salinità 20 ‰ preparata sciogliendo micro- e macronutrienti in acqua deionizzata.

Le uova di *A. tonsa* usate per la realizzazione, in laboratorio, delle colture madre, sono state ricavate dagli adulti forniti in precedenza dalla Guernsey Sea Farms, situata a Parc Lane, Vale, Guernsey.

Queste colture sono state allestite, inserendo all'interno di bottiglie di vetro da 2L (riempite con acqua sintetica), un numero di uova compreso tra gli 800 e i 1000. L'acqua sintetica consiste in un *medium* al 20 ‰, realizzato diluendo, in rapporto 1:4, una soluzione ipersalina al 10% (**tab.2-allegato 1**) con il *medium* M7 di ElenDt, ulteriormente arricchito in nutrienti (**tab.3-allegato 2**).

Ultimata la preparazione iniziale della coltura, esse viene posta in celle termostatiche, ad una temperatura di 20 °C, in condizioni di fotoperiodo controllato con 16 ore di luce e 8 di buio. Nelle celle sono inoltre presenti degli aeratori elettrici, costantemente in contatto con le colture, in modo tale da fornire aria atmosferica sterile (precedentemente filtrata su dei filtri di cellulosa con porosità a 0.2 µm) e permettere che il cibo e i nutrienti rimangano in sospensione. Le migliori condizioni di allevamento di *A. tonsa* in laboratorio sono le seguenti (**tab.5**):

Tab.5 – Parametri per l'allevamento di *A. tonsa* in laboratorio

Salinità (‰)	15 – 35
pH	7-9
Temperatura (°C)	20 ± 5
Fotoperiodo (h L : h D)	16 : 8
Densità coltura (ind./L)	400 – 600
Frequenza alimentazione	3 volte al giorno
Tipologia di alimentazione (µg C/L)	Tetraselmis suecica + Isochrysis lutea + Pavlova lutheri;
Volume di allevamento (L)	1-2 (generalmente in bottiglie di vetro)

Ogni giorno viene fornita ad *A. tonsa*, tramite una pompa peristaltica, una dose di circa 6×10^4 cellule/mL di un mix di alghe, al cui interno sono presenti *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis lutea*. La pompa inserisce automaticamente l'alimento 3 volte al giorno, prelevandolo da colture algali. Il copepode genera le prime uova dopo un periodo di circa 10-12 giorni dal giorno in cui è stata fatta iniziare la coltura. Queste uova sono continuamente prodotte dalle femmine e tendenzialmente depositano sul fondo della bottiglia, insieme ad una patina costituita da feci e dai residui delle alghe di cui si sono nutriti gli adulti. In questi primi giorni è necessario pulire questa patina (circa ogni due giorni), al fine di rimuovere le uova che non si sono correttamente schiuse, perché potrebbero compromettere le analisi future. La pulizia viene effettuata utilizzando una pipetta di vetro da 10 o 20 mL, collegata, per poter fare effetto sifone, ad un tubo di gomma. L'acqua, tolta dalla coltura, viene raccolta in un contenitore di vetro (tendenzialmente una beuta) e conseguentemente filtrata, utilizzando due setacci. Il primo serve a trattenere gli individui di taglia maggiore, verosimilmente nauplii e copepoditi, che possono essere stati aspirati durante la pulizia

ed ha una maglia di 180 μm . Il secondo invece, di maglia 45 μm , viene utilizzato per prelevare le uova. Quest'ultime vengono conservate a parte, per poter allestire un test o una nuova coltura, ma anche per evitare dinamiche quali sovrappopolazione all'interno delle bottiglie, che potrebbe causare una diminuzione delle fitness della popolazione, rendendola non idonea per un saggio ecotossicologico. Naupli e copepoditi devono essere reinseriti nella coltura. Al termine del primo periodo, quindi dopo circa 12 giorni, la pulizia viene effettuata quotidianamente, per poter prelevare e ottenere le uova necessarie.

Le alghe utilizzate per l'alimentazione sono mantenute in colture utilizzando il medium F/2 di Guillard (Guillard, 1975), cioè un'acqua sintetica (arricchita con appositi nutrienti necessari alla crescita algale) ad una salinità pari a 30‰. I composti inseriti per la realizzazione sono quelli inseriti nella tabella 6 (**tab.6-allegato 4**).

Queste colture algali sono mantenute in camera termostatica ad una temperatura di 15 °C, con illuminazione costante e rinnovamento ogni 7 o 14 giorni, che, avviene inserendo un volume di circa 50 o 80 mL delle colture stesse in ad un litro di medium (F/2 di Guillard). Qualche giorno dopo il rinnovamento possono essere utilizzate per l'alimentazione di *A. tonsa*.

Le densità di allevamento ottimali per *A. tonsa* sono di circa 1000 individui per litro di soluzione, più basse rispetto a quelle di altre specie (Jepsen et al., 2007). Il tasso di ingestione, da parte dei copepodi, delle alghe è proporzionale all'abbondanza delle cellule, ma esclusivamente entro un determinato valore limite, entro il quale si raggiunge il plateau. Dunque, non serve incrementare la quantità di alghe somministrate per poter ottenere una maggior produzione di uova (Zhang et al., 2015). I valori di pH ottimale, come evidente nella tabella 5 (**tab.5**), sono compresi tra 7 e 9. Il superamento di questi valori può limitare il tasso di crescita del plancton.

4.1 TEST CRONICO – METODOLOGIE

I test realizzati in questo lavoro sono volti alla valutazione della tossicità derivante da un'esposizione a lungo termine di pesticidi neonicotinoidi. Per tutti i contaminanti saggiati sono stati allestiti dei test cronici, basati quindi sulla somministrazione di piccole quantità di contaminante, a concentrazione sub-letale, per un tempo però prolungato. Il test viene sviluppato sottoponendo gli organismi a diverse concentrazioni della sostanza in esame.

La generazione parentale (F_0) viene esposta al contaminante sin dallo stadio di uovo, fino allo stadio di adulto riproduttivo, mentre la prole (generazione F_1) solo nelle prime fasi di sviluppo larvale, fino allo stadio 1 di copepodite. Questi test durano in totale, all'incirca, tre settimane, tempistica necessaria affinché gli organismi della generazione parentale F_0 possano maturare, raggiungere l'età adulta e riprodursi. In questo orizzonte temporale verrà tenuto in considerazione anche lo sviluppo della generazione F_1 .

Per ciascun pesticida neonicotinoide testato, utilizzando le uova provenienti dalla coltura madre sono state allestiti 3 trattamenti sperimentali (**fig.13**), nello specifico un controllo e gli altri due con presenza di contaminante, rispettivamente 10 ng L^{-1} e 100 ng L^{-1} . Per ciascuno dei trattamenti sono stati inserite circa 400-600 uova. Le concentrazioni 10 e 100 ng L^{-1} sono state scelte sulla base dei risultati ottenuti dal gruppo di ricerca nei test di sviluppo larvale con *A. tonsa* condotti su neonicotinoidi nell'ambito del Progetto Venezia 2021 (Picone, dati non pubblicati). A queste concentrazioni infatti non è stata riscontrata alcuna alterazione dello sviluppo larvale né un incremento di mortalità larvale rispetto ad una condizione di controllo (esposizione al *medium* di coltura).

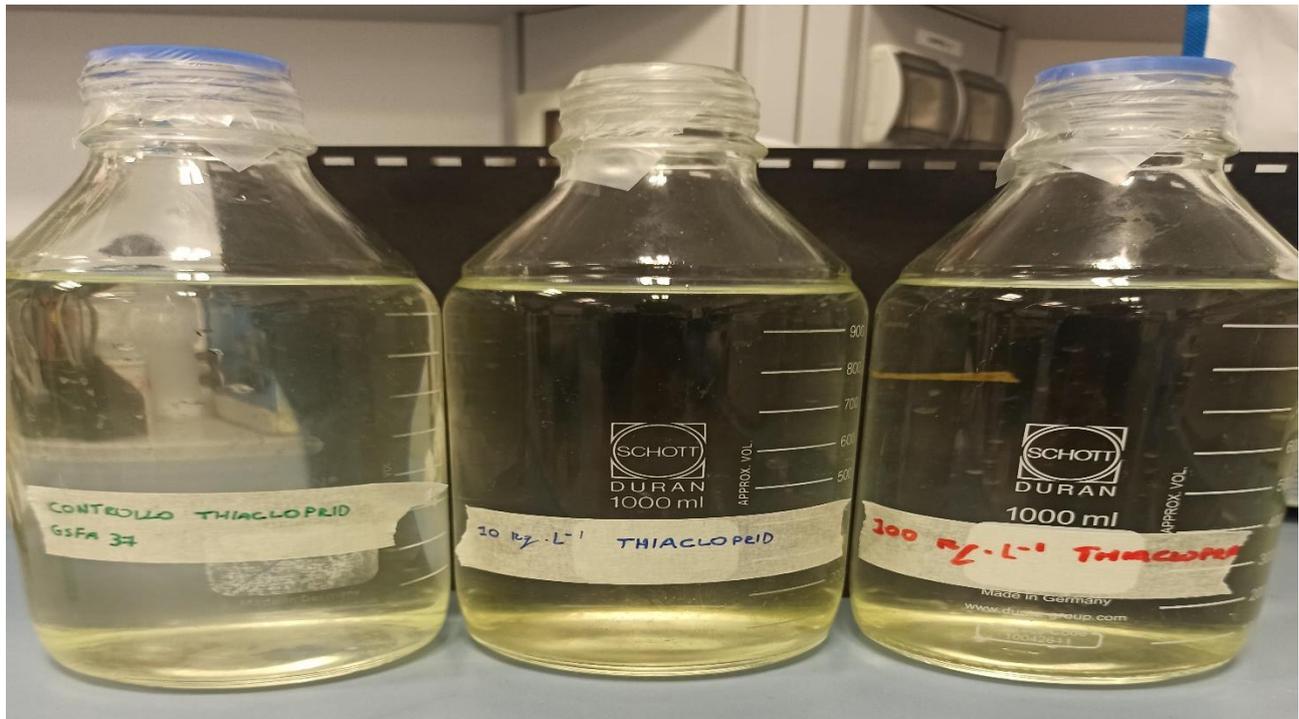


Fig. 13 – Colture realizzate per il test cronico con Thiacloprid. A sinistra coltura di controllo, in centro trattamento a 10 ng L⁻¹ e a sinistra 100 ng L⁻¹ (foto di M. Baccichet)

La coltura di controllo (corrispondente al “bianco” o “controllo negativo”) consiste semplicemente in una soluzione di medium, in cui sono state inserite le uova. Nelle altre, invece, è stata inserita una quantità nota di contaminante. Per ciascuna di esse sono state rispettate le stesse modalità con cui sono state allestite le colture madre (eccezione fatta per le modalità di somministrazione del cibo), quindi con periodico rinnovamento della soluzione (eseguito nella medesima maniera). Il rinnovo delle colture con presenza di contaminante deve essere eseguito prelevando e reinserendo esattamente lo stesso volume di soluzione. Nell’aliquota reinserita la quantità di contaminante è proporzionale al volume, per poter ottenere una concentrazione uguale a quella contenuta nella coltura. L’alimentazione consiste anche in questo caso nel mix di alghe, che però non viene immesso meccanicamente, bensì viene aggiunto all’aliquota da inserire, in modo tale da non rendere ulteriormente diluito la coltura. Le soluzioni di neonicotinoidi sono state ottenute preparandone dapprima una più

concentrata (10 mg L^{-1}) in etanolo al 99%, da cui poi sono state preparate quelle a 10 e 100 ng L^{-1} , operando le opportune diluzioni con acqua marina sintetica al 20‰.

Gli standard utilizzati per la preparazione delle soluzioni di ACE, THI e TMX sono PESTANAL analytical standards della Supelco, forniti dalla Merck Life Science s.r.l di Milano.

4.2 TEST PRODUZIONE DI UOVA (Egg production test)

Verso il decimo o dodicesimo giorno dall'inserimento delle uova, corrispondente al raggiungimento dello stadio di adulto, gli organismi sono capaci di riprodursi e dunque è possibile analizzare quale sia la loro produzione di uova, verificando se la presenza del contaminante possa modificarla. L'inizio dell'egg production test viene fissato al dodicesimo giorno (la produzione generalmente è maggiore nelle prime fasi dello stadio di adulto).

Il test permette quindi, confrontando i risultati ottenuti dagli organismi esposti nel controllo con quelli in presenza di neonicotinoidi, di verificare se il contaminante possa aver inibito la capacità di *A. tonsa* di produrre uova. Il risultato ricavato è espresso come numero di uova prodotte al giorno per ciascuna femmina.

Il test è stato allestito (per tutti e tre i neonicotinoidi studiati) prelevando 15 femmine da ciascuna delle colture (controllo, 10 ng L^{-1} e 100 ng L^{-1}) e inserendole in provette da 15 mL (una femmina per ciascuna provetta) contenenti esclusivamente 10 mL di *medium* (quello della coltura madre). Il conteggio delle uova prodotte da ciascun adulto viene effettuato filtrando il contenuto di ciascuna provetta, contenente l'adulto e le uova, su dei filtri di cellulosa con griglia, per agevolare la lettura (diametro 47 mm e porosità $0.45 \mu\text{m}$). In seguito alla filtrazione è dunque possibile, con l'ausilio di uno stereoscopio, di valutare il numero di uova presenti). L'egg production test prevede che la lettura dei dati debba essere eseguita ogni 24 ore. Non potendo effettuare la lettura

ogni giorno, le femmine vengono lasciate nelle provette per un totale di 96 ore (a cui inizialmente è stato aggiunto il cibo) e il dato ricavato verrà poi diviso per il numero di giorni della durata del test, per ottenere la produzione ovigera giornaliera.

4.3 TEST DI SVILUPPO LARVALE UTILIZZANDO LA GENERAZIONE PARENTALE F₁

Il test di sviluppo larvale LDR (Larval Development Ratio) è un test di tipo sub-cronico e si basa sull'esposizione, a differenti concentrazioni di contaminante, delle uova di *A. tonsa*. Il test viene eseguito per valutare se la presenza di un tossico possa influire sul normale sviluppo larvale delle uova del copepode, ritardandolo. Il saggio dura 5 giorni e si basa sul fatto che, in condizioni ottimali, dopo circa 120 ore di esposizione approssimativamente la metà delle larve inizialmente esposte ha raggiunto lo stadio di copepodite (il rapporto nauplii:copepoditi dovrebbe di 1:1). Deviazioni da questo rapporto sono sintomatiche di un effetto tossico.

