

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E
NATURALI

Corso di laurea magistrale in BIOLOGIA MARINA

**Effetto di erbicidi su crescita
ed efficienza fotosintetica della
diatomea**

Skeletonema marinoi

Tesi di laurea in:
BOTANICA MARINA APPLICATA

Relatore:
Prof.ssa Rossella Pistocchi

Presentata da:
Maria Sole Paroni

Correlatore:
Dott.ssa Emanuela Fiori

(I sessione)

Anno accademico 2009/2010

*Al mio amico
Matti*

kis szerelmeknek
Reni

INDICE

1. CARATTERISTICHE DEGLI ERBICIDI MAGGIORMENTE USATI.....	11
1.1 Utilizzo di prodotti fitosanitari in Italia.....	11
1.1.1 Rilevamenti e censimenti sulla presenza di erbicidi.....	12
1.1.2 Principali erbicidi riscontrati nelle acque italiane.....	12
1.1.3 Regolamentazione sull'utilizzo di erbicidi in Italia.....	14
1.2 Piante infestanti.....	15
1.3 Classificazione e citotossicità degli erbicidi.....	16
1.4 Fattori che influenzano l'azione degli erbicidi.....	18
1.5 Evoluzione nell'uso degli erbicidi.....	18
1.6 Degradazione degli erbicidi.....	22
1.7 Fenomeni di resistenza.....	22
2. EFFETTO DEGLI ERBICIDI SULLE MICROALGHE.....	25
2.1 Metodi analitici di stress basati sulla fluorescenza della clorofilla.....	26
2.1.1 Rapporto dei valori di fluorescenza F684/F735.....	26
2.1.2 Fluorimetro PAM (Pulse Amplitude Modulation).....	27
2.2 Meccanismo d'azione degli erbicidi PSII-Target e principali effetti.....	29
2.2.1 Alterazione dell'attività fotosintetica.....	29
2.2.2 Inibizione della sintesi di ATP.....	33
2.2.3 Alterazioni bio-fisiologiche del fitoplancton.....	35
2.2.4 Alterazioni della struttura di comunità fitoplanctoniche esposte a erbicidi.....	37

3.	FATTORI CHE ALTERANO LA TOSSICITÀ E LA SENSIBILITÀ DELLE MICROALGHE.....	43
3.1	Influenza dei fattori ambientali.....	43
3.2	Risposte specifiche e utilizzo degli organismi fitoplanctonici come biomarcatori.....	44
3.3	Bioaccumulazione, degradazione e principali sistemi di difesa: trasformazione xenobiotica e alterazione della modalità trofica nel fitoplancton.....	45
4.	CARATTERISTICHE CHIMICHE DEGLI ERBICIDI TRIAZINICI E DEL METOLACHLOR.....	51
4.1	Erbicidi triazinici.....	51
	4.1.1. Struttura:	51
	4.1.2. Meccanismo d'azione:.....	51
	4.1.3. Resistenza all'erbicida:.....	52
	4.1.4. Principali Triazine:.....	52
4.2	Metolachlor.....	62
5.	MICROALGHE STUDIATE.....	67
	5.1 Il fitoplancton.....	68
	5.2. Skeletonema marinoi.....	69
6.	SCOPO DELLA TESI.....	73
7.	MATERIALI E METODI.....	77
7.1	Preparazione delle colture algali.....	77
	7.1.1. Preparazione del terreno di coltura.....	77
	7.1.2. Preparazione delle soluzioni degli erbicidi usati.....	77
7.2	Preparazione delle colture algali.....	81
	7.2.1. Conteggio:.....	81
	7.2.2. Curva di crescita:.....	82
	7.2.3. Biovolume e Carbonio.....	82
	7.2.4. Analisi della torbidità.....	83
	7.2.5. Analisi dell'attività fotosintetica.....	84

7.2.6. Misura del rendimento quantico della fotosintesi al buio e alla luce.....	84
7.2.7. Esecuzione delle curve di induzione.....	85
7.2.8. Analisi della clorofilla.....	88
8. RISULTATI.....	93
8.1 Effetto degli erbicidi sulla crescita di S. marinoi.....	93
8.1.1. Esposizione a Terbutilazina.....	93
8.1.2. Esposizione a Desetilterbutilazina.....	100
8.1.3. Esposizione a Metolachlor.....	102
8.1.4. Esposizione a Terbutilazina + Metolachlor.....	104
8.2. Effetto degli erbicidi sull'efficienza fotosintetica di S. marinoi.....	105
8.2.1. Esposizione a Terbutilazina.....	106
8.2.2. Esposizione a Desetilterbutilazina.....	117
8.2.3. Esposizione a Metolachlor.....	121
8.2.4. Esposizione a Metolachlor + Terbutilazina.....	125
8.3 Effetto della Terbutilazina sul contenuto intracellulare di Carbonio e Clorofilla.....	127
9. CONCLUSIONI.....	133
10. BIBLIOGRAFIA.....	137
<i>RINGRAZIAMENTI</i>.....	145

1. CARATTERISTICHE DEGLI ERBICIDI MAGGIORMENTE USATI

Gli erbicidi sono sostanze utilizzate per il controllo delle piante infestanti. I più comuni sono composti chimici di sintesi, spesso xenobiotici nei confronti degli esseri viventi.

Gli erbicidi devono possedere alta attività di controllo contro le infestanti, essere dalle stesse facilmente assorbiti, avere un basso costo di sintesi e non essere tossici per organismi non target. Le molecole sviluppate per questo scopo funzionano interagendo negativamente con i percorsi metabolici della sintesi aminoacidica e con il processo fotosintetico, bloccando la sintesi dei carotenoidi e dei lipidi, interferendo con la divisione cellulare o con altre vie metaboliche.

Le molecole ad attività erbicida possono avere uno spettro di azione tanto ampio da colpire tutte le piante, o essere selettive, cioè in grado di esercitare un effetto minimo sulla pianta coltivata e contestualmente controllare una larga frazione di erbe infestanti.

1.1 Utilizzo di prodotti fitosanitari in Italia

Ogni anno in Italia vengono impiegate circa 150.000 tonnellate di prodotti fitosanitari.

Indubbiamente le produzioni agricole ne traggono beneficio, ma l'uso di queste sostanze ha effetti negativi sull'uomo e sull'ambiente poiché la maggior parte di esse è costituita da molecole di sintesi concepite per combattere determinati organismi nocivi e per questo generalmente pericolose per tutti gli organismi viventi. Sono circa 400 le sostanze attive annualmente utilizzate in Italia, presenti con diverse formulazioni in alcune migliaia di prodotti commerciali (Adua et al. 2009).

1.1.1 Rilevamenti e censimenti sulla presenza di erbicidi

In Italia le maggiori problematiche di impatto ambientale direttamente associate all'agricoltura derivano dai fitofarmaci, dai composti azotati e dall'erosione superficiale e di massa del suolo.

Nel 1998 è iniziato un lavoro metodologico da parte del Servizio Agricoltura dell'ISTAT e dall'ANPA (oggi ISPRA) per la predisposizione di una scheda di rilevamento, denominata “Ambiente e Territorio”, all'interno di un'indagine campionaria su “Struttura e produzioni delle aziende agricole” (SPA).

Dal 2003 le SPA sono state realizzate con cadenza biennale.

Ogni anno viene svolta una rilevazione censuaria presso le imprese che distribuiscono fertilizzanti con il marchio proprio o con marchi esteri; vengono considerate le sostanze che forniscono elementi nutritivi alle piante (concimi minerali, concimi organici e concimi organo – minerali), quelle adatte a modificare e migliorare la struttura e le caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche del suolo (ammendanti e correttivi), i materiali di coltivazione di diversa natura rispetto al terreno agrario (substrati di coltivazione) e altri prodotti che agiscono sull'assorbimento degli elementi nutritivi o sulle anomalie di tipo fisiologico (prodotti ad azione specifica).