Per il corretto svolgimento del test, generalmente vengono utilizzate le uova prodotte al massimo 48 ore prima dell'inizio del saggio e lasciate in frigo in modo tale che esse non possano schiudersi. Il giorno dell'allestimento del test vengono eseguite delle analisi preliminari, quali misura dei parametri chimico-fisici (pH, concentrazione di ossigeno disciolto e sua saturazione) relativi alle soluzioni da cui verranno sottratte le uova e la valutazione della densità di uova disponibili per ciascun trattamento (il controllo e le due concentrazioni di neonicotinoide), filtrando un'aliquota di sospensione di uova nella stessa maniera indicata precedentemente nella procedura per la realizzazione del test di egg production. Sulla base del numero ottenuto dalla stima sono state prelevate delle quote di volume per poter avere un numero sufficiente di uova per lo svolgimento del test (l'ideale sarebbe 1,5 ogni mL di soluzione). Questo volume viene fatto passare tramite due setacci, di maglia 45 µm e 180 µm, per poter separare le uova da naupli e copepoditi. Le uova, successivamente, vengono fatte passare su di un filtro in cellulosa con griglia, dal diametro di 47 mm e porosità 0,45 µm. Questa procedura permette di poter effettuare un conteggio preciso delle uova

contenute in ciascuna aliquota. Dopo aver eliminato eventuali naupli presenti nel filtro, le uova vengono risciacquate direttamente in dei becker (da 100 mL), che fungono da camere test. Per poter valutare al meglio gli effetti che i pesticidi hanno sullo sviluppo larvale di *A. tonsa* è stato utilizzato un approccio fattoriale (**tab.9-allegato 7**). Le uova provenienti dalla coltura di controllo sono state esposte a soluzioni di controllo (C_T), a 10 ng L^{-1} (10_T) e a 100 ng L^{-1} (100_T). Quelle della coltura a 10 ng L^{-1} sono state esposte ad una soluzione di controllo, a 10 e 100 ng L^{-1} . Quelle provenienti dalla coltura a 100 ng L^{-1} sono state esposte a una soluzione di controllo, a 10 e 100 ng L^{-1} . Per migliorare la valutazione della significatività dei risultati sono state realizzate 6 repliche per ciascuno dei nove trattamenti indicati nella tabella 9 (**tab.9-allegato 7**). Ogni replica consiste in un numero minimo di 50 uova esposte in 25 mL di soluzione test, in becker da 100 mL.

Dopo aver inoculato tutte le uova, misurato i parametri chimico-fisici (pH, concentrazione di ossigeno disciolto e la sua saturazione) e aggiunto un'adeguata quantità di cibo ($5 \times 10^4 \text{ cell/ml}$), i becker devono essere messi in incubazione, ad una temperatura di $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (analoga a quella della coltura madre), per cinque giorni. Essendo il test basato sul rinnovo della soluzione, al secondo, massimo terzo giorno, si procede con il rinnovo delle soluzioni aggiungendo ulteriori 25 mL di soluzione nei becker e il mix di alghe ($5 \times 10^4 \text{ cell/ml}$).

Al giorno cinque, dopo 120 ore dall'inizio del test, inizia la fase di raccolta dati. Viene prelevato un campione di controllo, a cui viene aggiunto un volume di reattivo di "Lugol" (soluzione di iodio cristallino e ioduro di potassio), utilizzato perché colora e marca esclusivamente la materia organica viva e, dunque, facilita la procedura di conteggio di uova, naupli e copepoditi presenti all'interno dei becker. Il contenuto viene quindi filtrato, usando i filtri in cellulosa con griglia, e quindi è possibile, utilizzando lo stereoscopio effettuare il conteggio nel numero di uova, naupli e copepoditi presenti. Nello specifico, viene valutato il numero di uova schiuse, quante larve sono sopravvissute (naupli e copepoditi) e quanti, tra i naupli, hanno raggiunto stadio di copepodite. Se il rapporto tra naupli e copepoditi risulta essere similmente

60:40 allora si procede con l'inserimento della soluzione "Lugol" anche in tutti gli altri campioni e con conseguenti filtrazioni e conteggi. Se c'è ancora una marcata prevalenza di naupli (>60%) allora è necessario attendere due o tre ore per poi ripetere nuovamente la procedura. I risultati ottenuti coi conteggi vengono utilizzati per valutare tre distinti endpoint:

- rapporto uova schiuse/uova inoculate (endpoint: "Hatching");
- proporzione di larve morte (o sopravvissute : endpoint: "early-life stage mortality o ELS-m");
- proporzione di larve che sono giunte allo stadio di copepodite I ("larval development ratio o LDR").

Per poter considerare accettabili i risultati ottenuti dai test è fondamentale eseguire una procedura di controllo di qualità, per verificare che la coltura da cui sono stati prelevati gli organismi idonea e che quindi i valori ricavati siano attribuibili esclusivamente alla presenza dei neonicotinoidi. Il controllo di qualità prevede l'allestimento di un controllo positivo, utilizzando un tossico di riferimento (in questo caso 3,5-diclorofenolo) e di un controllo negativo, esclusivamente con l'acqua marina sintetica, il *medium*. Il test (controllo positivo) con 3,5-DCP viene eseguito esattamente con le stesse modalità del saggio subcronico LDR, valutando quindi, dopo 120 ore di esposizione, la percentuale di copepoditi presenti sul numero totale di individui in stadi giovanili (nauplii e copepoditi). Affinché il test possa essere considerato valido devono essere soddisfatti alcuni criteri, tra cui:

- La percentuale media di copepoditi dev'essere risultante almeno pari al $50 \pm 20\%$ degli individui totale sopravvissuti all'intera esposizione;
- Il risultato del saggio con 3,5-diclorofenolo deve fornire un LC_{50} con valori compresi tra 200-800 $\mu\text{g L}^{-1}$;

- La saturazione relativa all'ossigeno disciolto in acqua dev'essere superiore al 70%.

4.4 LDR-ESPRESSIONE DEL RISULTATO E ANALISI STATISTICA

I risultati del test di sviluppo larvale vengono espressi come proporzione di schiusa (hatching), early life stages mortality (ELS-m) e proporzione di sviluppo larvale (larval development ratio o LDR). Questi vengono calcolati utilizzando le seguenti equazioni:

$$\text{Eq.1 } H = ([uova (t_0) - uova (t_1)])/(uova (t_0))$$

$$\text{Eq. 2 } \text{ELS-m} = 1 - ((N. nauplii + N. copepoditi))/(uova (t_0) - uova (t_1))$$

$$\text{Eq. 3 } \text{LDR} = (N. copepoditi)/((N. nauplii \pm N. copepoditi))$$

Nelle equazioni uova (t_0) indica le uova che sono state inserite nei becker nel giorno 0, nel quale inizia il test, mentre uova (t_1) quelle osservate nelle fasi finali, corrispondenti alla lettura dei risultati del test.

Le analisi statistiche sono state effettuate seguendo lo schema presente in figura x. (**fig.14**). La normalità dei dati è stata valutata utilizzando il test di Shapiro-Wilk (o di Kolmogorov-Smirnov). Se i dati risultano non essere normali si applicherà un'analisi ANOVA di Kruskal-Wallis, mentre se lo sono si procederà con la valutazione dell'omogeneità delle varianze, servendosi del test di Levene o Barlett. In questo caso se p risulta essere superiore a 0.05 allora verrà effettuata un'analisi ANOVA a una via, con conseguente test HSD di Turkey. Nel caso contrario verrà eseguita l'analisi ANOVA di Welch seguita da test *post-hoc* di Games - Howell.

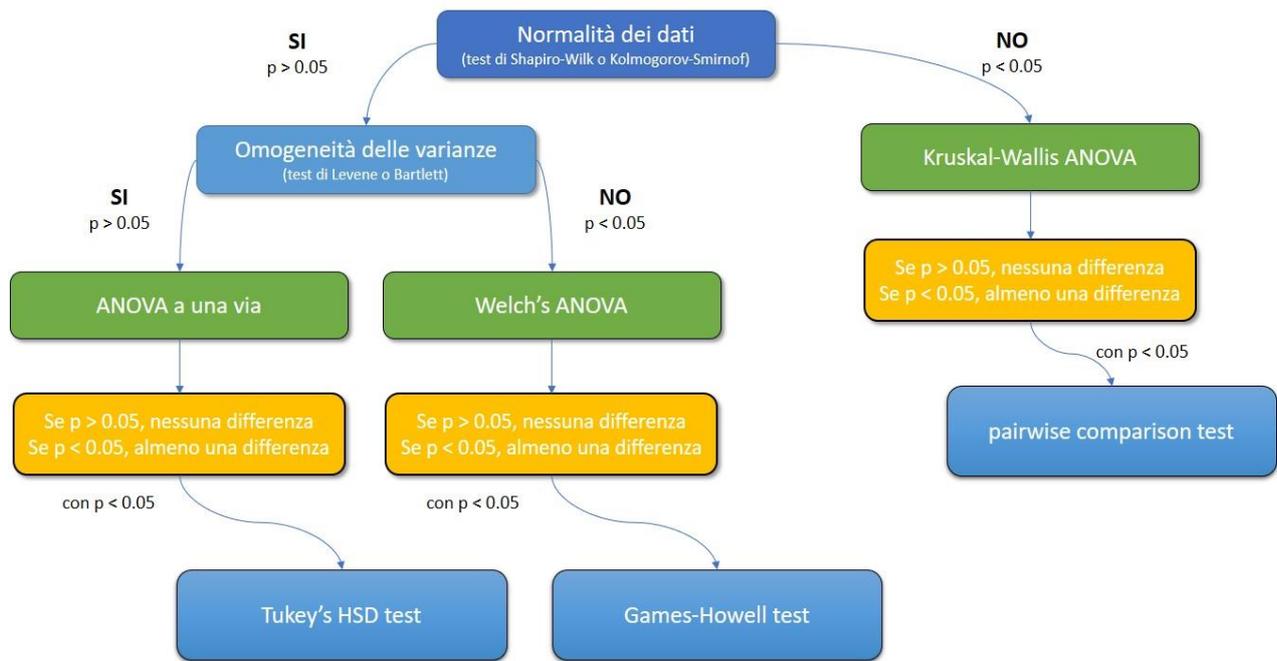


Fig.14 – Schema seguito per le analisi statistiche

5. RISULTATI

5.1 ACETAMIPRID

5.1.1 TEST – EGG PRODUCTION

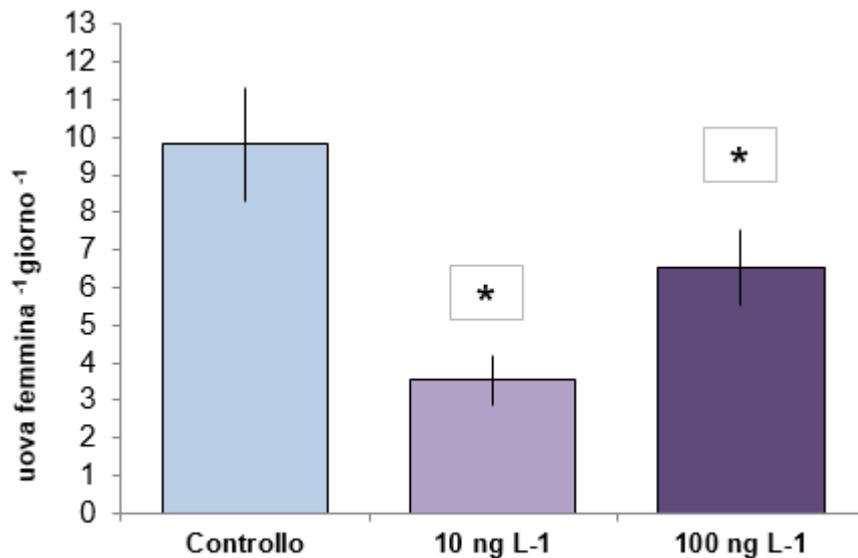


Fig. 15 – Risultati ottenuti dal test (con Acetamiprid) sulla produzione ovigera giornaliera di *A. tonsa*, nelle tre differenti colture. Le barre di errore indicano l'errore standard. Gli asterischi identificano i trattamenti significativamente diversi dal controllo (ANOVA ad una via e test post-hoc di Fisher; $\alpha = 0.05$).

Il grafico presente nella figura 15 (**fig.15**), evidenzia una differenza nella produzione di uova tra il controllo ed i due trattamenti di ACE. In particolare si nota come la più bassa produzione di uova (3.5 ± 0.7 uova per femmina per giorno) sia stata rilevata nella concentrazione 10 ng L^{-1} . L'analisi statistica conferma che le differenze osservate rispetto al controllo sono significative (ANOVA a una via: $F=8,561$, $p < 0.001$). Il test *post-hoc* di Fisher conferma che le differenze rispetto al controllo sono significative sia per la concentrazione 10 ng L^{-1} ($p < 0,001$) che per la concentrazione 100 ng L^{-1} ($p = 0,018$). Non sono invece da considerarsi significative le differenze tra i due trattamenti ($p = 0,101$). I dati grezzi sono presenti nell'allegato 8.