1.1.2 Principali erbicidi riscontrati nelle acque italiane

A seguito della coordinazione del piano nazionale di monitoraggio dei residui di prodotti fitosanitari nelle acque italiane da parte dell'APAT, è rinvenuto che gli erbicidi triazinici e alcuni prodotti della loro degradazione (metaboliti) sono fra le sostanze più frequentemente riscontrate sia nelle acque superficiali sia in quelle sotterranee, con concentrazioni spesso superiori al limite fissato per le acque potabili. In particolare è rilevante la contaminazione dovuta alla terbutilazina, una sostanza in fase di revisione a livello comunitario ed il cui uso in qualche Paese è stato vietato: la contaminazione è diffusa in tutta l'area padano-veneta ed evidenziata anche in alcune regioni del

centro-sud: è stata trovata nel 51,5% dei punti di campionamento delle acque superficiali (nel 29,2% dei casi oltre il limite) e nel 16,1% di quelli delle acque sotterranee (2,7% dei casi oltre il limite).

Ancora diffusa è la presenza di atrazina: nonostante il suo utilizzo sia stato vietato, si evidenzia il residuo di una contaminazione storica imputabile alla persistenza ambientale della sostanza.

Rilevante è la contaminazione da metolachlor, largamente riscontrata in tutta l'area padana: è presente nel 33,3% dei punti delle acque superficiali (19% dei casi oltre il limite).

Diffusa è la presenza dell'erbicida oxadiazon, e, nelle acque superficiali, del fungicida procimidone.

Da segnalare, inoltre, la contaminazione dovuta ad alcuni erbicidi utilizzati nelle risaie: particolarmente significativa quella del bentazone nelle acque sotterranee, con l'11% dei punti di campionamento in cui sono state rilevate concentrazioni superiori ai limiti delle acque potabili (Carniel, 2008).

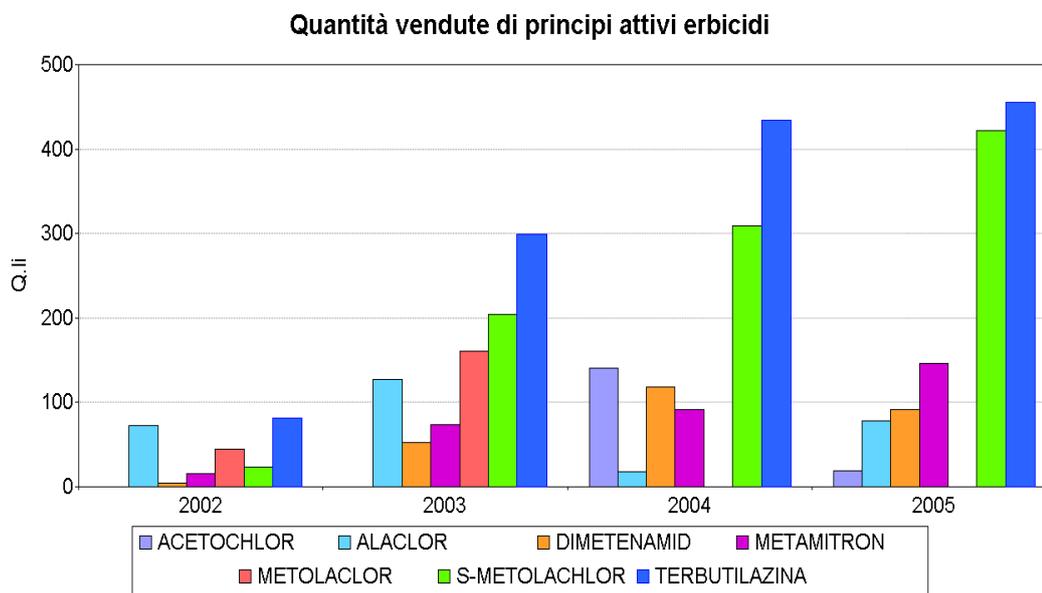


Fig 1.1: Esempio di erbicidi venduti nella regione del Friuli negli ultimi anni

1.1.3 Regolamentazione sull'utilizzo di erbicidi in Italia

Sono state poste delle normative per la regolamentazione dell'utilizzo di fertilizzanti e per la tutela delle acque (Adua et al. 2009):

- 1) Il Decreto Legislativo 29 aprile 2006, n. 217, abrogando la precedente Legge 748/84, regola la produzione e l'immissione in commercio dei fertilizzanti.
- 2) La Direttiva 91/676/CEE del Consiglio (Direttiva Nitrati), del 12 dicembre 1991, reca disposizioni per la protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole. Introduce misure specifiche per l'applicazione al terreno dei fertilizzanti azotati, con limiti per ettaro nella distribuzione degli effluenti di allevamento e nella concentrazione dei nitrati nelle acque. In particolare, limita l'applicazione di effluenti zootecnici a una quantità pari a 170 kg di N/ha/anno, mentre il limite massimo di concentrazione dei nitrati ammesso nelle acque è pari a 50 mg/l.
- 3) Di diretta emanazione è il decreto ministeriale MiPAAF 19 aprile 1999 "Codice di buona pratica agricola", che fornisce gli indirizzi per la corretta utilizzazione dei fertilizzanti azotati.
- 4) In riferimento alla problematica dell'inquinamento dei nitrati da origine agricola, il D.Lgs. 152/99 "Disposizioni sulla tutela delle acque da inquinamento", aggiornato con il D.Lgs. 3 aprile 2006, n. 152 recante "Norme in materia ambientale", prevede l'individuazione di aree vulnerabili ai nitrati, onde salvaguardare le acque superficiali e sotterranee dalla contaminazione.
- 5) Direttiva quadro sulle acque 2000/760/EC, che non introduce limiti di impiego ma ha come obiettivo il raggiungimento, entro l'anno 2015, di un "buono stato" delle acque interne e costiere.
- 6) Direttiva 2006/118/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, correlata alla precedente e che prende in considerazione la protezione delle acque sotterranee dall'inquinamento e dal deterioramento nonché la strategia tematica per la protezione del suolo (COM(2006)231).

1.2 Piante infestanti

Per piante infestanti ci riferiamo a tutte quelle erbe che in qualche modo alterano il rendimento della pianta coltivata:

- 1) pregiudicano l'aspetto estetico della coltura
- 2) determinano la diminuzione della luce
- 3) determinano la sottrazione di sostanze nutritive
- 4) determinano l'assorbimento dell'acqua nei periodi estivi
- 5) sono dotate di una rusticità superiore rendendola più resistente a condizioni avverse
- 6) presentano fiori che distolgono l'attenzione degli insetti pronubi (impollinatori) dalle colture diminuendone l'impollinatura.

In quasi tutti i terreni si trovano piante infestanti poiché si propagano con quasi tutti i metodi di riproduzione. Per evitare l'insorgere del problema è opportuno cercare di mantenere più pulito possibile il terreno da semi infestanti. I vettori di sementi più importanti sono:

- 1) il letame: se non maturo contiene grandi quantità di semi, che gli animali hanno mangiato, quindi bisogna utilizzare solo letame ben maturo.
- 2) le acque d'irrigazione: possono contenere oltre a sementi anche parti di rizomi e radici di erbe infestanti.

L'eliminazione delle piante infestanti si effettua:

- 1) meccanicamente: questo metodo, che è il più classico, consiste nella estirpazione dell'infestante con le mani, o con l'aiuto di sarchiatore.
- 2) con mezzi fisici: questa tecnica viene molto utilizzata per il diserbo di rive e fossi. Diserbare con l'aiuto del fuoco però non è sempre consentito dalla legge e si devono tenere ben presenti la vicinanza dalle colture e dal bosco.
- 3) chimicamente: questo tipo di lotta prevede l'utilizzo di diserbanti chimici o erbicidi. Per intervenire con questa tecnica è opportuno prima conoscere la selettività di prodotto ed i danni che provocano sia alla flora che alla fauna.

1.3 Classificazione e citotossicità degli erbicidi

Gli erbicidi possono essere classificati in base a (Maggiore et al. 2004):

1) **Chimica dei principi attivi**: esistono numerose famiglie chimiche di erbicidi la cui citotossicità è esplicita da diversi meccanismi d'azione, classificati in funzione dell'enzima o del passaggio biochimico che viene alterato dall'erbicida:

a) *Inibitori dell'Acetil-coenzima A carbossilasi (ACCasi)*, enzima attivo nella produzione dei lipidi di membrana, agiscono sul sistema meristemato.

b) *Inibitori dell'enzima acetato-lattasi sintasi (ALS)*, responsabile della produzione di aminoacidi quali valina, leucina e isoleucina, agiscono sul sistema meristemato.

c) *Inibitori degli enzimi per la biosintesi di composti aromatici*, attivi nella produzione degli aminoacidi triptofano, fenilalanina, tirosina, agiscono sull'intera pianta.

d) *Inibitori del Fotosistema II*: La grande maggioranza degli erbicidi oggi in uso (triazine, feniluree, fenoli) agiscono sul trasporto elettronico nel PSII riducendo il flusso di elettroni dall'acqua al NADPH durante la fotosintesi legandosi selettivamente al sito riducente del complesso PSII, il centro di reazione proteico D1, dove si sostituiscono all'accettore secondario di elettroni QB, favorendo l'accumulo di elettroni sulla clorofilla producendo reazioni di ossidazione che danneggiano la pianta. Questa classe di erbicidi può essere convenientemente determinata usando speciali sistemi analitici, chiamati biosensori fotosintetici, grazie alle proprietà caratteristiche del PSII.

e) *Auxine sintetiche*, interferiscono sui naturali regolatori della crescita della pianta.

2) **Specie vegetali obiettivo (selettività)**: si usa distinguere il gruppo botanico delle dicotiledoni (a foglia larga) da quello delle monocotiledoni (a foglia stretta), per le quali esistono erbicidi in grado di colpire le une risparmiando le altre, che assorbono il principio

attivo ma lo detossificano. Alcuni principi attivi colpiscono indistintamente mono e dicotiledoni.

3) **Epoca d'intervento**: può esplicarsi sull'organo a diretto contatto con l'erbicida o sui diversi organi, grazie alla capacità che certi composti hanno di traslocarsi con il flusso xilematico e/o floematico. In base alla loro azione fitotossica, gli erbicidi possono essere classificati in composti:

a) *antigerminello*, ad azione residuale, impediscono al seme di germinare, eliminano le infestanti al primissimo stadio di sviluppo. Possono coprire periodi molto più lunghi, garantendo una parziale pulizia del terreno.

b) di *pre-emergenza*, sono trattamenti in presemina che vengono effettuati prima che la coltura sia messa a dimora o seminata. Vengono usati prima della semina su un prato per pulirlo dalle piante infestanti ed evitare in seguito dei diserbi selettivi. Tendono ad essere tutti composti residuali, caratteristica svantaggiosa per l'ambiente.

c) di *post-emergenza*, che eliminano l'infestante già sviluppata. Sono utili per il diserbo delle infestanti annuali.

d) di *contatto*: eliminano la parte che è stata colpita dal prodotto, lasciando inalterato l'apparato radicale.

e) *traslocati o sistemici*: colpiscono l'infestante allo stadio di plantula annullandone di fatto lo sviluppo prima che possa competere con la specie coltivata. Il principio attivo entra in circolo alla pianta ed elimina anche l'apparato radicale. Agisce prevalentemente sul meristema della pianta, impedendo la fotosintesi e la riproduzione delle cellule. Si tratta di un sistema più lento ma garantisce una buona riuscita anche sulle piante perenni con un apparato rizomatoso.

1.4 Fattori che influenzano l'azione degli erbicidi

1) **Temperatura:** le temperature influiscono molto sul lavoro dei diserbanti. Qualche prodotto sistemico per agire ha bisogno di temperature non inferiore a 8°. E' anche vero, peraltro, che con temperature superiori, tra i 25° ed i 28°, la pianta diminuisce le funzioni fisiologiche con una diminuzione dell'efficacia dei diserbanti. Una temperatura troppo elevata, inoltre, diminuisce il tempo d'evaporazione del prodotto, provocando uno scarso rendimento dello stesso.

2) **Pioggia:** solitamente, dopo il trattamento, non dovrebbe piovere per un giorno, per permettere al principio attivo di entrare nella foglia. Viceversa, un'azione positiva viene fatta dalla pioggia nel caso di trattamenti a terra, aumentando l'efficacia del trattamento.

3) **Luce:** questo fattore agisce molto positivamente per quanto riguarda i diserbanti sistemici, aumentando la fotosintesi (entra in circolo più facilmente il principio attivo del prodotto sistemico).

1.5 Evoluzione nell'uso degli erbicidi

L'evoluzione degli erbicidi è partita nel primo dopoguerra da sostanze chimiche ad azione diserbante grossolana (ad es. sali d'arsenico, acido perclorico, clorato di sodio e acido solforico), il cui impiego non si è mai diffuso.

Uno dei primi erbicidi di sintesi fu nel 1941 in Inghilterra, l'acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D), da allora negli anni si sono prodotte molecole sempre più selettive ed efficaci in seguito all'insorgere di fenomeni indesiderati di inquinamento e di selezione di una flora infestante resistente.

Tra i più noti erbicidi utilizzati in passato vi è un prodotto come l'acido 2,4,5-Triclorofenossiacetico, di per sé non molto tossico, ma che durante il suo processo di produzione porta alla sintesi di intermedi molto pericolosi per la salute come le diossine [2,3,7,8-

tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD)], in grado di contaminare anche il prodotto finale.

L'*Agente Orange* fu invece una potente miscela di erbicidi ad effetto defoliante, impiegato dall'esercito degli Stati Uniti durante la guerra in Viet Nam (2,4,5-T, 2,4-D, picloram) con effetti tossici causati probabilmente dalla contaminazione da diossine.

La ricerca oggi mira alla sintesi di nuovi composti più rispettosi dell'ambiente; studiando nuove formulazioni e coadiuvanti, sperimentando bioerbicidi (come ad esempio l'aceto di vino o alcuni funghi parassiti delle malerbe) e prevenendo il più possibile l'uso o a sostituirli con pratiche alternative come il pirodiserbo.

Attualmente in Europa vengono prodotti quasi un migliaio di principi attivi, anche se quelli comunemente utilizzati sono solo una minima parte.

Circa il 40% dei pesticidi prodotti nel mondo viene impiegato nel Nord America, il 25% in Europa occidentale ed il resto in altri continenti. In Italia viene utilizzato circa il 2-3% della produzione mondiale.

Tra gli erbicidi più utilizzati oggi nel mondo ci sono:

- 1) *Glifosati*, non selettivi, utilizzati in colture resistenti modificate geneticamente per resistere ai suoi effetti, sono inibitori degli enzimi per la biosintesi degli aminoacidi aromatici. Il target molecolare del glifosato è l'enzima 5-enolpiruvilscichimato-3-P-sintetasi (EPSPS) coinvolto nella sintesi degli aminoacidi che contengono un anello benzene (triptofano, tirosina e fenilalanina). L'erbicida interferisce con il sito dell'EPSPS dove si lega il suo substrato naturale, il fosfoenolpiruvato. Poiché tutte le piante usano la stessa via metabolica per produrre gli aminoacidi aromatici, la molecola ha uno spettro molto ampio. Il glifosato non è metabolizzato facilmente dalla pianta ed è immobilizzato dal terreno dove viene poi attaccato rapidamente dai microrganismi. Poiché gli animali si procurano gli aminoacidi aromatici con vie metaboliche alternative a quella che coinvolge EPSPS, il glifosato ha una bassa tossicità per gli uomini e gli animali

di interesse agrario. Piante che resistono naturalmente al glifosato sintetizzano quantità più elevate di EPSPS34 o hanno una EPSPS con un sito di legame per il glifosato mutato²⁶.