5.1.2 TEST – LDR

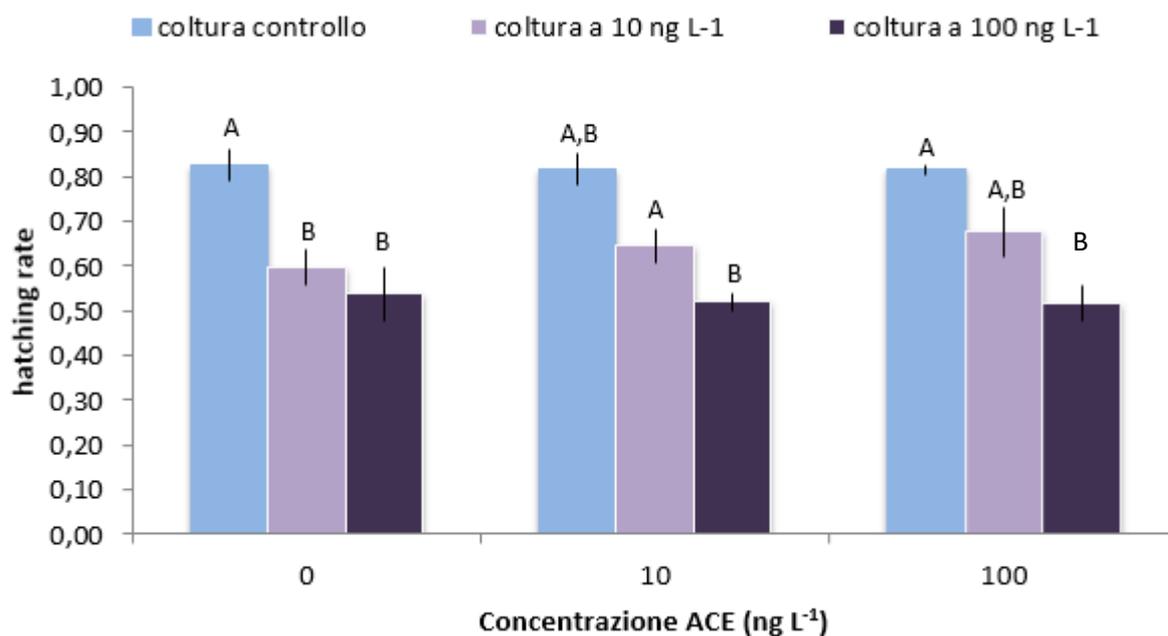


Fig.16 - Risultati inerenti al tasso di schiusa delle uova di *A. tonsa* in presenza di Acetamiprid, nelle tre differenti colture. Le barre di errore indicano l'errore standard. Le lettere A e B indicano i gruppi omogenei.

Il grafico (**fig.16**) mette in evidenza come il tasso di schiusa delle uova diminuisca all'aumentare della concentrazione di ACE. In ciascun trattamento il controllo risulta essere la coltura da cui provengono gli adulti, e quindi le uova, di maggior qualità. L'analisi statistica, ANOVA ad una via, esprime infatti che esistono differenze significative tra la schiusa delle uova generate da adulti maturati nella coltura di controllo e quelle relative alle colture con presenza di ACE. Risulta quindi significativa la differenza nella schiusa tra le uova provenienti dalla coltura di controllo e quella 10 e 100 ng L⁻¹ (ANOVA ad una via: $F = 9.975$; $p = < 0.001$). I dati grezzi sono presenti nell'allegato 10.

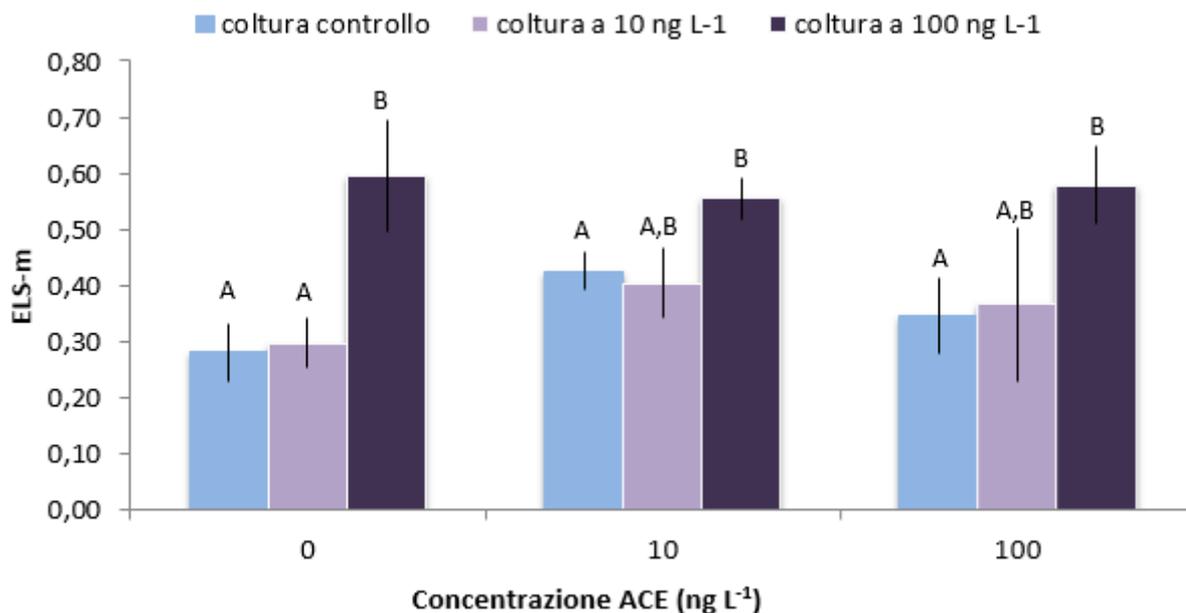


Fig.17 - Risultati inerenti alla mortalità degli early life stages (nauplii e copepoditi) generata da Acetamiprid su *A. tonsa*, nelle tre differenti colture. Le barre di errore indicano l'errore standard. Le lettere A e B indicano i gruppi omogenei.

Dal grafico (**fig.17**) si evince come la mortalità degli stadi giovanili cresca all'aumentare della concentrazione di ACE presente. Le differenze tra i trattamenti risultano infatti essere significative (*ANOVA ad una via*: $F = 2,723$; $p = 0,02$). I dati grezzi sono presenti nell'allegato 10.

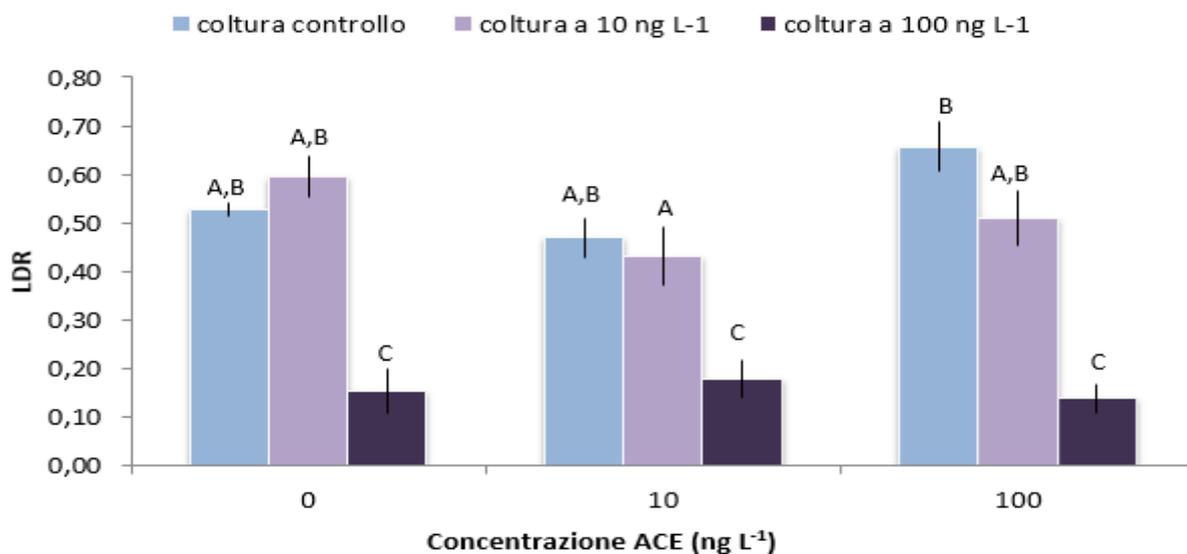


Fig.18 - Risultati ottenuti dal test (con Acetamiprid) sullo sviluppo larvale di *A. tonsa*, nelle tre differenti colture. Le barre di errore indicano l'errore standard. Le lettere A, B e C indicano i gruppi omogenei.

Dal grafico (**fig.18**) si evince come la presenza di ACE, alle concentrazioni di esposizione, influisca sullo sviluppo larvale delle uova. L'analisi ANOVA a una via evidenzia delle differenze significative tra lo sviluppo larvale delle uova cresciute in assenza di ACE (controllo) e quelle maturate con 10 e 100 ng L⁻¹ (ANOVA a una via: $F = 20,064$; $p = < 0,01$).

In particolare, lo sviluppo larvale delle uova cresciute a 100 ng L⁻¹ di ACE è significativamente ritardato rispetto a quello rilevato negli altri trattamenti. Ciò induce a pensare che a tale concentrazione ACE possa avere un notevole impatto sulla qualità delle uova, impedendo il corretto sviluppo delle larve. I dati grezzi sono presenti nell'allegato 10.

5.2 THIACLOPRID

5.2.1 TEST - EGG PRODUCTION

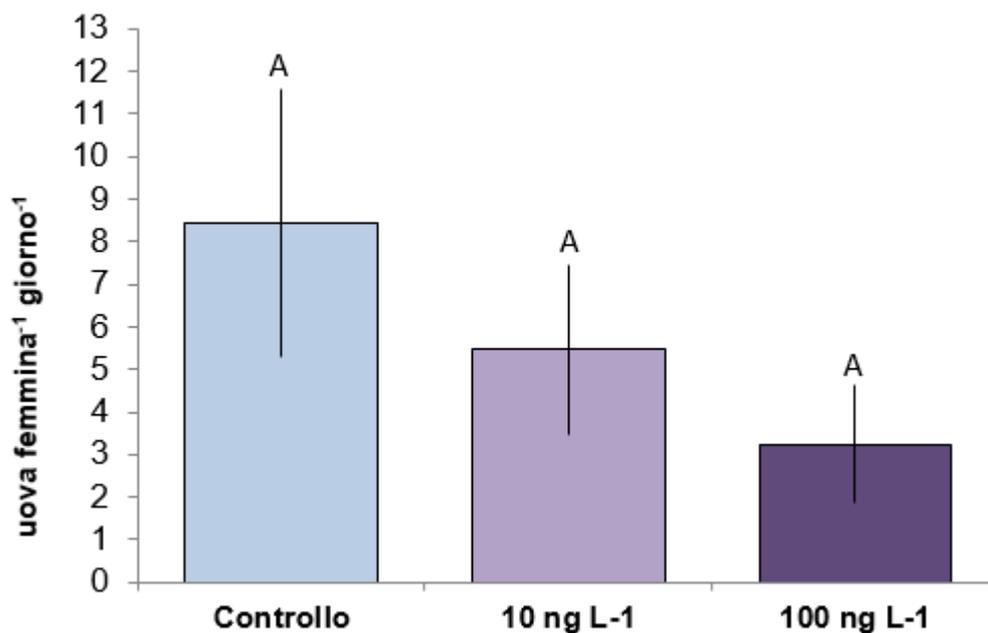


Fig. 19 – Risultati ottenuti dal test (con Thiachloprid) sulla produzione ovigera giornaliera di *A. tonsa*, nelle tre differenti colture. Le barre di errore indicano l'errore standard. La lettera indica il gruppo omogeneo.

Dal grafico (**fig.19**) si evince come vi sia una riduzione della produzione giornalieri di uova per femmina all'aumentare della concentrazione di THI. Infatti, si passa da una produzione media di 8.4 ± 3.1 uova per femmina per giorno del controllo, ad una produzione media di 3.3 ± 1.4 uova per femmina per giorno della concentrazione 100 ng L^{-1} . Tuttavia, l'analisi della varianza ad una via non rileva alcuna differenza significativa tra i diversi trattamenti (*ANOVA ad una via*: $F = 0,937$; $p = 0,406$). I dati grezzi sono presenti nell'allegato 12.

TEST - LDR

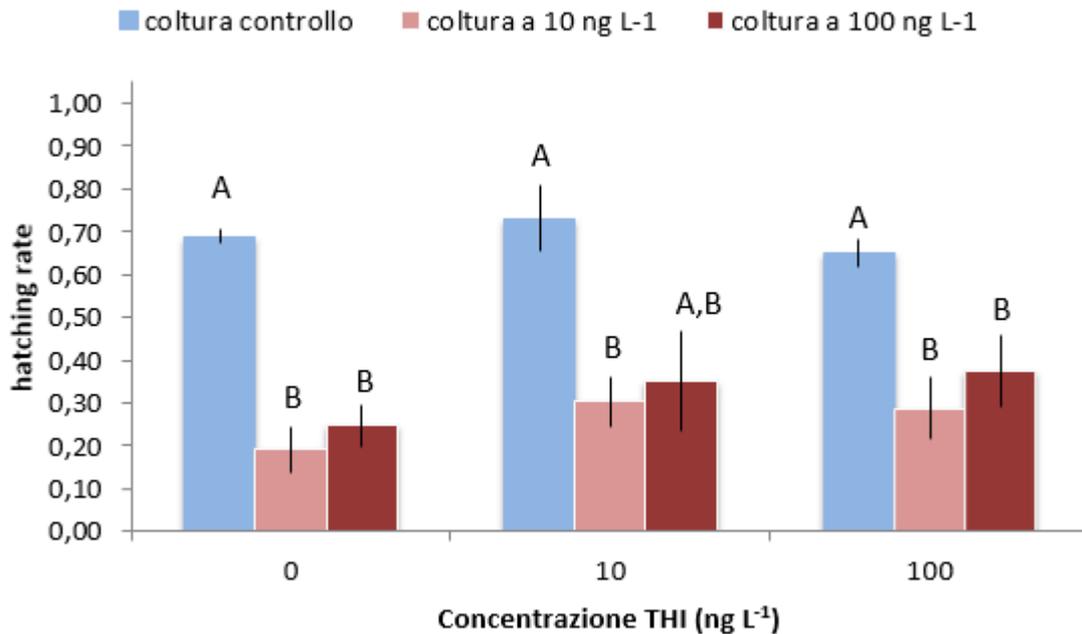


Fig.20 - Risultati inerenti al tasso di schiusa delle uova di *A. tonsa* in presenza di Thiocloprid, nelle tre differenti colture. Le barre di errore indicano l'errore standard. Le lettere A e B indicano i gruppi omogenei.

Il grafico presente nella figura (**fig.20**) evidenzia un tasso di schiusa significativamente maggiore nelle uova prodotte dalla coltura di controllo rispetto ai trattamenti a 10 e 100 ng L⁻¹, indipendentemente dalla concentrazione a cui sono state successivamente esposte le uova durante il test LDR. I dati grezzi sono presenti nell'allegato 14.