2) *Fosfinotricina*: è un secondo erbicida a largo spettro che ha una formula chimica strutturalmente simile a quella della glutammina. E' un inibitore della glutammina sintasi (GS), un enzima che detossifica la pianta dall'ammoniaca fissandola con formazione di glutammato. L'erbicida ha una tossicità molto bassa verso i mammiferi e un ridotto grado di inquinamento perché facilmente assorbito dai colloidi del terreno e quindi poco dilavabile. Il recente interesse verso i due erbicidi a largo spettro appena citati dipende dalla dimostrata possibilità di ingegnerizzare piante agrarie resistenti, e quindi di usarli con le stesse modalità seguite per gli erbicidi selettivi.

3) Erbicidi importanti come le *sulfoniluree*, gli *imidazolinoni* e le *triazolopirimidine* sono caratteristici per la loro capacità di inibire l'enzima aceto-lattato sintasi (ALS), il primo enzima nel cammino metabolico che conduce alla sintesi di valina, isoleucina e leucina.

4) Molecole che inibiscono l'enzima Acetil-CoA carbossilasi (ACCase) hanno una dimostrata attività erbicida (*arylxyfenossipropionato*; *cicloesanedione*). Questi composti sono letali per molte graminacee ma non, in generale, per le dicotiledoni.

5) Gli inibitori del fotosistema II della fotosintesi (*triazine*, *triazinoni*, *uracili*) alterano il trasporto fotosintetico degli elettroni. Queste molecole si legano al sito per il QB nella subunità D1 del complesso proteico del foto sistema II.

6) *2,4-Dimetolachlor* appartenente al gruppo dei fenossiacidi è attualmente il più usato nel mondo. Impiegato nelle colture di cereali miscelato con altri erbicidi, non selettivo, agisce come auxina sintetica.

7) *Imazapyr*, non selettivo, usato per il controllo di una vasta gamma di infestanti

8) *Imazapic*, selettivo, usato in pre- e post-emergenza, agisce inibendo la produzione di alcuni aminoacidi ramificati necessari per la crescita della pianta.

9) *Clopyradil*, *Picoram* (della famiglia delle piridine) e *Dicamba* agiscono su infestanti a foglia larga, sono delle auxine sintetiche.

10) *Metolachlor*, utilizzato in pre-emergenza nelle colture di sorgo e cereali in sostituzione dell'atrazina;

11) *Paraquat*, erbicida molto tossico impiegato per la distruzione delle piantagioni di marijuana e coca (Maggiore et al. 2004).

1.6 Degradazione degli erbicidi

Alcuni dei composti citati hanno una struttura tale da poter essere degradati più o meno velocemente. In relazione alla loro recalcitranza alla degradazione e alla loro dinamica nell'ecosistema si può andare incontro a fenomeni di accumulo negli esseri viventi (fenomeno detto Biomagnificazione), o a deriva ambientale per volatilizzazione, dilavamento, percolamento (Navarro et al. 2004).

La persistenza di terbutilazina e altri erbicidi è stata studiata in mare, fiumi e acque sotterranee durante prolungate incubazioni in laboratorio sotto diverse condizioni (luce-buio). Da questi studi è stato provato che la luce ha un leggero effetto sul calo di erbicidi nelle acque di fiume, ma un calo più consistente nelle acque di mare e nelle acque sotterranee. Questa perdita sembra sia inversamente proporzionale alla concentrazione di materia organica disciolta. In generale, l'ordine di degradazione era simile nei mari e nelle acque di fiume: la simazina ad esempio è l'erbicida che si degrada più velocemente mentre la terbutilazina sembra sia il più persistente. Nelle acque sotterranee invece, la terbutilazina mostra sempre una forte persistenza, mentre la prometrina sembra sia quello che presenta il maggior tasso di degradazione (Navarro et al. 2004).

1.7 Fenomeni di resistenza

La resistenza agli erbicidi è studiata e volontariamente indotta in specie coltivate ai fini della produzione di piante geneticamente modificate (OGM), che resistano a diserbanti totali (come il gliato) e consentano quindi l'impiego di questi anche sulla coltura in atto (Maggiore et al., 2004).

2. EFFETTO DEGLI ERBICIDI SULLE MICROALGHE

Le microalghe solitamente non rappresentano le specie target degli erbicidi, tuttavia questi composti esercitano il loro effetto a livello della fotosintesi o di vie biosintetiche peculiari dei vegetali, per cui possono influenzare la crescita e fisiologia anche di questi organismi. Alcuni metodi analitici, basati su proprietà della clorofilla o sulla specificità della fotosintesi, sono maggiormente impiegati per valutare le risposte delle microalghe alla presenza degli erbicidi.

2.1 Metodi analitici di stress basati sulla fluorescenza della clorofilla

2.1.1 Rapporto dei valori di fluorescenza F684/F735

Lo stress dell'apparato fotosintetico può essere misurato, grazie a specifici fluorometri, attraverso lo studio del rapporto tra la fluorescenza emessa dalle molecole di clorofilla a 684 e a 735 nm, rispettivamente dal PSII e dal PSI ed è una misura dello stato di salute delle alghe. Le alghe presentano fluorescenza emessa dalla clorofilla con massimi valori a 684 e 735 nm, correlati al contenuto di clorofilla totale della sospensione algale. Il rapporto tra questi due valori massimi (F684/F735) può essere utilizzato come indicatore di stress dell'apparato fotosintetico, rappresentando un valido e semplice metodo per uno studio in vivo dello stato di salute delle alghe.

La determinazione di questo rapporto rileva la presenza di erbicidi che hanno come principale effetto la diminuzione dell'attività fotosintetica: l'aumento del valore di questo rapporto è correlato all'aumentare della concentrazione di erbicidi e a un declino dell'attività fotosintetica. Numerosi erbicidi che influenzano il trasporto degli elettroni nel PSII sono stati testati, manifestando una influenza di diversa entità su questo processo.

Nello studio condotto da Eullaffroy et al. (2001) le molecole di clorofilla rappresentano una prova intrinseca della capacità fotosintetica degli organismi. Sotto condizioni ottimali, la maggior parte della luce assorbita dalla clorofilla è utilizzata per la conversione chimica, con una piccola percentuale emessa sotto forma di calore e fluorescenza. La capacità fotosintetica può essere ridotta da condizioni di stress, risultante in un aumento dell'emissione di calore e fluorescenza, quindi lo stato di salute di un organismo fotosintetico può essere misurato dalla fluorescenza della clorofilla a.

Questo studio ha rilevato che lo spettro di emissione della fluorescenza di *Scenedesmus obliquus* ha mostrato un valore massimo vicino a 684 nm e un valore più debole nell'infrarosso vicino a 735

nm. L'entità di questi due valori dipendeva unicamente dalla quantità di clorofilla e basandosi sul rapporto tra questi due valori di fluorescenza emessa (F684/F735) è stato stimato il contenuto di clorofilla nella soluzione algale. A basse concentrazioni di clorofilla a e b (<4 µg/mL) l'intensità della fluorescenza emessa nel rosso è relativamente bassa e spostata verso lunghezze d'onda inferiori; graficamente i due picchi di massima fluorescenza emessa risultano più separati. All'aumentare del contenuto di clorofilla (>5 µg /mL) le fluorescenze sono emesse a valori di lunghezza d'onda via via superiori, dovuto al riassorbimento della fluorescenza emessa dalla clorofilla.

2.1.2 Fluorimetro PAM (Pulse Amplitude Modulation)

L'energia luminosa assorbita dalle molecole di clorofilla può andare incontro a 3 destini: 1) essere usata per la fotosintesi, quindi essere usata come energia fotochimica, 2) essere dissipata come energia in eccesso sotto forma di calore o 3) essere riemessa dalla clorofilla *a* come fluorescenza. Questi 3 processi sono in competizione tra loro, quindi un aumento dell'efficienza di uno risulterà in una diminuzione del rendimento (Yield) degli altri due.

La fluorescenza della clorofilla dissipata può essere un mezzo per studiare le proprietà funzionali dell'apparato fotosintetico. Misurando il rendimento della fluorescenza della clorofilla si possono ottenere, indirettamente, informazioni sui cambiamenti dell'efficienza della fotochimica e della dissipazione del calore (Krause e Weis, 1991).

Il rendimento della fluorescenza delle cellule algali può essere misurato attraverso uno specifico strumento chiamato PAM (ad ampiezza di impulsi modulata), un fluorimetro che emette la luce necessaria per misurare la fluorescenza in maniera modulata (accesa e spenta ad elevata frequenza) e che misura attraverso un detector la fluorescenza stimolata dalla luce precedentemente emessa.

Il principio della misura della fluorescenza si basa sull'osservazione fatta da Kautsky nel 1930 che le alghe, in seguito a una leggera

illuminazione, mostrano un aumento di fluorescenza da zero ad un livello basso costante chiamato F_0 . Se l'illuminazione è abbastanza forte la fluorescenza aumenta da F_0 ad un livello massimo, chiamato F_m . La differenza tra F_m e F_0 è rappresentata dalla fluorescenza variabile F_v .

La determinazione del livello costante di fluorescenza (F_0) e la massima fluorescenza (F_m) in un campione adattato al buio permettono di stimare la fluorescenza variabile (F_v) e il **rendimento quantico massimo** (ϕ_M), che è calcolato come (Bolhàr – Nordenkampf et al. 1989):

$$\phi_M = (F_m - F_0) / F_m$$

Nel campione esposto alla luce e che raggiunge lo stato stazionario del trasporto degli elettroni, si può ottenere il **rendimento quantico operativo** (ϕ_M') ottenuto dal rapporto (Genty et al., 1989):

$$\phi_M' = (F_m' - F) / F_m'$$

Il valore di quenching fotochimico (Q_p), che mostra la proporzione di energia di eccitazione luminosa convertita in energia fotochimica è stimata come:

$$Q_p = (F_m' - F) / (F_m' - F_0')$$

Il quenching non fotochimico (Q_n), che rappresenta tutti i processi di quenching della fluorescenza emessa dalla clorofilla del PSII non direttamente correlata alla fotochimica, è calcolato dal rapporto (Schreiber et al., 1986):

$$Q_N = 1 - [(F'_m - F'_o)/(F_m - F_o)]$$

Il rapporto Fv/Fm è stato usato come strumento per ottenere rapidamente informazioni riguardo l'attività fisiologica del PSII nelle cellule fitoplanctoniche. In uno studio sull'inquinamento delle acque, Fv/Fm è stato utilizzato per studiare il comportamento tossico degli erbicidi (Haynes et al. 2000) sull'apparato fotosintetico delle cellule vegetali. Per gli erbicidi che hanno come target il PSII, numerosi studi hanno dimostrato che i valori più bassi di EC₅₀ sono solitamente ottenuti quando il rapporto Fv/Fm è considerato come parametro di risposta, in contrasto con i valori di EC₅₀ ottenuti attraverso la crescita algale, confermando la grande sensibilità del rapporto Fv/Fm nel determinare gli effetti di tossicità sulle alghe.

2.2 Meccanismo d'azione degli erbicidi PSII-Target e principali effetti

Diversi erbicidi agiscono come inibitori della fotosintesi bloccando il flusso di trasporto degli elettroni nel PSII, a livello del chinone B (PQB) che non viene ridotto dall'elettrone che giunge dal PQA, facendo così diminuire il flusso di elettroni dall'acqua all'NADP attraverso i trasportatori del PSII (Mine et al. 1975). Il blocco del PSII porta a effetti secondari nel percorso metabolico, come la produzione di stati di singoletto e di tripletto della clorofilla (1Cl_a* e 3Cl_a*), e di radicali superossidi (1 O₂) (Schödel et al. 1999). Questi composti energizzati promuovono il danno ossidativo nelle proteine dei cloroplasti e sulle membrane delle cellule fotosintetiche (Demmig et al., 1987; Porra et al., 1997).

2.2.1 Alterazione dell'attività fotosintetica

Numerosi sono stati gli studi condotti per misurare la tossicità di diversi erbicidi PSII-target su numerose specie microalgali; la tossicità

si manifesta in maniera specie-specifica, e varia da erbicida a erbicida manifestando comuni risposte fisiologiche con diversa severità come conseguenza dell'alterazione dell'attività fotosintetica. La misura del rendimento quantico come misura indiretta dell'attività fotosintetica è un valido strumento per predire l'inibizione del tasso di crescita e l'aumento di biomassa.

Magnusson et al. (2008) hanno condotto uno studio sugli effetti di tre erbicidi inibitori del PSII: diurone, hexazinone e atrazina, i più utilizzati in agricoltura in Australia, su due microalghe bentoniche: *Navicula* sp. (Eterokontofita) e *Nephroselmis piriformis* (Clorofita) attraverso l'utilizzo del fluorimetro PAM. L'ordine di tossicità, misurato in EC₅₀, è diurone (16-33 nM) > hexazinone (25-110 nM) > atrazina (130-620 nM) per entrambe le specie algali. Il tasso di crescita e la fotosintesi erano influenzate già a concentrazioni ambientali di diurone riscontrate nelle zone costiere del Great Barrier Reef. Questi erbicidi hanno mostrato un'influenza negativa anche verso gli organismi tropicali come le fanerogame (Haynes et al. 2000a) e le dinoflagellate simbiotici nei coralli (Jones e Kerswell, 2003).

De Lorenzo et al. (1998) hanno effettuato studi sugli effetti dell'atrazina e del suo metabolita più tossico, la deetilatrazina, leggermente meno tossico dell'atrazina. La deetilatrazina è il prodotto di trasformazione maggiormente riscontrato negli ecosistemi acquatici. Ha una minore K_d (1.02) e K_{oc} (36.1) rispetto all'atrazina (2.46 e 87.0 rispettivamente) e quindi è più prontamente trasportato nella fase acquosa. È stato stimato che la vita media della deetilatrazina sulla superficie dell'acqua è circa 42 – 67 giorni (Thurman et al., 1994).

Nello studio citato sono state saggiate 2 concentrazioni per ogni pesticida. La bassa concentrazione rispecchia quella che si potrebbe trovare nell'ambiente, mentre quella più alta, di un ordine di grandezza maggiore, ha lo scopo di rilevare gli effetti sulla struttura e funzione della catena alimentare microbica.

Sia l'atrazina che la deetilatrazina hanno effetti significativi sui componenti fototrofici della catena alimentare degli ambienti estuarini inibendo l'attività fotosintetica attraverso il blocco del trasporto degli elettroni nella reazione di Hill nel PSII.

Gli effetti dell'atrazina e del suo metabolita risultano molto simili. La componente fototrofica della comunità microbica è fortemente inibita dopo 24 ore di esposizione sia all'atrazina che alla deetilatrazina. Nei trattamenti con atrazina, la clorofilla a e l'assimilazione fototrofica del carbonio risultano fortemente ridotte rispetto ai controlli ad entrambe le concentrazioni di erbicida: la concentrazione di clorofilla a è ridotta di circa il 50 % a 50 µg/L e circa 85% a 250 µg/L, mentre nei trattamenti con deetilatrazina l'assimilazione fototrofica del carbonio e il biovolume diminuiscono dopo 8 ore di esposizione al trattamento a 250 µg/L; dopo 16 ore, la clorofilla a e l'assimilazione fototrofica del carbonio sono significativamente inibite sia a 50 µg/L che a 250 µg/L.

L'inibizione della fotosintesi può portare conseguenze a lungo termine e ad ampio raggio, a cominciare dalla diminuzione dell'ossigeno disciolto, ai cicli di pH, agli effetti sulla rete alimentare microbica avendo così effetti indiretti che influenzano gli organismi dei livelli trofici superiori.