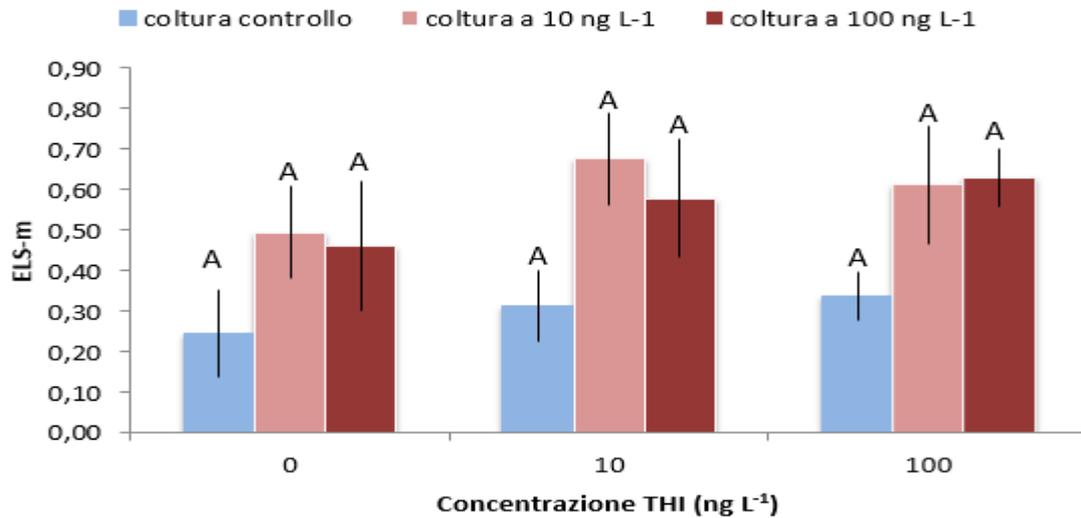


Fig.21 - Risultati inerenti alla mortalità degli early life stages (nauplii e copepoditi) generata da Thiacloprid su *A. tonsa*, nelle tre differenti colture. Le barre di errore indicano l'errore standard.

Il grafico di figura 21 (**fig.21**) mette in evidenza come vi sia una maggiore mortalità nelle larve nate da uova prodotte in presenza di THI rispetto al controllo, indipendentemente dalla concentrazione di THI cui sono state esposte le uova nel test LDR. Questa differenza non risulta tuttavia significativa (*ANOVA a una via*: $F = 1,386$, $p = 0,233$). I dati grezzi sono presenti nell'allegato 14.

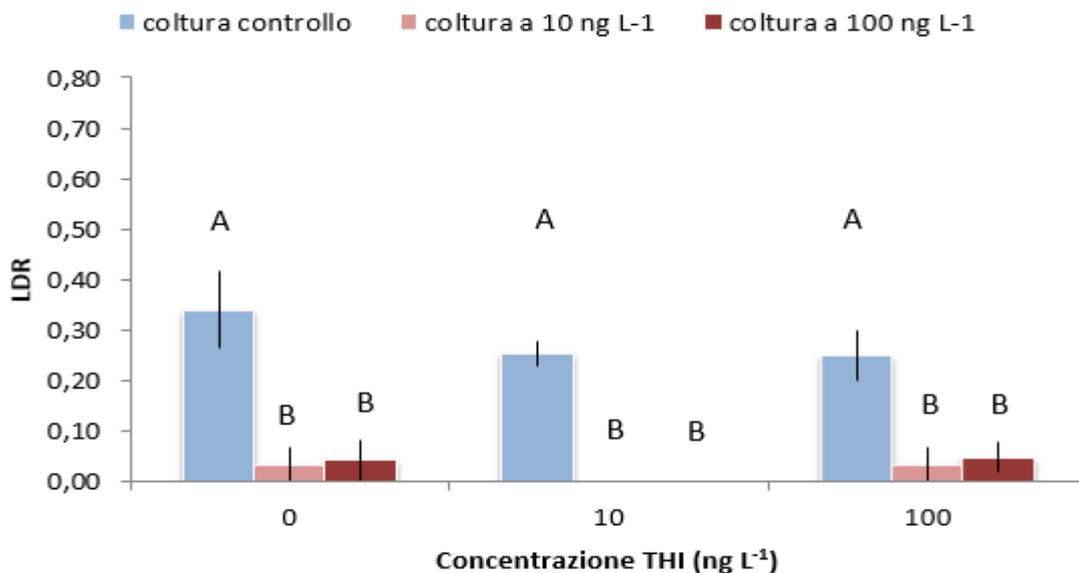


Fig.22 - Risultati ottenuti dal test (con Thiacloprid) sullo sviluppo larvale di *A. tonsa*, nelle tre differenti colture. Le barre di errore indicano l'errore standard. Le lettere A e B indicano i gruppi omogenei.

Il grafico di figura 22 (**fig.22**) mette in evidenza come l'esposizione a THI influenzi lo sviluppo larvale. Non ci sono differenze significative nello sviluppo larvale delle uova provenienti da genitori cresciuti nelle colture di controllo, indipendentemente dalla concentrazione di THI cui sono state esposte le uova nel test LDR. Le differenze sono significative solo tra i valori dello sviluppo larvale delle uova provenienti dalle colture di controllo rispetto a quelle cresciute in colture in presenza delle due concentrazioni di neonicotinoide. Non risultano essere significative le differenze tra lo sviluppo larvale delle uova cresciute nei trattamenti a 10 e 100 ng L⁻¹ di THI. I dati grezzi sono presenti nell'allegato 14.

5.3 THIAMETHOXAM

5.3.1 TEST- EGG PRODUCTION

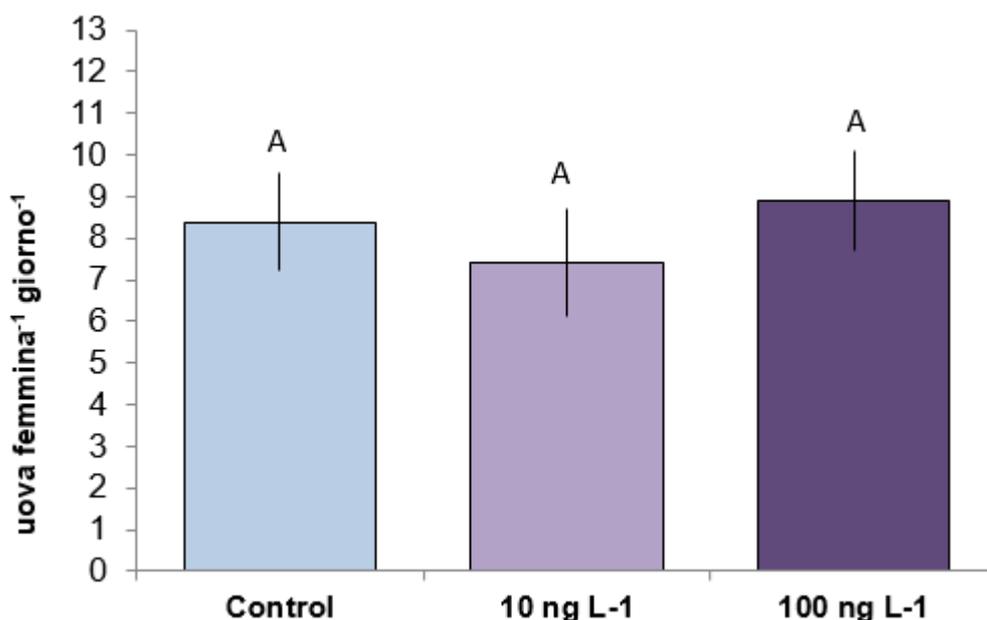


Fig. 23 – Risultati ottenuti dal test (con Thiamethoxam) sulla produzione ovigera giornaliera di A. tonsa, nelle tre differenti colture. Le barre di errore indicano l'errore standard. La lettera indica il gruppo omogeneo.

Dal grafico (**fig. 23**) si evince come la produzione giornaliera di uova non venga influenzata dalla presenza di TMX. Si passa da una media di 8.4 ± 1.2 , nel controllo, a 8.9 ± 1.2 in corrispondenza del trattamento a 100 ng L⁻¹. Le differenze, in termini di produzione giornaliera di uova per femmina, risultano, tramite analisi della varianza

ad una via, non essere significative (*ANOVA ad una via: $F = 0,386$; $p = 0,682$*). I dati grezzi sono presenti nell'allegato 16.

TEST – LDR

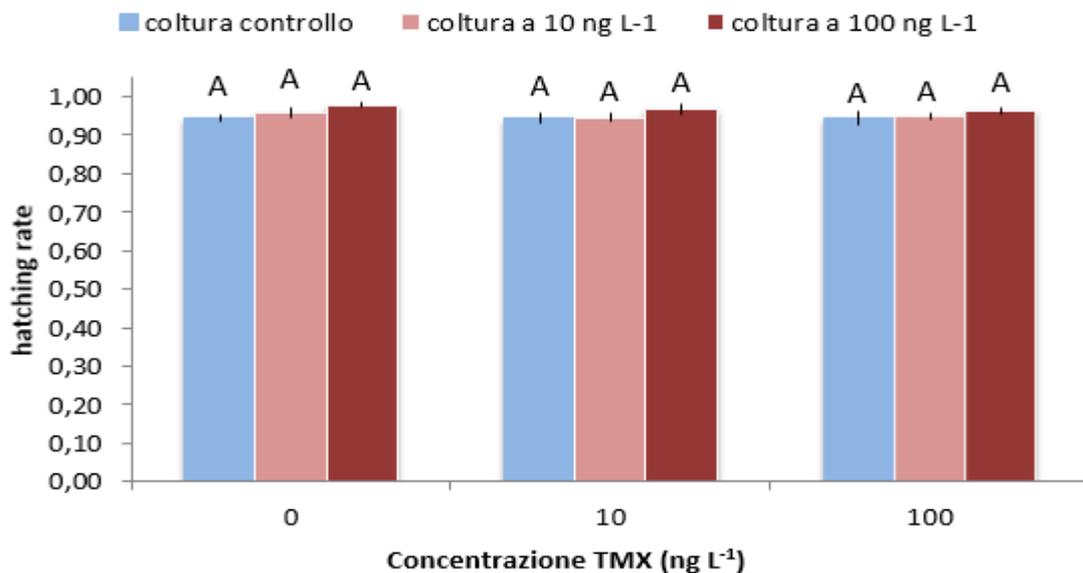


Fig.24 - Risultati inerenti al tasso di schiusa delle uova di *A. tonsa* in presenza di Thiametoxham, nelle tre differenti colture. Le barre di errore indicano l'errore standard. La lettera indica il gruppo omogeneo.

Il grafico di figura 24 (**fig.24**) evidenzia un tasso di schiusa pressoché equivalente in tutti i trattamenti, a prescindere dalla coltura in cui sono stati cresciuti gli adulti. L'analisi statistica (*ANOVA ad una via*) conferma che le differenze risultano non essere significative (*ANOVA ad una via: $F = 0,896$; $p = 0,529$*). I dati grezzi sono presenti nell'allegato 18.

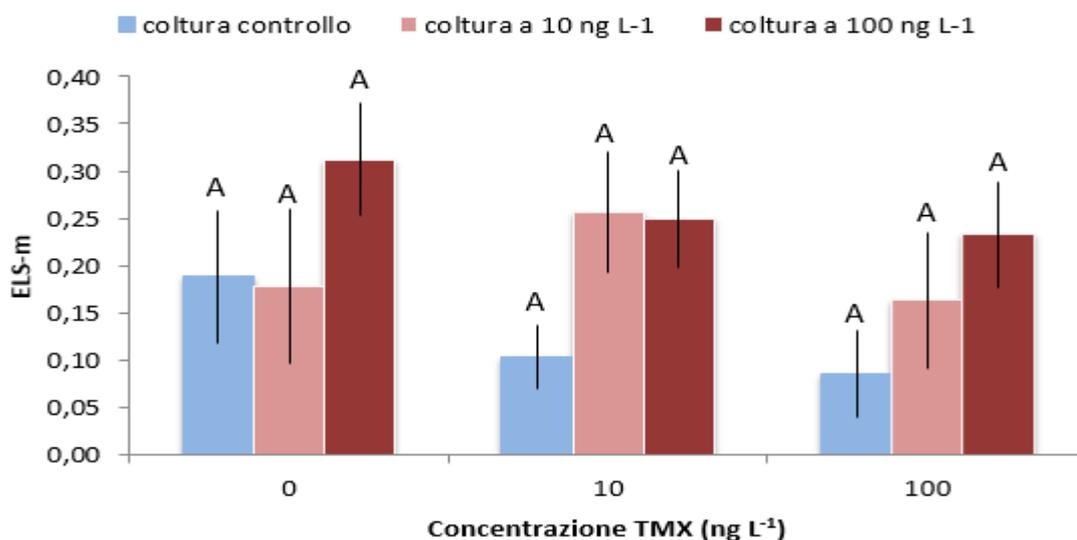


Fig.25 - Risultati inerenti alla mortalità degli early life stages (nauplii e copepoditi) generata da Thiametoxham su *A. tonsa*, nelle tre differenti colture. Le barre di errore indicano l'errore standard. La lettera indica il gruppo omogeneo.

Dal grafico (**fig. 25**) si evince come la mortalità dei giovani individui sia differente in base alla tipologia di coltura in cui sono maturate le uova. Le differenze, tuttavia, applicando l'analisi della varianza ad una via, non risultano essere significative. (ANOVA ad una via: $F = 1,466$, $p = 0,207$). I dati grezzi sono presenti nell'allegato 18.

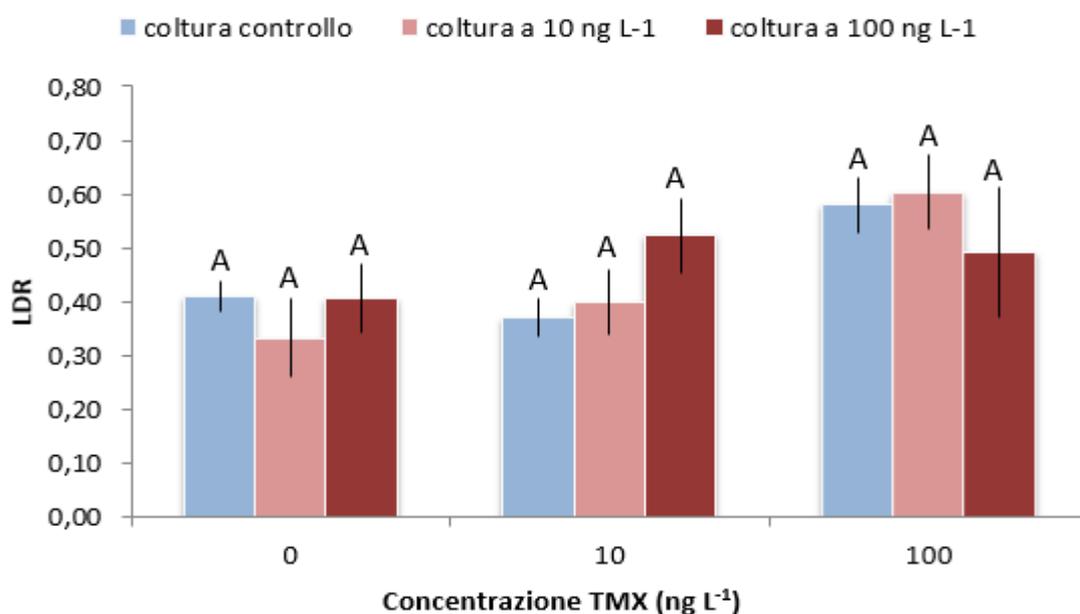


Fig.26 - Risultati ottenuti dal test (con Thiametoxham) sullo sviluppo larvale di *A. tonsa*, nelle tre differenti colture. Le barre di errore indicano l'errore standard. La lettera indica il gruppo omogeneo.