Un altro potente inibitore del PSII con elevati effetti tossici sulle alghe e sulle comunità delle popolazioni fitoplanctoniche è l'Irgarol 1051, studiato da Zamora-Ley et al. (2006) in diversi siti del Key Largo Harbor in Florida. Irgarol 1051 (2-metiltilio-4-terbutilamino-6-ciclopropilamino-s-triazine) è un algicida triazinico usato nelle vernici per impedire la formazione di depositi di cianobatteri. In Europa, le coste britanniche e del Mediterraneo sono quelle in cui è stata riscontrata la maggior concentrazione di Irgarol. Irgarol inibisce il trasporto degli elettroni a livello del PSII legandosi alla proteina D1 (Ranke e Jastorff, 2000), ma è stato rilevato il completo recupero dell'attività fotosintetica subito dopo la sua rimozione. Come altri erbicidi, inibisce il PSII e riduce la crescita e la produttività di specie

fitoplanctoniche sensibili ad esso come la diatomea *Navicula pelliculosa* già a concentrazioni molto basse, come 136 ng/L, e già concentrazioni ambientali di 126 ng/L fanno inibire la crescita e l'attività fotosintetica (Nyström et al. 2001). Nel Key Largo Harbor Marina è stata riscontrata una contaminazione di Irgarol fino a 182 ng/L (KLH, Gardinali et al. 2004), trattandosi di un ecosistema chiuso con poco ricircolo dell'acqua, formato da numerosi canali che fungono da porto per numerose imbarcazioni. Durante il periodo di studio, le concentrazioni di Irgarol variavano da 7 a 635 ng/l, le più alte a febbraio e le più basse in aprile, ed anche secondo un gradiente che diminuiva dalle zone più interne alla foce della marina.

Altri studi sull'impatto di Irgarol 1051 sono stati condotti da Buma et al. (2008) su diverse specie di fitoplancton marino: *Thalassiosira weissflogii*, *Emiliana huxleyi*, *Tetraselmis* sp. e *Fibrocapsa japonica*, esponendo il fitoplancton alla presenza di Irgarol 1051 a 6 diverse concentrazioni per 72 ore. Per determinare l'entità dell'impatto sono state effettuate analisi tramite citometria a flusso come misura della crescita e del rendimento del PSII attraverso il fluorimetro PAM sulle 4 diverse specie. Le 4 specie hanno mostrato risposte simili: in tutte c'è stata una diminuzione nel rendimento quantico effettivo, già 2 ore dopo l'esposizione; anche per il tasso di crescita c'è stata una diminuzione all'aumentare delle concentrazioni di Irgarol.

Studi più recenti hanno dimostrato che la concentrazione di 0.79 nM di Irgarol non ha effetti misurabili sulle alghe, ad eccezione di *E. huxleyi* sulla quale ha una leggera influenza. Attraverso l'analisi al PAM del rendimento quantico è stato rilevato che *F. japonica* è la specie più sensibile a Irgarol, seguita da *Tetraselmis* sp., *T. weissflogii* e *E. huxleyi*, con valori medi di EC50 rispettivamente di 0.43, 0.91, 1.29 e 2.38 nM. Attraverso l'analisi del tasso di crescita i valori di EC50 danno indicano una diversa sensibilità, nell'ordine: *Tetraselmis* sp., *T. weissflogii*, *E. huxleyi* e *F. japonica* (rispettivamente 0.46, 1.20, 1.60, 2.44 nM).

Il bentazone è un altro erbicida PSII-target comunemente usato come erbicida post emergenza nelle coltivazioni di grano in tutto il mondo, e agisce anch'esso come inibitore della fotosintesi. Effetti secondari sono l'inibizione della sintesi di RNA, proteine e lipidi (Al-Mendoufi et al. 1984).

Gli effetti tossici del bentazone sono stati esaminati da Macedo et al. (2007) sulla diatomea *Skeletonema costatum*. Colture di questa microalga sono state esposte a differenti concentrazioni di erbicida e sono state determinati gli effetti di questo sulla crescita algale e sulla fluorescenza emessa attraverso l'analisi del rapporto Fv/Fm, il massimo rendimento quantico. Si è visto che già a basse concentrazioni di bentazone, il rapporto Fv/Fm diminuisce, mentre gli effetti sulla crescita algale si riscontrano dopo 24 ore di esposizione all'erbicida. I valori di LOEC e di EC50 determinati attraverso l'analisi di Fv/Fm sono più bassi di quelli ottenuti dall'analisi della crescita, confermando che la fluorescenza è un parametro più sensibile della crescita algale per monitorare gli effetti tossici degli erbicidi e dimostrando quindi applicabilità dell'analisi di Fv/Fm per individuare la tossicità precoce degli erbicidi inibitori del PSII, prima che cambiamenti significativi si verificano sulla concentrazione delle cellule algali. All'aumentare della concentrazione di bentazone si riscontra una progressiva riduzione del rapporto Fv/Fm. La tossicità stimata attraverso Fv/Fm diminuisce lentamente all'aumentare del tempo di esposizione in tutti i trattamenti; la riduzione del Fv/Fm all'aumentare del tempo di esposizione può essere associato a fotodegradazione del bentazone (Huber and Otto 1994). Questi studi hanno dimostrato che una concentrazione di 11.25 mg/L di bentazone inibisce approssimativamente il 50% del Fv/Fm, concentrazione alla quale invece la crescita algale non è influenzata.

2.2.2 Inibizione della sintesi di ATP

Studi in vitro utilizzando mitocondri e cloroplasti isolati hanno dimostrato che i clorofenoli sono potenti disaccoppianti della fosforilazione ossidativa e della fosforilazione fotosintetica (Ravanel et al., 1985) implicando l'inibizione della produzione di ATP.

2,4-Diclorofenolo (2,4-DCP) è la più abbondante forma di contaminanti clorofenolici nell'ambiente acquatico (House et al., 1997) e ne è stata studiata la tossicità sul fitoplancton marino.

Studi effettuati da Yang et al. (2001) hanno determinato gli effetti subletali di 2,4-Diclorofenolo (2,4-DCP) sui cambiamenti citologici, dei tassi fotosintetici, di respirazione e della composizione biochimica della diatomea marina *Skeletonema costatum*. *S. costatum*, esposta a concentrazioni di 2,4-DCP da 1 a 6 mg/L per 96 ore, ha mostrato una diminuzione significativa del tasso di crescita e una diminuzione della densità cellulare all'aumentare della concentrazione di 2,4-DCP. Alla concentrazione di 6 mg/L di erbicida il tasso di crescita risulta ridotto del 37.6% e la densità cellulare è diminuita del 61%, mentre non sono stati osservati cambiamenti significativi nel volume cellulare. Inoltre a questa concentrazione si osserva un significativo aumento del contenuto lipidico (+204%) e di carboidrati (+37.8%), mentre non si riscontra nessuna differenza nel contenuto proteico. L'aumento del totale contenuto lipidico, correlato alla diminuzione della crescita algale, suggerisce che le diatomee possono cambiare la loro modalità di utilizzo dell'energia, deviando l'energia non utilizzata per la crescita in riserve lipidiche. E' stato inoltre dimostrato che i lipidi e i carboidrati sono utilizzati come riserve di energia chimica nelle diatomee (Darley, 1977; Werner, 1977). Anche il contenuto di clorofilla a e di clorofilla c sono influenzati dalla presenza di 2,4-DCP: alle concentrazioni di 3 e 6 mg/L si hanno rispettivamente delle diminuzioni di 24.1% e 20.4% per la clorofilla a e di 15.7 e 14.4 per la clorofilla c, mentre la quantità di carotenoidi rimane invariata. Non si osservano invece cambiamenti significativi nei tassi di respirazione e

di fotosintesi durante le 96 ore di esposizione, sembra quindi che la catena di trasporto degli elettroni non sia influenzata dalla presenza di 2,4-DCP. Cambiamenti significativi si hanno invece nel rapporto RNA/DNA, che risulta significativamente ridotto dopo l'esposizione a 3 e a 6 mg/L mostrando una correlazione negativa con l'aumentare della concentrazione di 2,4-DCP, mentre i livelli di ATP intracellulare e di AEC sono influenzati durante le 96 ore di esposizione. Il rapporto RNA/DNA fornisce una buona stima di attività di sintesi proteica ed è spesso utilizzato come indicatore biochimico del tasso di crescita in numerose specie di organismi marini (Dortch et al., 1983). La diminuzione del rapporto RNA/DNA osservata in questo esperimento dimostra che la sintesi proteica è inibita, manifestandosi in una riduzione della crescita delle diatomee, non dovuta a una diminuzione della sintesi energetica ma a un cambiamento di modalità di utilizzo di energia: l'energia prodotta è infatti convertita e immagazzinata come lipidi e carboidrati intracellulari.

2.2.3 Alterazioni bio-fisiologiche del fitoplancton

La risposta agli erbicidi da parte del fitoplancton è specie specifica: le risposte fisiologiche vanno da disfunzioni fisiologiche a una rapida morte cellulare (Solomon et al., 1996).

In particolare gli erbicidi PSII-target, inibendo l'attività fotosintetica delle microalghe, influenzano negativamente le normali attività bio-fisiologiche delle cellule, come la capacità di divisione cellulare, e quindi il tasso di crescita, le dimensioni cellulari, la capacità di sintesi proteica e numerose altre attività fisiologiche.

L'esposizione a Irgarol, oltre a inibire il PSII, causa cambiamenti nell'abbondanza fitoplanctonica e influenza alcune proprietà fisiologiche cellulari come il contenuto di pigmenti, le dimensioni cellulari e il colore, come hanno dimostrato gli studi condotti da Zamora-Ley et al. (2006). Un rapido metodo utilizzato per analizzare questi cambiamenti è la citometria a flusso (Readman et al. 2004). Per tutte le specie, il completo recupero biologico è stato dimostrato entro

i 3-4 giorni dopo il trattamento con Irgarol, sia per quanto riguarda il tasso di crescita che per il rendimento quantico.

Le conseguenze negative derivate dall'alterazione dell'attività fotosintetica dovuta all'esposizione di atrazina sono state dimostrate dallo studio condotto da Pinckney et al. (2002) sulle risposte specie-specifiche del fitoplancton estuarino esposto a concentrazioni subletali di atrazina (25 µg/L) per 24/48 ore, utilizzando campioni d'acqua naturali prelevati da Galveston Bay in Texas.

Molti estuari e zone costiere sono esposti al carico di erbicidi, quindi il fitoplancton in questi habitat è soggetto alla loro presenza, spesso correlata al carico di nutrienti. In uno studio su colture monospecifiche di laboratorio basse concentrazioni di atrazina a livelli di 1 µg/L non sono risultate sufficienti per indurre mortalità delle specie algali, hanno però influenzato in maniera significativa la fotosintesi e la crescita fitoplanctonica nel giro di ore (Millie e Hersh, 1987), mentre in uno studio condotto su una comunità fitoplanctonica di estuario, l'esposizione a 25 µg/L non ha influenzato significativamente la biomassa di alcuna specie algale presente durante l'incubazione. La concentrazione di atrazina presente in condizioni ambientali sembra non abbia impatti significativi negativi, ciò sembra indicare una acclimatazione delle comunità fitoplanctoniche all'esposizione di atrazina.

Metolachlor e isprotrone sono i due erbicidi maggiormente usati in agricoltura in Francia e la loro tossicità è stata studiata da Debenest et al. (2009) esponendo alghe perifitiche in condizioni controllate a diversi regimi di esposizione. Specie come *Melosira varians*, *Nitzschia dissipata* e *Cocconeis placentula* non sono influenzate dall'esposizione agli erbicidi, altre specie come *Eolimna minima* e *Navicula reichardtiana* sono invece più sensibili.

La maggior concentrazione usata per l'esposizione a isoprotrone (30 µg/L) inibisce l'aumento della biomassa in maniera statisticamente significativa. Anche sotto esposizione al metolachlor si è riscontrata una diminuzione della densità cellulare e della concentrazione di

clorofilla c rispetto al controllo, oltre a una alterazione nella moltiplicazione cellulare piuttosto che nella fotosintesi e a un'inibizione della divisione cellulare, influenzando la sintesi degli acidi grassi (Carder et al., 1998).

La biomassa algale è stata stimata attraverso lo studio della concentrazione dei pigmenti (clorofilla a e c) e della densità cellulare. Gli studi effettuati sulla clorofilla a e c e sulla densità delle cellule vive hanno dimostrato una chiara inibizione della crescita della biomassa nei campioni trattati con isoproturone, in particolare tra il controllo e il campione trattato con la più alta concentrazione di erbicida (30 µg/L). La sintesi di clorofilla c è meno inibita rispetto alla clorofilla a. L'esposizione a s-metolachlor invece ha mostrato una maggiore inibizione della quantità di clorofilla c rispetto alla clorofilla a, oltre che una minore influenza sulla densità cellulare rispetto al trattamento con isoproturone.

Come conseguenza all'esposizione ad atrazina e al suo principale metabolita, deetilatraxina, e al loro effetto inibitorio del PSII, il biovolume algale delle diatomee diminuisce significativamente (2 o 3 volte più basso) come dimostra il trattamento a 250 µg/L rispetto ai controlli per tutta la durata dell'esperimento condotto da De Lorenzo et al. (1999). Il biovolume algale era significativamente più basso anche nel trattamento a 50 µg/L dopo 24 ore. Anche l'ossigeno disciolto è significativamente diminuito rispetto al controllo fino al 75 % nel trattamento a 250 µg/L.

L'abbondanza batterica è significativamente ridotta dopo 24 h, mentre sembra non siano influenzati ciliati e flagellati eterotrofici.

2.2.4 Alterazione della struttura di comunità fitoplanctoniche esposte a erbicidi

Cambiamenti nella biomassa di specifici gruppi algali come diatomee, cianobatteri, dinoflagellate, criptomonadi etc., presenti nelle comunità fitoplanctoniche del Galveston Bay, sono stati misurati per identificare gruppi algali che possono essere influenzati da una intensa

esposizione di 24-48 ore a concentrazioni subletali di atrazina. Nonostante questi risultati non possano essere utilizzati per predire cambiamenti nelle naturali strutture di comunità, possono fornire informazioni su quali gruppi siano influenzati da atrazina in condizioni ambientali (luce, nutrienti, temperatura, etc.) (Drake et al., 1996).

Come hanno dimostrato gli studi condotti da Magnusson et al. (2008) nella grande barriera corallina, la contaminazione da erbicidi alle concentrazioni ambientali (per diurone pari a 0,5 – 2 µg/L e per exazinone dai 2 ai 4 µg/L, Mitchell et al., 2005), determina una riduzione dell'efficienza fotosintetica del 10%, pertanto il cambiamento di biomassa microalgale tropicale bentonica può alterare la composizione della comunità di microorganismi, con effetto sulla disponibilità di alimenti; alterazioni nei pigmenti e nel contenuto proteico possono inoltre cambiare il valore nutrizionale delle microalghe.