Dal grafico (**fig.26**) si evince come l'esposizione a TMX non influenzi lo sviluppo larvale. Le differenze tra i vari trattamenti, infatti, studiate tramite l'ausilio dell'analisi ANOVA a una via, non risultano essere significative, indipendentemente dalla concentrazione di TMX cui sono state esposte le uova nel test LDR (*ANOVA a una via: $F = 1,814$, $p = 0,102$*). TMX parrebbe, dunque, alle concentrazioni saggiate, non influire sullo sviluppo larvale, lasciando sostanzialmente inalterato il rapporto nauplii: copepoditi. I dati grezzi sono presenti nell'allegato 18.

6. DISCUSSIONE

6.1 ACETAMIPRID

Le concentrazioni di esposizione di ACE utilizzate in questo lavoro influenzano la produzione di uova, in termini di uova prodotte. I valori più bassi ottenuti, espressi come media di uova prodotte nei giorni 14, 15 e 16 dall'inizio del test cronico, sono corrispondenti al trattamento a 10 ng L^{-1} . Dunque, già dalla concentrazione minore di ACE emergono problematiche nella produzione delle uova. Risultati analoghi sono stati ottenuti studiando il tasso di schiusa delle uova. Quest'ultimo diminuisce significativamente all'aumentare della concentrazione di ACE a cui le uova sono state esposte durante il test LDR. Le differenze nel tasso di schiusa sono significative confrontando i valori ottenuti con il controllo e quelli relativi ai trattamenti a concentrazione di ACE. Ciò significa che a 10 ng L^{-1} è già stata superata la concentrazione soglia di non effetto. Le differenze non risultano essere significative tra le concentrazioni di 10 e 100 ng L^{-1} , dunque le problematiche che maturano con la presenza, seppur minima, di ACE non vengono accentuate aumentando di un ordine di grandezza di concentrazione. La mortalità degli stadi giovanili aumenta, significativamente, al crescere della concentrazione di esposizione di ACE. Marcate differenze significative sono state rilevate nel caso dello sviluppo larvale, decisamente ritardato, rispetto al controllo, in presenza di 100 ng L^{-1} di ACE. Il neonicotinoide quindi risulta avere, alle concentrazioni di esposizione applicate in questo lavoro, un notevole impatto su *A. tonsa*, a livello di quantità di uova prodotte, ma anche della loro qualità. ACE, infatti, non solo influisce sul numero di uova prodotte per ciascuna femmina adulta, ma anche sulla loro vitalità, come dimostrano il tasso di schiusa e lo sviluppo larvale. Quindi è opportuno affermare che l'esposizione a queste concentrazioni di ACE crea problemi sia agli organismi adulti, che producono meno uova, sia a quest'ultime, con conseguenti alterazioni nella mortalità degli stadi giovanili e nel loro sviluppo larvale.

6.2 THIACTOPRID

La presenza di THI, alle concentrazioni utilizzate in questo lavoro, non ha nessun impatto significativo sulla quantità delle uova prodotte per ciascuna femmina, anche se si evidenzia una tendenza alla diminuzione delle uova prodotte all'aumentare della concentrazione di THI. Si può quindi affermare che gli adulti esposti non hanno subito pressioni tali da indurre una difficoltà nella produzione giornaliera di uova. La schiusa varia significativamente tra le colture (le uova prodotte da controllo hanno tasso di schiusa più alto rispetto alle uova prodotte a 10 e 100 ng L⁻¹). Essa non varia però in maniera significativa all'aumentare della concentrazione di THI cui sono state esposte le uova durante il test. Il fatto che la schiusa resti invariata al variare della concentrazione di esposizione durante il test LDR, per le uova prodotte da tutte e 3 le colture, è indicativo del fatto che il danno subito dalle uova sia da ricondurre all'esposizione degli adulti durante la fase di sviluppo larvale e maturazione. Infatti, se ci fosse un contributo legato all'esposizione durante la fase del test LDR si sarebbe osservata una diminuzione della schiusa all'aumentare della concentrazione di esposizione. La differenza nella mortalità degli stadi giovanili risulta non essere significativa tra i vari trattamenti applicati in questo lavoro. Le concentrazioni di esposizione dunque non sono tali da poter influire sulla mortalità nei primi stadi di sviluppo delle uova. Lo sviluppo larvale risulta essere invece condizionato dalle concentrazioni di THI a cui sono stati esposti gli organismi nelle colture. L'analisi della varianza a una via conferma ciò che il grafico (**fig. 22**) mette in evidenza, ossia la presenza di differenze significative tra i valori di sviluppo larvale delle uova provenienti dalla coltura di controllo rispetto a quelle maturate in presenza di THI. Non sono state rilevate differenze significative nei valori di sviluppo larvale tra i trattamenti a 10 e 100 ng L⁻¹. I risultati indicano come a fare la differenza nello sviluppo larvale siano le condizioni di esposizione degli adulti che hanno prodotto le uova, piuttosto che quelle di esposizione delle uova nei 5 giorni di durata del test LDR. Infatti 10 ng L⁻¹ e 100 ng L⁻¹ risultano essere concentrazioni di non effetto per lo sviluppo larvale di uova prodotte in condizioni ottimali e quindi l'effetto rilevato nei test è legato

all'alterazione del processo di produzione di gameti durante la fase di crescita degli adulti.

6.3 THIAMETOXAM

Dal grafico presente in figura 23 (**fig.23**) subito si evince come la presenza di TMX, alle concentrazioni di esposizione, non condizioni la produzione giornaliera di uova. Non sono state rilevate infatti differenze significative tra i dati ottenuti nel controllo e quelli relativi alla concentrazione maggiore. Si può quindi affermare che gli adulti non subiscano, alle concentrazioni saggiate, pressioni tali da indurre problematiche nella produzione di uova, in termini quantitativi. Il tasso di schiusa (**fig.24**) risulta essere praticamente analogo in tutti i trattamenti. Le concentrazioni saggiate risultano quindi non impattare sul successo riproduttivo e non influenzare la qualità delle uova, che, schiudendosi correttamente, appaiono vitali. Il grafico presente nella figura x (**fig. 25**) suggerisce come la mortalità degli stadi giovanili sia diversa tra il controllo e i trattamenti con concentrazione di TMX, tuttavia le analisi statistiche svolte (*ANOVA a una via: $F = 1,466$ e $p = 0,207$*) evidenziano l'assenza di differenze significative tra i vari trattamenti. L'esposizione dei genitori a queste concentrazioni di TMX non influenza quindi la sopravvivenza delle larve. Lo sviluppo larvale delle uova esposte a TMX è rappresentato nel grafico 26 (**fig.26**). Anche in questo caso non sono state rilevate differenze significative tra i vari trattamenti. In conclusione, alle concentrazioni di esposizione utilizzate in questo lavoro, rimangono sostanzialmente inalterate quantità e qualità delle uova e quindi TMX risulta essere non impattante per il successo riproduttivo di *A. tonsa*.

6.4 CONFRONTO CON ALTRI INDICATORI PER AMBIENTI MARINI ED ESTUARINI

Per quanto concerne la sensibilità di altre specie marine ed estuarine ai neonicotinoidi, Hano et al., (2019), hanno valutato la tossicità di diversi neonicotinoidi su *Penaeus japonicus*, *Crangon uritai* e *Americamysis bahia*, tre crostacei presenti nelle zone costiere giapponesi (Hano et al., 2019). Per tutti loro sono stati eseguiti dei test acuti, a 96 ore, per poter estrapolare i valori delle EC50 e delle LC50, ovvero le concentrazioni che comportano, rispettivamente, effetti particolari o mortalità sul 50% degli individui utilizzati nei saggi. I valori di EC50 e LC50 relativi ad ACE sono di, circa, 31 e 85 $\mu\text{g L}^{-1}$ per *P. japonicus*, 3500 e 4500 $\mu\text{g L}^{-1}$ per *C. uritai* e 19 e 24 $\mu\text{g L}^{-1}$ per *A. bahia*. I medesimi test, svolti utilizzando THI, hanno riportato i seguenti risultati: EC50 e LC50 di 20 e 64 $\mu\text{g L}^{-1}$ per *P. japonicus*, 490 e 1800 $\mu\text{g L}^{-1}$ per *C. uritari* e 47 e 67 $\mu\text{g L}^{-1}$ per *A. bahia*. TMX è risultato essere, tra i neonicotinoidi studiati da Hano nel 2019, il meno impattante. Infatti i valori di EC50 e LC50, sono 940 e 3900 $\mu\text{g L}^{-1}$ per *P. japonicus*, 820 e 2200 $\mu\text{g L}^{-1}$ per *C. uritai*, 4100 e 4100 $\mu\text{g L}^{-1}$ per *A. bahia*.

I risultati riportati da Hano, per quanto ricavati da test effettuati con diverse modalità di esposizione ai contaminanti da quelle adottate in questo lavoro, mettono in evidenza come le differenze di tossicità esercitate dai neonicotinoidi sui tre crostacei siano analoghe a quelle ottenute dai test cronici eseguiti su *A. tonsa*. Tra ACE, THI e TMX, l'ultimo risulta essere il meno impattante, sia per il successo riproduttivo di *A. tonsa*, sia per la mortalità dei tre crostacei (Hano et al. 2019). ACE e THI, al contrario, emergono come sostanze ad impatto sicuramente maggiore rispetto a TMX. Entrambe influenzano la quantità e qualità delle uova prodotte dagli adulti di *A. tonsa*, impattando la schiusa, la mortalità degli stadi giovanili e il corretto sviluppo larvale. I valori delle EC50 e delle LC50 relativi alle due sostanze, nei tre crostacei presi in esame da Hano, sono di due o tre ordini di grandezza superiori rispetto a quelli appartenenti a TMX.

Americamysis bahia è stata spesso utilizzata come bioindicatore nei test cronici per lo studio degli impatti derivanti dall'esposizione a pesticidi neonicotinoidi. Esistono infatti dei dati relativi alla tossicità di ACE, THI e TMX. Finnegan et al., (2017), hanno

condotto un test cronico, a 28 giorni, valutando quale fosse la concentrazione massima di TMX che non produce alcun effetto sugli organismi (NOEC), basandosi su diversi endpoint. La NOEC relativa alla sopravvivenza è di $0.56 \mu\text{g L}^{-1}$, mentre quella inerente alla produzione di uova $2 \mu\text{g L}^{-1}$. Wildlife International Inc. ha svolto un test cronico a 32 giorni, valutando l'effetto di THI su *A. bahia*, utilizzando come endpoint la crescita degli organismi. La LOEC è risultata essere pari a $2.2 \mu\text{g L}^{-1}$. Springborn Laboratory Inc, invece, effettuando un test cronico esponendo *A. bahia* a ACE per 28 giorni, ha rilevato un EC50 di $4.7 \mu\text{g L}^{-1}$. L'endpoint utilizzato è la crescita degli individui.

7. CONCLUSIONI

I dati ottenuti dai test di tossicità, effettuati esponendo *A. tonsa* a tre diversi neonicotinoidi, sono abbastanza eterogenei. TMX, uno dei 3 principi attivi per cui vale bando totale degli impieghi su colture outdoor, è risultato essere, alle concentrazioni di esposizione utilizzate in questo lavoro (10 ng L⁻¹ e 100 ng L⁻¹), il neonicotinoide meno impattante. Esso infatti non ha causato modifiche significative nella quantità di uova prodotte dalle femmine adulte. La schiusa e il conseguente sviluppo larvale sono rimasti pressoché inalterati rispetto al controllo. Differenze significative, rispetto al controllo, sono state rilevate invece in THI e ACE. Il primo, infatti, ha causato problemi prevalentemente nella schiusa delle uova e nel conseguente sviluppo larvale. Il test LDR ha messo in evidenza come già a 10 ng L⁻¹ THI possa notevolmente influenzare il corretto sviluppo larvale di *A. tonsa*, rallentandolo. Questa problematica è riconducibile direttamente all'esposizione degli adulti, in quanto tutte le uova provenienti da colture con concentrazione di THI riportano valori di sviluppo larvale significativamente diversi rispetto a quelli ottenuti dalle uova generate della coltura di controllo. ACE, allo stesso modo, ha comportato alterazioni, oltre che nel numero di uova prodotte, nella qualità di esse. Lo sviluppo larvale risulta essere particolarmente impattato alla concentrazione di 100 ng L⁻¹, con differenze significative rispetto ai dati relativi al controllo. ACE e THI, dunque, alle concentrazioni di esposizione applicate in questo lavoro (10 ng L⁻¹ e 100 ng L⁻¹), risultano essere impattanti sul successo riproduttivo di *A. tonsa*. I dati relativi alle concentrazioni ambientali dei neonicotinoidi mettono in evidenza come esse siano, in numerosi casi, superiori rispetto a quelle utilizzate in questo lavoro per l'esposizione ad *A. tonsa*. Nelle acque superficiali di aree a contatto con colture o terreni agricoli, sono stati registrati valori di presenza di neonicotinoidi pari a 1.4 µg L⁻¹ di THI a Sydney o 1.5 µg L⁻¹ TMX in California (Morrissey et al., 2015). Nella baia di Jiaozhou, in Cina, è stata rilevata la presenza di ACE, in concentrazioni inferiori a 1 ng L⁻¹ (Li et al., 2019).

Il monitoraggio dei pesticidi nelle zone costiere ed estuarine mette in evidenza come gli input di neonicotinoidi possano superare le concentrazioni critiche quasi esclusivamente a causa di runoff stagionali da terreni agricoli o scarichi puntuali. Gli studi di Hano et al. (2019) e Miller et al. (2021) hanno rilevato, studiando rispettivamente le acque del Mare di Seto (Giappone) e del fiume Colne (UK), come i valori di NOEC relativi a IMI ed ACE per *A. tonsa* vengano superati solo nei periodi corrispondenti ad un'intensa applicazione di pesticidi in ambito agricolo, ossia tra Giugno e Settembre. Nelle altre stagioni, invece, i valori della concentrazione di ACE e Imi, risultano essere inferiori alla NOEC. Dunque, è possibile definire un periodo in cui, causa incremento nell'utilizzo di pesticidi, ci sono maggiori rischi per gli organismi acquatici. Se *A. tonsa* dovesse entrare in contatto con una concentrazione analoga a quelle precedentemente citate, corrispondenti a tre ordini di grandezza superiori rispetto a quelle utilizzate in questo lavoro, i danni sarebbero ulteriormente marcati, comportando forti difficoltà per la sopravvivenza del copepode. *A. tonsa* rappresenta una componente piuttosto importante per gli ecosistemi marini ed ha un ruolo chiave all'interno delle reti trofiche marine. L'esposizione a neonicotinoidi, alle concentrazioni ambientali rilevate da Morrissey et al. (2015), comporterebbe quindi una serie di danni di notevole rilevanza, quali scomparsa di popolazioni locali di *A. tonsa* ed alterazione della struttura delle comunità.

8. BIBLIOGRAFIA

- Alford A. and Krupke C. H., (2017), Translocation of the neonicotinoid seed treatment clothianidin in maize, PloS One, 12 (3), e0173836;
- Alver M.O., Storøy W., Bardal T., Overrein I., Onsøyen M.K., Tennøy T., Øie G., (2011). Automatic measurement of *Acartia tonsa* nauplii density, and estimation of stage distribution. Aquaculture 313, 100–106;
- Nakayama A., Sukekawa M., Eguchi Y., (1997). "Stereochemistry and active conformation of a novel insecticide, acetamiprid". Pesticide Science. 51 (2),157;
- Andersen H.R., Wollenberger L., Halling-Sørensen B., Kusk K.O., (2001), Development of copepod nauplii to copepodites - A parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. Environmental Toxicology and Chemistry, 20, 2821–2829;
- Baskaran S, Kookana R.S., Naidu R., (1999), Degradation of bifenthrin, chlorpyrifos and imidacloprid in soil and bedding materials at termiticidal application rates. Pesticide Science 55, 1222–1228;
- Mikhail A. Beketov e Matthias Liess, (2007), Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods, Environmental Toxicology and Chemistry, 27 (2), 461–470;
- Bengtsson B.E., (1978), Use of an harpacticoid copepod in toxicity tests, Marine Pollution Bulletin, 9, 238-241;
- Brandt A., Gorenflo A., Siede R., Meixner M., Büchler R., (2016), The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.), Journal of Insect Physiology, 86, 40-47;

- Bromilow R.H., Chamberlain K., (1995), Principles governing uptake and transport of chemicals. Plant contamination: modelling and simulation. Lewis Publishers, London, 37–64;
- Butcherine P., Benkendorff K., Kelaher B., Bronwyn J. Barkl, (2019), The risk of neonicotinoid exposure to shrimp aquaculture, Chemosphere, 217, 329-348;
- Casida J.E., (2011), Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. Journal of Agricultural Food Chemistry, 59, 2923–2931;
- Casida J. E., Durkin K., (2013), Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance and secondary effects, Annual Review of Entomology, 58, 99-117;
- Chagnon M., Kreutzweiser D, Mitchell E., Morrissey C., Noome D., et al (2014) Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. Environmental Science and Pollution Research, 22, 119–134;
- DeCant J (2010) Clothianidin registration of Prosper T400 seed treatment on mustard seed (oilseed and condiment) and Poncho/Votivo seed treatment on cotton. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC;
- Simon-Delso, N.; Amaral-Rogers, V.; Belzunces, LP.; Bonmatin, JM.; Chagnon, M.; Downs C.; Furlan, L.; Gibbons, DW.; Giorio, C.; Girolami, V.; Goulson, D.; Kreutzweiser, DP.; Krupke, CH.; Liess, M.; Long, E.; McField, M.; Mineau, P.; Mitchell, EA.; Morrissey, CA.; Noome, DA.; Pisa, L.; Settele, J.; Stark, JD.; Tapparo, A.; Van Dyck, H.; Van Praagh, J.; Van der Sluijs, JP.; Whitehorn, PR.; Wiemers, (2015), Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites, Environ Science and Pollution Research, 22, 5–34;
- European Food Safety Authority (EFSA) (2012) Statement on the findings in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorised in Europe. EFSA Journal 10 (6), 2752;

- EFSA (European Food Safety Authority), (2018). Neonicotinoids: risk to bees confirmed;
- FAO, (2000), Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides: Thiamethoxam;
- Finnegan M.C., Baxter L.R., Maul J.D. et al., (2017), Comprehensive characterization of the acute and chronic toxicity of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam to a suite of aquatic primary producers, invertebrates, and fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36, 2838–2848;
- Gaudy, R.; Vinas, M., (1985), Première signalization en Méditerranée du copépode pélagique *Acartia tonsa*, *Rapp Comm Int Mer Médit*, 29(9), 227-229;
- Gerecke A.C., Schärer M., Singer H.P., Muller S.R., Schwarzenbach R.P., Sägesser M., Ochsenbein U., Popow G., (2002), Sources of pesticides in surface waters in Switzerland: pesticide load through waste water treatment plants—current situation and reduction potential. *Chemosphere* 48, 307–315;
- Gibbons D, Morrissey C. and Mineau P., (2014), A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 103–118;
- Gonzalez, J.G., (1974). Critical thermal maxima and upper lethal temperatures for the calanoid copepods *Acartia tonsa* and *A. clausi*. *Marine Biology*, 27, 219–223;
- Gorbi G., Invidia M., Savorelli F., Faraponova O., Giacco E., Cigar M., Buttino I., Leoni T., Prato E., Lacchetti I., Sei S., (2012), Standardized methods for acute and semichronic toxicity tests with the copepod *Acartia tonsa*. *Environ Toxicol Chemosphere*, 31, 2023–2028;
- Gray B., *The Pathways of My Research: A Journey of Personal Engagement and Change*, (1989), *The Journal of Applied Behavioral Science*, 25(4), 383–398;

- Guillard, R.R.L., (1975), Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate. In: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), Culture of Marine Invertebrates Animals. Plenum, New York, 296 – 360;
- Gupta S, Gajbhiye VT, Gupta R.K., (2008), Soil dissipation and leaching behavior of a neonicotinoid insecticide thiamethoxam. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 80, 431–437;
- Hano T., Ito K., Ohkubo N., Sakaji H., Watanabe A., Takashima K., Sato T., Sugaya T., Matsuki K., Onduka T., Ito M., Somiya R., Mochida K., (2019), Occurrence of neonicotinoids and fipronil in estuaries and their potential risks to aquatic invertebrates, 252 (A), 205-215;
- Hutchinson T.H., Williams T.D., Eales G.J., (1994), Toxicity of cadmium, hexavalent chromium and copper to marine fish larvae (*Cyprinodon variegatus*) and copepod (*Tisbe battagliai*). Marine Environmental Research 38, 275-290;
- M. L. Hladik, D. W. Kolpin, K. M. Kuivila, (2014), Widespread occurrence of neonicotinoid insecticides in streams in a high corn and soybean producing region, USA, Environmental Pollution, 193, 189-196;
- ICRAM (2006). Guida al riconoscimento del plancton dei mari italiani;
- Invidia M., Sei S., Gorbi G., (2004), Survival of the copepod *Acartia tonsa* following egg exposure to near anoxia and sulfide at different pH values, Marine Ecology Progress Series, 276, 187–196;
- Iserentant R., De Sloover J., (1976), Le concept de biondicateur;
- ISO 14669 (International Standard Organization), (1999), Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea);
- ISO 16778, (2015), Water quality-Calanoid copepod development test with *Acartia tonsa*. ISO/FDIS16778. Calanoid copepod early-life stage test with *Acartia tonsa*. ISO, Genève, Switzerland;
- ISPRA, (2019), Saggio di sviluppo larvale in presenza di sediment con il copepode calanoide planctonico *Acartia tonsa* (Dana, 1848);

- Jepsen, P.M.; Andersen, N.; Holm, T.; Jørgensen, A.T.; Højgaard, J.K.; Hansen, B.W., (2007), Effects of adult stocking density on egg production and viability in cultures of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana), *Aquaculture Research*, 38, 764–772;
- Jeschke P. and Nauen R., (2008), Neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry, *Pesticide Management Science* 64(11), 1084-98;
- Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A, (2011), Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 2897–2908;
- Kiørboe T., Mohlenberg F., Hamburger K., (1985). Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action, *Marine Ecology Progress Series*, 26, 85–97;
- Kusk K.O., Wollenberger L., (2007), Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disruptors in marine copepods. *Ecotoxicology* 16, 183–195;
- Lambertson, J.O.; DeWitt, T.H.; Swartz, R.C, (1992), Assessment of sediment toxicity to marine benthos: In: *Sediment Toxicity Assessment*, Lewis Publication, 183-211;
- Lee W., (1977). Some laboratory cultured crustaceans for marine pollution studies. *Mar Poll Bull*, 8 (11), 258–259;
- Li X., Chen J., He X. et al., (2019), Simultaneous determination of neonicotinoids and fipronil and its metabolites in environmental water from coastal bay using disk-based solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 234, 224–231;
- Maxim, L., van der Sluijs, J., (2013). Seed-dressing systemic insecticides and honeybees. In: *Late Lessons from Early Warnings*, EEA Report 1/2013;

- Maienfisch P., Angst M., Brandl F., Fischer W., Hofer D., Kayser H., Kobel W., Rindlisbacher A., Senn R., Steinemann A. and Widmer H., (2001), Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoids, *Pesticide Management Science*, 57, 906-913;
- Mauchline, J., (1998). *The Biology of Calanoid Copepods*. Elsevier Academic London, UK, 710;
- Medina M. and Barata C., (2004), Static-renewal culture of *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) for ecotoxicological testing. *Aquaculture*, 229, 203–213;
- Miller TH, Keng Tiong Ng , Lamphiere Aaron, Tom C.Cameron, Nicolas R. Bury, Leon P. Barron, (2021), Multicompartment and cross-species monitoring of contaminants of emerging concern in an estuarine habitat. *Environmental Pollution* 270, 116300;
- Morrissey, C.A.; Mineau, P.; Devries, J.H.; Sanchez-Bayo, F.; Liess, M.; Cavallaro, M.C.; Liber, K. (2015), Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review, 74, 291-303;
- Murphy J.A. and Cohen R.E., (1978). A guide to the developmental stages of common coastal, Georges Bank and Gulf of Maine Copepods. National Marine Fisheries Service, Northeast Fisheries Center, Woods Hole Laboratory, Woods Hole, MA 02543, Laboratory Reference, 78-53;
- Negrão De Carvalho R, Ceriani L, Ippolito A, Lettieri T., (2015), Development of the First Watch List under the Environmental Quality Standards Directive. EUR 27142. Luxembourg (Luxembourg): Publications Office of the European Union; JRC95018;
- Paffenhöfer, G.-A., Stearns, D.E., (1988). Why is *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) restricted to nearshore environments? *Marine Ecology Progress Series*, 42, 33–38.
- Picone M., Bergamin M., Delaney E., Volpi Ghirardini A., Kusk K.O., (2018), Testing lagoonal sediments with early life stages of the copepod *Acartia tonsa*

- (Dana): an approach to assess sediment toxicity in the Venice Lagoon, *Ecotoxicology Environmental Safety*, 147, 217-227;
- D. Pietrzak, J. Kania, G. Malina, E. Kmiecik and K. Wator, (2019), Pesticides from the EU First and Second Watch List in the Water Environment;
 - Pisa L, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin J-M, Downs C, Goulson D, Kreuzweiser D, Krupke C, Liess M, McField M, Morrissey C, Noome DA, Settele J, Simon-Delso N, Stark J, van der Sluijs, van Dyck H, Wiemers M (2014), Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates, *Environmental Science and Pollution Research* volume 22, 68–102;
 - Reeve, M.R., Walter, M.A., (1977). Observations on the existence of lower threshold and upper critical food concentrations for the copepod *Acartia tonsa* Dana. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 29, 211–221;
 - Ruppert, Edward E., Barnes, Robert D., (1994), *Invertebrate zoology*;
 - Sabatini, M.E., (1990). The Developmental Stages (Copepodids I to VI) of *Acartia tonsa* Danae, 1849 (Copepoda, Calanoida). *Crustaceana* 59 (1), 53-61;
 - Suchail S., Guez D., Belzunces L.P., (2001), Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 2482–2486;
 - Scorza R.P., Smelt J.H., Boesten J.J.T.I., Hendriks R.F.A., Van der Zee SEATM, (2004), Vadose zone processes and chemical transport: preferential flow of bromide, bentazon, and imidacloprid in a Dutch clay soil. *Journal of Environmental Quality*, 33, 1473–1486;
 - Sei, S., Rossetti, G., Villa, F., Ferrari, I., (1996). Zooplankton variability related to environmental changes in a eutrophic coastal lagoon in the Po Delta, *Hydrobiologia* 329, 45–55;
 - Sei, S., Invidia, M., Gorbi, G., (2006), Near anoxia and sulfide as possible factors influencing the spatial distribution of *Acartia tonsa* and *Acartia clausi*: Comparative evaluation of egg tolerance, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 337 (2):121-130;

- Sgolastra, F.; Medrzycki, P.; Bortolotti, L.; Maini, S.; Porrini, C.; Simon-Delso, N.; Bosch, J. Bees and pesticide regulation: Lessons from the neonicotinoid experience, (2020), *Biological Conservation*, 241, 108356;
- Thompson D.A., Lehmler H.J., Kolpin D.W., Hladik M.J., Vargo J.D., Schilling K.E., LeFevre G.H., Cwiertny D.M., Field R.W., (2020), A critical review on the potential impacts of neonicotinoid insecticide use: current knowledge of environmental fate, toxicity, and implications for human health. *Environmental Science Processes Impacts*, 2020, 22, 1315;
- Taniguchi T, Kita Y, Matsumoto T, Kimura K., (2012), Honeybee colony losses during 2008–2010 caused by pesticide application in Japan. *Japan Journal of Apiculture* 27, 15–27;
- Tennekes, H.A., (2010), *The Systemic Insecticides: A Disaster in the Making* ETS Nederland BV;
- Tennekes, H.A., (2010a), The significance of the Druckrey–Kupfmüller equation for risk assessment—the toxicity of neonicotinoid insecticides to arthropods is reinforced by exposure time, *Toxicology* 276, 1- 4;
- Tester, P., Turner, J.T., (1991), Why is *Acartia tonsa* restricted to estuarine habitats. *Proc. Fourth International Conference Copepoda. Bulletin of Plankton Society of Japan*, 603–611;
- M. Tomizawa and J.E. Casida, (2005), Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 247-268;
- Tomizawa, Motohiro; Casida, and John E, (2003), Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors. *Annual Review of Entomology*, 48 (1): 339–364;
- Turner J., (2004), The importance of small planktonic copepods and their roles in pelagic marine food web, *Zoological Studies*, 43, 255-266;
- UNEP Emerging issues, (2010), *Global honey bee colony disorders and other threats to insect pollinators*;

- University of Hertfordshire, (2018), Pesticide Properties DataBase acetamiprid;
- US Environmental Protection Agency, (1978), Bioassay Procedure for the Ocean Disposal Permit Programme. Environmental Research Lab., Gulf Breeze Florida;
- Uye, S.I., Fleminger, A., (1976), Effects of various environmental factors on egg development of several species of *Acartia* in southern California, Marine Biology, 38, 253–262;
- Van der Sluijs J.P., Amaral-Rogers V., Belzunces L.P., Bijleveld van Lexmond, M.F., Bonmatin J.M., Chagnon M., Downs C.A., Furlan L., Gibbons D.W., Giorio C., Girolami V., Goulson D., Kreutzweiser D.P. Krupke C., Liess M., Long E., McField M., Mineau P., Mitchell EA., Morrissey CA., Noome D.A., Pisa L. Settele J.; Simon-Delso N., Stark J.D., Tapparo A., Van Dyck H., van Praagh J., Whitehorn P.R., Wiemers M., (2015), Conclusions of the worldwide integrated assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning, Environmental Science and Pollution Research, 22, 148–154;
- V. Verebova, K. Zelonkova, B. Holeckova, J. Stanicova, (2019), The Effect of Neonicotinoid Insecticide Thiacloprid on the Structure and Stability of DNA;
- Whitehorn PR, O’Connor S, Wackers FL, Goulson D., (2012), Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production, Science 336, 351–352;
- Widmer H., Steinemann A. and Maiensch P., (1999), Chemical and physical properties of thiamethoxam (CGA 293 343), Book of Abstracts, 218th ACS National Meeting, New Orleans, AGRO-134;
- Zhang, J.; Ianora, A.; Wu, C.; Pellegrini, D.; Esposito, F.; Buttino, I., (2015), How to increase productivity of the copepod *Acartia tonsa* (Dana): effects of population density and food concentration, Aquaculture Research, 46, 2982–2990;

- Zhou C., Carotenuto Y., Vitiello V., Wu C., Zhang J., Buttino I. (2018) De novo transcriptome assembly and differential gene expression analysis of the calanoid copepod *Acartia tonsa* exposed to nickel nanoparticles. Chemosphere, 209, 163-172;

9) SITOGRAFIA

<https://ecotox.ipmcenters.org/>

10) ALLEGATI

ALLEGATI MATERIALI E METODI

Allegato 1 - Tab.2 – Composti per la preparazione della soluzione ipersalina al 10% e la rispettiva concentrazione (ISO, 2015).

Composti	Concentrazione (g/L)
NaCl	70.100
Na₂SO₄	11.700
KCl	2.030
KBr	0.293
Na₂B₄O₇, 10H₂O	0.113
MgCl₂, 6H₂O	31.700
CaCl₂, 6H₂O	6.600
SrCl₂, 6H₂O	0.066
NaHCO₃	2.83 (1.0 ml/L)

Allegato 2 - Tab.3 - Composti per la preparazione della soluzione "trace element stock", necessario per la e la rispettiva concentrazione (ISO, 2015).

Composti	Concentrazione (g/L)	Concentrazione (ml/L)
H₃BO₃	14.2975	1.00
MnCl₂, 4H₂O	1.8025	1.00
LiCl	1.53	1.00
RbCl	0.355	1.00
SrCl₂, 6H₂O	0.76	1.00
NaBr	0.08	1.00
Na₂MoO₄, 2H₂O	0.315	1.00
CuCl, 2H₂O	0.08375	1.00
ZnCl₂	0.26	1.00
CoCl₂, 6H₂O	0.2	1.00
KI	0.065	1.00
Na₂SeO₃	0.0438	1.00
NH₄VO₃	0.0115	1.00
Soluzione combinata con Fe-EDTA		
Na₂EDTA, 2H₂O	0.625	20.00
FeSO₄, 7H₂O	0.25	

Allegato 3 - Tab.4 - Composti per la preparazione finale del medium M7 di Elendt.

“Trace stock solution”		50 ml/L M7
Composti	Concentrazione (g/L)	Concentrazione (ml/L)
CaCl₂, 2H₂O	29.38	10.00
MgSO₄, 7H₂O	24.66	5.00
KCl	5.8	1.00
NaHCO₃	64.8	1.00
NaSiO₃, 9H₂O	10	1.00
NaNO₃	2.74	0.10
KH₂PO₄	1.43	0.10
K₂HPO₄	1.84	0.10
Vitamine combinate		
Tiamina cloridrata	0.75	0.10
Cianocobalammina	0.01	
Biotina	0.0075	

Allegato 4 - Tab.6 – Composti per la preparazione del medium F/2 di Guillard (Guillard, 1975)

Composto	Concentrazione nella soluzione madre	Volume da aggiungere	Concentrazione nel mezzo finale (Molarità)
NaNO₃	75 g/L	1 mL	8.83 x 10 ⁻⁴ M
NaH₂PO₄ H₂O	5 g/L	1 mL	3.63x10 ⁻⁵ M
NaSiO₃ 9H₂O	30 g/L	1 mL	1.07x10 ⁻⁴ M
Soluzione di metalli in traccia F/2	Vedi tabella 7 (Tab.7)	1 mL	
Soluzione con vitamine F/2	Vedi tabella 8 (Tab.8)	0.5 mL	

Allegato 5 - Tab.7 – Composti per la preparazione della soluzione di metalli in traccia per il medium F/2 di Guillard

Composto	Concentrazione (g/L)	Quantità pesata o volume da aggiungere allo stock	Concentrazione nel mezzo finale (Molarità)
FeCl₃ x 6H₂O		3.15 g	1 x 10 ⁻⁵ M
Na₂EDTA x 2H₂O		4.36 g	1x 10 ⁻⁵ M
CuSO₄ x 5H₂O	9.8 g/L	1 ml	4 x 10 ⁻⁸ M
Na₂MoO₄ x 2h₂O	6.3 g/L	1 ml	3 x 10 ⁻⁸ M
ZnSO₄	22.0 g/L	1 ml	8 x 10 ⁻⁸ M
CoCl₂ x 6H₂O	10 g/L	1 ml	5 x 10 ⁻⁸ M
MnCl₂x4H₂O	180 g/L	1 ml	9 x 10 ⁻⁷ M

Allegato 6 - Tab.8 – Composti per la preparazione della soluzione di vitamine per il medium F/2 di Guillard

Vitamine	soluzione madre
Vitamina B12	5 mg su 5mL di H ₂ O distillata
Biotina	1 mg su 10 mL di H ₂ O distillata
Tiamina cloridrata	

Allegato 7 - Tab.9 – Approccio fattoriale adottato per il test LDR

TRATTAMENTI	COLTURE A. TONSA	COLTURE A. TONSA	COLTURE A. TONSA
CONTROLLO	C-C _T	C-10 _T	C-100 _T
10 ng L⁻¹	10-C _T	10-10 _T	10-100 _T
100 ng L⁻¹	100-C _T	100-10 _T	100-100 _T

ALLEGATI ACETAMIPRID (ACE)

Allegato 8 - Dati grezzi egg production test utilizzando ACE. In tutti trattamenti, per ciascuna replica, sono inseriti i numeri corrispondenti alla media ottenuta coi valori relativi al giorno 14, 15 e 16 dall'avvio della coltura. Il valore "0.0" presente in alcune celle sottende l'assenza di produzione di uova per quella determinata replica.

ACE	CONTROLLO	10 ng L⁻¹	100 ng L⁻¹
R1	15,7	0.3	4.3
R2	0.0	7.0	6.3
R3	5.7	3.3	10.0
R4	4.0	1.7	3.7
R5	0.0	4.0	6.0
R6	6.0	4.0	0.3
R7	0.0	1.0	0.3
R8	0.0	0.0	9.7
R9	2.3	1.3	0.0
R10	0.0	5.3	3.3
R11	10.3	0.0	12.0
R12	16.3	0.7	9.7
R13	0.0	5.3	0.0
R14	0.0	0.3	5.7
R15	11.0	0.3	0.7
R16	19.3	3.7	10.3
R17	10.0	5.7	12.7
R18	8.0	10.0	4.3
R19	0.0	6.0	11.7
R20	9.0	0.0	0.0
media	9.8	3.5	6.5
errore standard	1.5	0.7	1.0

Allegato 9 - Dati ottenuti dal test ANOVA a una via su egg production con ACE.

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	278,836	2	139,418	8,561	0,000742
Within groups:	700,281	43	16,2856		
Total:	979,117	45			

*omega*²: 0,2474

Levene's test for homogeneity of variance, from means	p (same):	0,09264
Levene's test, from medians	p (same):	0,1101

Welch F test in the case of unequal variances: F=8,396, df=23,67, p=0,001755

Allegato 10 – Dati grezzi test cronico eseguito con ACE

ACE		Eggs (to)	Egg	Nauplia	Copepoditi	LDR	ELS-mort.	hatching
C-C	C1	48	5	14	15	0,52	0,33	0,90
	C2	68	8	15	18	0,55	0,45	0,88
	C3	75	20	18	19	0,51	0,33	0,73
	C4	56	5	23	25	0,52	0,06	0,91
	C5	38	7	10	14	0,58	0,23	0,82
	C6	58	17	15	14	0,48	0,29	0,71
C-10 ng L ⁻¹	R1	48	6	13	10	0,43	0,45	0,88
	R2	77	13	21	23	0,52	0,31	0,83
	R3	51	5	12	10	0,45	0,52	0,90
	R4							
	R5	71	20	12	17	0,59	0,43	0,72
	R6	58	14	17	9	0,35	0,41	0,76
C-100 ng L ⁻¹	R1	62	12	7	14	0,67	0,58	0,81
	R2	58	12	15	27	0,64	0,09	0,79
	R3	59	8	13	21	0,62	0,33	0,86
	R4	79	17	6	33	0,85	0,37	0,78
	R5	77	13	14	33	0,70	0,27	0,83
	R6	66	13	16	14	0,47	0,43	0,80
10-C	R1	42	19	7	10	0,59	0,26	0,55
	R2	68	27	7	16	0,70	0,44	0,60

	R3	49	25	12	8	0,40	0,17	0,49
	R4	48	11	11	18	0,62	0,22	0,77
	R5	36	15	5	10	0,67	0,29	0,58
	R6	58	24	8	12	0,60	0,41	0,59
10-10 ng L⁻¹	R1	68	31	9	12	0,57	0,43	0,54
	R2	80	35	20	14	0,41	0,24	0,56
	R3	66	20	23	10	0,30	0,28	0,70
	R4	76	29	8	10	0,56	0,62	0,62
	R5	48	10	8	9	0,53	0,55	0,79
	R6	72	25	26	7	0,21	0,30	0,65
10-100 ng L⁻¹	R1	60	27	21	12	0,36	0,00	0,55
	R2	80						
	R3	54	22	17	12	0,41	0,09	0,59
	R4	47	7	5	11	0,69	0,60	0,85
	R5	61	23	10	11	0,52	0,45	0,62
	R6	67	16	7	9	0,56	0,69	0,76
100-C	R1	63	21	7	3	0,30	0,76	0,67
	R2	79	49	14	1	0,07	0,50	0,38
	R3	51	22	7	1	0,13	0,72	0,57
	R4	61	41	14	3	0,18	0,15	0,33
	R5	62	22	6	2	0,25	0,80	0,65
	R6	69	25	16	0	0,00	0,64	0,64
100-10 ng L⁻¹	R1							
	R2							
	R3	63	28	10	3	0,23	0,63	0,56
	R4	62	29	15	1	0,06	0,52	0,53
	R5	62	29	10	3	0,23	0,61	0,53
	R6	66	36	13	3	0,19	0,47	0,45
100-100 ng L⁻¹ 1	R1	48	20	7	1	0,13	0,71	0,58
	R2	60	34	12	4	0,25	0,38	0,43
	R3	65	26	11	1	0,08	0,69	0,60
	R4	56	32	12	1	0,08	0,46	0,43
	R5	61	36	11	3	0,21	0,44	0,41
	R6	84	30	11	1	0,08	0,78	0,64

Allegato 11 – Valori ricavati tramite analisi statistiche dei dati ottenuti dal test LDR con ACE. In successione: Hatching, Early life stages mortality (ELS – m) e LDR

Hatching:

Unequal N HSD; variable H (Spreadsheet1) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,00936, df = 41,000				
Cell No.	Treatment	H Mean	1	2
8	100-100	0,516322	****	
7	100-10	0,518654	****	
6	100-C	0,537625	****	
4	10-C	0,596788	****	
9	10su10	0,644409	****	****
5	10-100	0,675560	****	****
3	C-100	0,813829	****	****
2	C-10	0,817012		****
1	C-C	0,824153		****

Univariate Tests of Significance for H (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	21,41535	1	21,41535	2288,320	0,000000
Treatment	0,74682	8	0,09335	9,975	0,000000
Error	0,38370	41	0,00936		

ELS – m:

Unequal N HSD; variable ELS-m (Spreadsheet1) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,03049, df = 41,000				
Cell No.	Treatment	ELS-m Mean	1	
1	C-C	0,280028	****	
4	10-C	0,296709	****	
3	C-100	0,345141	****	
5	10-100	0,365479	****	
9	10su10	0,404502	****	
2	C-10	0,425417	****	
7	100-10	0,554113	****	
8	100-100	0,577887	****	
6	100-C	0,595401	****	

Univariate Tests of Significance for ELS-m (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	8,958502	1	8,958502	293,7896	0,000000
Treatment	0,664367	8	0,083046	2,7234	0,016652
Error	1,250209	41	0,030493		

LDR:

Unequal N HSD; variable LDR (Spreadsheet1) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,01107, df = 41,000					
Cell No.	Treatment	LDR Mean	1	2	3
8	100-100	0,138813			****
6	100-C	0,153023			****
7	100-10	0,177885			****
9	10su10	0,430552	****		
2	C-10	0,468883	****	****	
5	10-100	0,510248	****	****	
1	C-C	0,527189	****	****	
4	10-C	0,595207	****	****	
3	C-100	0,657020		****	

Univariate Tests of Significance for LDR (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	8,113309	1	8,113309	732,7932	0,000000
Treatment	1,777152	8	0,222144	20,0640	0,000000
Error	0,453942	41	0,011072		

ALLEGATI THIACTOPRID (THI)

Allegato 12 - Dati grezzi egg production test utilizzando THI. In tutti trattamenti, per ciascuna replica, sono inseriti i numeri corrispondenti alla media ottenuta coi valori relativi al giorno 14 e 15 dall'avvio della coltura. Il valore "0.0" presente in alcune celle sottende l'assenza di produzione di uova per quella determinata replica.

THI	CONTROLLO	10 ng L⁻¹	100 ng L⁻¹
R1	1.7	2.0	2.3
R2	20.0	13.5	6.3
R3	9.3	3.5	1.0
R4	3.0	1.5	0.3
R5	19.7	3.0	8.5
R6	5.0	8.0	1.0
R7	0.3	3.5	0.0
R8	0.0	26.5	0.0
R9	0.0	1.5	0.0
R10	0.0	1.5	0.0
R11	0.0	2.7	0.0
R12	0.0	0.3	0.0
R13	0.0	3.7	0.0
media	8.4	5.5	3.3
errore standard	3.1	2.0	1.4

Allegato 13 - Dati ottenuti dal test ANOVA a una via su egg production con THI.

ANOVA					
EPD	Somma dei quadrati	gl	Media quadratica	F	Sign.
Tra gruppi	89,194	2	44,597	,937	,406
Entro i gruppi	1094,731	23	47,597		
Totale	1183,925	25			

Allegato 14 – Dati grezzi test cronico eseguito con ACE

THI		Eggs (t ₀)	Egg	Nauplia	Copepoditi	LDR	ELS-mort.	hatching
C-C	C1	90	27	35	28	0,44	0,00	0,70
	C2	51	14	10	3			
	C3	52	17	24	6	0,20	0,14	0,67
	C4	55	15	13	13	0,50	0,35	0,73
	C5	49	25	16	3			
	C6	69	24	18	5	0,22	0,49	0,65
10 ng L ⁻¹ -C	R1	59	7	22	7	0,24	0,44	0,88
	R2	55	15	25	1			
	R3	69	17	12	3			
	R4	49	16	19	9	0,32	0,15	0,67
	R5	55	25	20	5	0,20	0,17	0,55
	R6	92	16	29	10	0,26	0,49	0,83
100 ng L ⁻¹ -C	R1	50	15	15	3	0,17	0,49	0,70
	R2	63	30	20	8	0,29	0,15	0,52
	R3	64	20	14	10	0,42	0,45	0,69
	R4	69	22	15	1			
	R5	65	22	22	7	0,24	0,33	0,66
	R6	73	24	31	5	0,14	0,27	0,67
C-10	R1	48	35	6	0	0,00	0,54	0,27
	R2	32	29	1	0	0,00	0,67	0,09
	R3	55	48	4	0	0,00	0,43	0,13
	R4	46	40	3	0	0,00	0,50	0,13

	R5	57	33	4	0	0,00	0,83	0,42
	R6	48	43	4	1	0,20	0,00	0,10
10 ng L⁻¹- 10	R1	46	25	1	0	0,00	0,95	0,46
	R2	61	52	7	0	0,00	0,22	0,15
	R3	41	34	3	0	0,00	0,57	0,17
	R4	48	29	3	0	0,00	0,84	0,40
	R5	53	42	5	0	0,00	0,55	0,21
	R6	30	17	1	0	0,00	0,92	0,43
100 ng L⁻¹- 10	R1	52	42	4	0	0,00	0,60	0,19
	R2	44	18	0	0	0,00	1,00	0,59
	R3	51	47	4	0	0,00	0,00	0,08
	R4	42	33	4	1	0,20	0,44	0,21
	R5	32	23	2	0	0,00	0,78	0,28
	R6	19	12	1	0	0,00	0,86	0,37
C-100	R1	55	45	4	0	0,00	0,60	0,18
	R2	52	48	4	0	0,00	0,00	0,08
	R3	51	28	4	0	0,00	0,83	0,45
	R4	72	54	2	0	0,00	0,89	0,25
	R5	43	32	6	0	0,00	0,45	0,26
	R6	45	33	9	3	0,25	0,00	0,27
10 ng L⁻¹- 100	R1	66	38	4	0	0,00	0,86	0,42
	R2	40	36	2	0	0,00	0,50	0,10
	R3	47	38	8	0	0,00	0,11	0,19
	R4	44	35	7	0	0,00	0,22	0,20
	R5	29	3	0	0	0,00	1,00	0,90
	R6	78	55	5	0	0,00	0,78	0,29
100 ng L⁻¹ - 100	R1	50	35	8	0	0,00	0,47	0,30
	R2	41	36	1	0	0,00	0,80	0,12
	R3	85	31	9	1	0,10	0,81	0,64
	R4	42	27	7	0	0,00	0,53	0,36
	R5	33	18	6	1	0,14	0,53	0,45
	R6	38	27	4	4			

Allegato 15 – Valori ricavati tramite analisi statistiche dei dati ottenuti dal test LDR con THI. In successione: Hatching, Early life stages mortality (ELS – m) e LDR

Hatching:

Test di omogeneità delle varianze					
		Statistica di Levene	gl1	gl2	Sign.
H	Basato sulla media	1,599	8	39	,157
	Basato sulla mediana	,954	8	39	,485
	Basato sulla mediana e con il grado di libertà adattato	,954	8	16,094	,503
	Basato sulla media ritagliata	1,444	8	39	,210

ANOVA					
H					
	Somma dei quadrati	gl	Media quadratica	F	Sign.
Tra gruppi	1,634	8	,204	7,450	,000
Entro i gruppi	1,069	39	,027		
Totale	2,703	47			

ELS – m:

Test di omogeneità delle varianze					
		Statistica di Levene	gl1	gl2	Sign.
ELSm	Basato sulla media	1,345	8	39	,251
	Basato sulla mediana	1,203	8	39	,323
	Basato sulla mediana e con il grado di libertà adattato	1,203	8	27,637	,333
	Basato sulla media ritagliata	1,337	8	39	,255

ANOVA					
ELSm					
	Somma dei quadrati	gl	Media quadratica	F	Sign.
Tra gruppi	,928	8	,116	1,386	,233
Entro i gruppi	3,264	39	,084		
Totale	4,192	47			

LDR:

Test di omogeneità delle varianze					
		Statistica di Levene	gl1	gl2	Sign.
LDR	Basato sulla media	4,280	8	39	,001
	Basato sulla mediana	1,881	8	39	,091
	Basato sulla mediana e con il grado di libertà adattato	1,881	8	22,153	,115
	Basato sulla media ritagliata	3,532	8	39	,004

ANOVA					
LDR					
	Somma dei quadrati	gl	Media quadratica	F	Sign.
Tra gruppi	,645	8	,081	11,883	,000
Entro i gruppi	,265	39	,007		
Totale	,909	47			

ALLEGATI THIAMETOXHAM (TMX)

Allegato 16 - Dati grezzi egg production test utilizzando TMX. In tutti trattamenti, per ciascuna replica, sono inseriti i numeri corrispondenti alla media ottenuta coi valori relativi al giorno 21 e 22 dall'avvio della coltura. Il valore "0.0" presente in alcune celle sottende l'assenza di produzione di uova per quella determinata replica.

TMX	CONTROLLO	10 ng L⁻¹	100 ng L⁻¹
R1	4.0	11.0	10.0
R2	11.0	2.5	4.5
R3	9.0	4.0	6.5
R4	1.5	3.5	14.0
R5	7.0	6.0	15.5
R6	13.0	3.0	12.0
R7	10.0	12.5	4.5
R8	8.5	5.5	6.5
R9	15.0	11.5	8.5
R10	10.0	3.0	11.5
R11	1.0	12.5	4.5
R12	12.0	19.0	0.0
R13	7.0	4.0	0.0
R14	0.0	10.0	0.0
R15	0.0	3.0	0.0
media	8.4	7.4	8.9
errore standard	1.2	1.3	1.2

Allegato 17 - Dati ottenuti dal test ANOVA a una via su egg production con TMX.

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	15,4909	2	7,74545	0,3864	0,6823
Within groups:	721,586	36	20,0441		
Total:	737,077	38			

*omega*²: -0,03249

Levene's test for homogeneity of variance, from means *p* (same): 0,4404
 Levene's test, from medians *p* (same): 0,757

Welch F test in the case of unequal variances: *F*=0,3653, *df*=23,7, *p*=0,6978

Allegato 18 – Dati grezzi test cronico eseguito con TMX

		Eggs (t ₀)	Egg	Nauplia	Copepoditi	LDR	ELS-mort.	hatching
C-C	C1	44	2	28	14	0,33	0,00	0,95
	C2	61	2	20	18	0,47	0,36	0,97
	C3	60	2	35	18	0,34	0,09	0,97
	C4	69	4	27	22	0,45	0,25	0,94
	C5	62	4	29	27	0,48	0,03	0,94
	C6	103	10	34	21	0,38	0,41	0,90
10 ng L⁻¹-C	R1	54	4	33	16	0,33	0,02	0,93
	R2	51	4	30	11	0,27	0,13	0,92
	R3	78	3	42	21	0,33	0,16	0,96
	R4	54	0	26	28	0,52	0,00	1,00
	R5	48	4	24	16	0,40	0,09	0,92
	R6	57	3	26	16	0,38	0,22	0,95
100 ng L⁻¹-C	R1	52	3	23	20	0,47	0,12	0,94
	R2	70	0	27	43	0,61	0,00	1,00
	R3	52	5	9	24	0,73	0,30	0,90
	R4	50	0	21	28	0,57	0,02	1,00
	R5	75	5	39	26	0,40	0,07	0,93
	R6	56	6	15	35	0,70	0,00	0,89
C-10	R1	69	0	24	7	0,23	0,55	1,00
	R2	54	4	38	7	0,16	0,10	0,93

	R3	40	1	14	23	0,62	0,05	0,98
	R4	80	5	31	25	0,45	0,25	0,94
	R5	45	1	31	8	0,21	0,11	0,98
	R6	59	4	36	19	0,35	0,00	0,93
10 ng L⁻¹- 10	R1	57	2	25	20	0,44	0,18	0,96
	R2	69	8	35	14	0,29	0,20	0,88
	R3	79	5	24	21	0,47	0,39	0,94
	R4	50	2	28	6	0,18	0,29	0,96
	R5	66	2	20	15	0,43	0,45	0,97
	R6	53	2	20	30	0,60	0,02	0,96
100 ng L⁻¹- 10	R1	76	5	32	27	0,46	0,17	0,93
	R2	68	2	18	25	0,58	0,35	0,97
	R3	56						
	R4	63	4	12	47	0,80	0,00	0,94
	R5	77	3	27	37	0,58	0,14	0,96
	R6	56						
C-100	R1	62	0	16	19	0,54	0,44	1,00
	R2	74						
	R3	65	2	22	24	0,52	0,27	0,97
	R4	72	2	21	16	0,43	0,47	0,97
	R5	65	1	41	10	0,20	0,20	0,98
	R6	63	2	33	17	0,34	0,18	0,97
10 ng L⁻¹- 100	R1	70	2	19	37	0,66	0,18	0,97
	R2	61	0	26	25	0,49	0,16	1,00
	R3	71	3	24	32	0,57	0,18	0,96
	R4	57	1	12	20	0,63	0,43	0,98
	R5	82	6	39	14	0,26	0,30	0,93
	R6							
100 ng L⁻¹ - 100	R1	84	3	7	47	0,87	0,33	0,96
	R2	63	1	19	37	0,66	0,10	0,98
	R3	65	2	35	8	0,19	0,32	0,97
	R4	51	1	21	28	0,57	0,02	0,98
	R5	71	4	40	4	0,09	0,34	0,94
	R6	60	4	17	23	0,58	0,29	0,93

Allegato 19 – Valori ricavati tramite analisi statistiche dei dati ottenuti dal test LDR con TMX. In successione: Hatching, Early life stages mortality (ELS – m) e LDR

Hatching:

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	<i>p</i> (same)
Between groups:	0,00631533	8	0,000789417	0,8959	0,5288
Within groups:	0,0361267	41	0,000881138		
Total:	0,042442	49			

*omega*²: -0,01694

Levene's test for homogeneity of variance, from means *p* (same): 0,1906
 Levene's test, from medians *p* (same): 0,4282

Welch F test in the case of unequal variances: F=1,575, df=16,66, *p*=0,2061

ELS – m:

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	<i>p</i> (same)
Between groups:	0,242762	8	0,0303452	1,446	0,2073
Within groups:	0,86068	41	0,0209922		
Total:	1,10344	49			

*omega*²: 0,06654

Levene's test for homogeneity of variance, from means *p* (same): 0,5132
 Levene's test, from medians *p* (same): 0,8975

Welch F test in the case of unequal variances: F=1,752, df=16,39, *p*=0,1599

LDR:

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	<i>p</i> (same)
Between groups:	0,382441	8	0,0478052	1,814	0,1021
Within groups:	1,08022	41	0,0263467		
Total:	1,46266	49			

*omega*²: 0,1153

Levene's test for homogeneity of variance, from means *p* (same): 0,04111
 Levene's test, from medians *p* (same): 0,4138

Welch F test in the case of unequal variances: F=2,106, df=16,17, *p*=0,09679

*Ringrazio il professor M. Picone per avermi dato l'opportunità di fare questo lavoro,
i dott. G. Distefano, D. Marchetto e M. Russo per la guida e l'aiuto costante.*

*Dedico questo lavoro ai miei compagni di corso, per aver reso più bello il mio
percorso, ai miei amici, da sempre presenti e imprescindibili, e alla mia famiglia, per
il continuo sostegno dimostrato dall'inizio.*