Cambiamenti di struttura delle comunità si sono viste anche in siti fortemente impattati da Irgarol: alcune specie fitoplanctoniche sono più sensibili all'Irgarol rispetto ad altre, motivo per cui il rilascio nell'ambiente di questo composto porta cambiamenti sulla struttura della comunità fitoplanctonica (Nyström et al. 2001). L'esposizione di 23 ore a concentrazioni di Irgarol 1051 di 112 ng/L fa diminuire l'abbondanza di alcune specie eucariotiche a quantità minori della metà rispetto al controllo (Readman et al. 2004). Tipiche risposte includono un aumento nell'abbondanza di eucarioti e *Cryptomonas* sp. all'aumentare delle concentrazioni di Irgarol. Studi di citometria a flusso hanno riportato la presenza di due popolazioni fitoplanctoniche, una eucariote e una procariote. L'abbondanza della popolazione eucariote variava leggermente tra i diversi siti analizzati in diversi mesi, dimostrando la forte resistenza di questa all'Irgarol. A differenza della popolazione eucariote, il fitoplancton procariote ha dimostrato una grande eterogeneità tra i diversi siti analizzati e nei diversi mesi e la più alta abbondanza di procarioti è stata trovata alle

minori concentrazioni di Irgarol. Attraverso analisi al microscopio sono state trovate 7 specie dominanti di fitoplancton: criptofite e *Chaetoceros* spp., presenti in tutti i campioni alle stesse quantità, *Skeletonema costatum*, *Scrippsiella* sp. e *Chaetoceros* sp, la cui abbondanza non è correlata alla concentrazione di Irgarol. A differenza di tutte le altre specie studiate, l'abbondanza di criptofite ha dimostrato una debole ma significativa correlazione positiva con la concentrazione di Irgarol per tutto il periodo di studio, oltre alla maggiore tolleranza a Irgarol, assumendo un vantaggio competitivo negli ecosistemi contaminati.

De Lorenzo et al. (1999) hanno dimostrato che l'esposizione all'atrazina e al suo metabolita, deetilatrazina provoca un cambiamento nella composizione della comunità algale provocando la perdita selettiva di alcuni generi algali, portando a una diminuzione nella diversità.

La maggior parte dei generi algali identificati nei substrati artificiali presi in esame erano diatomee. La composizione della comunità fototrofica è stata alterata sia nei trattamenti con atrazina che deetilatrazina rispetto al controllo. C'erano 6 generi algali presenti nel controllo che erano poi assenti nei trattamenti con atrazina e deetilatrazina: *Biddulphia*, *Cylindrotheca*, *Euglena*, *Licmophora*, *Oscillatoria* e *Stauroneis*. *Amphiprora* e *Rhizosolenia* sono state eliminate da entrambi i trattamenti di atrazina e dal trattamento di deetilatrazina a maggior concentrazione. Numerose specie di *Cymbella*, un cianobatterio filamentoso, e *Synechococcus*, un cianobatterio coccoide, sono invece aumentate.

Questi cambiamenti nella composizione della comunità algale e la diminuzione della biomassa e della produttività fotosintetica hanno mostrato una riduzione a lungo termine delle risorse alimentari per certi erbivori, influenzando anche la quantità e la qualità dei nutrienti che sono riciclati attraverso la rete alimentare microbica, passando a livelli trofici più alti. Questa deficienza di organismi fototrofi porta a

un significativo aumento nell'abbondanza e nella produttività dei batteri portando a una competizione per i nutrienti minerali.

Attraverso lo studio condotto da Guasch et al. (1998) è stato dimostrato che differenti taxa di diatomee possono essere indicatori dell'entità di inquinamento presente. E' stato visto infatti che un gradiente di inquinamento dato dalla concentrazione di atrazina e nutrienti determina differenze nella struttura di comunità delle diatomee. Inoltre è stato visto che comunità algali dominate da diatomee corrispondono sia a siti di altitudine maggiore e meno industrializzati, sia siti con concentrazioni di atrazina maggiori. L'oggetto di studio è l'identificazione delle comunità caratterizzate da diversa sensibilità all'atrazina e la possibilità di trovare le variabili ambientali correlate a questa sensibilità in ecosistemi lotici. Lo studio è stato condotto su ecosistemi d'acqua dolce contaminati da atrazina in Svezia, Olanda e Spagna, focalizzando l'influenza dell'atrazina sull'integrità funzionale e strutturale delle alghe, che sono tra gli organismi più suscettibili a questa sostanza negli ecosistemi acquatici. L'atrazina ha effetti sia sulle singole specie che sulle comunità e la sua tossicità è correlata alla presenza di luce, nutrienti o altre sostanze tossiche (Solomon et al., 1996). L'esposizione ad atrazina tende a modificare la composizione della comunità dalla dominanza di alghe verdi alla dominanza di diatomee.

3. FATTORI CHE ALTERANO LA TOSSICITÀ E LA SENSIBILITÀ DELLE MICROALGHE

3.1 Influenza dei fattori ambientali

Molti fattori ambientali possono interferire con la sensibilità delle alghe a sostanze tossiche. I risultati di un'analisi multivariata indicano che tra i fattori ambientali che contribuiscono alla sensibilità del perifiton naturale all'atrazina, l'inquinamento è il più significativo. Questo studio condotto da Guash et al. (1998) ha inoltre individuato alcuni indicatori biologici di sensibilità all'atrazina in ecosistemi lotici: comunità perifitiche dominate da diatomee sono più tolleranti delle comunità dominate dalle alghe verdi e dalle crisofite.

Differenti taxa di diatomee presenti a differenti livelli di eutrofizzazione e inquinamento hanno diversa sensibilità all'atrazina. Le comunità di perifiton che crescono in Svezia sono dominate da *Fragilaria* spp. Questi siti sono poveri di nutrienti e hanno bassi valori di pH e alte concentrazioni di DOC rispetto alla maggior parte degli ecosistemi olandesi e spagnoli.

La sensibilità del perifiton all'atrazina è significativamente correlata al gradiente di inquinamento. Le comunità di perifiton nei siti più inquinati, come in Olanda, sono meno sensibili all'atrazina. Queste comunità sono dominate da *Navicula menisculus*, *Navicula lanceolata*, *Gomphonema parvulum*, *Nitzschia palea* e *Fragilaria capucina*, specie più tolleranti all'eutrofizzazione e all'inquinamento organico.

Dal momento che la struttura tassonomica delle comunità algali è influenzata da molte variabili ambientali, come i nutrienti (Guasch et al., 1994; Freeman et al. 1994), ci si aspetta un effetto indiretto dei fattori ambientali sulla sensibilità di comunità naturali a sostanze tossiche come l'atrazina. Barreiro e Pratt (1994) hanno scoperto che l'aggiunta di fosfati e nitrati aumentano l'abilità del perifiton naturale

di ristabilirsi dopo stress da diquat. Mayasiche et al. (1986) hanno dimostrato che la tossicità da atrazina aumenta all'aumentare della luce e della temperatura dell'acqua in colture algali.

La sensibilità all'atrazina è correlata alle condizioni di luce e alla percentuale di differenti gruppi algali. I risultati che indicano le differenze nella sensibilità sono correlati a variabili ambientali come luce, nutrienti o concentrazioni di atrazina, permettendo di identificare indicatori biologici alla sensibilità dell'atrazina in sistemi lotici: comunità di perifiton dominate da Bacillariophyceae sono più tolleranti delle comunità dominate da Chlorophyceae e Chrysophyceae.

3.2 Risposte specifiche e utilizzo degli organismi fitoplanctonici come biomarcatori

L'inquinamento ambientale dovuto a composti organici e a metalli è aumentato drasticamente nel 19° secolo all'aumentare dell'attività industriale. Inquinanti ambientali originano da diverse fonti antropogeniche e hanno la potenzialità di minacciare l'integrità ecologica degli ambienti marini. Differenti organismi rispondono con una sensibilità diversa ai diversi agenti inquinanti, bioaccumulandoli e trasportandoli lungo la catena trofica a livelli superiori. Le micoralghe marine sono ottimi indicatori della presenza di agenti inquinanti organici e inorganici dal momento che sono le più abbondanti forme di vita negli ambienti acquatici e occupano la base della catena alimentare, per questo sono considerate indicatori dell'inquinamento degli ecosistemi acquatici (Moacir A. Torres et al. 2008).

Si utilizza il termine "biomarcatore" per indicare una misura quantitativa dei cambiamenti nei sistemi biologici che possono essere correlati all'esposizione agli effetti tossici di contaminanti chimici ambientali (WHO, 1993; Peakall and Walker, 1994). Il termine biomarcatore è spesso riferito a cambiamenti cellulari, biochimici, molecolari o fisiologici che sono misurati nelle cellule, nei fluidi

corporei, nei tessuti o in organi all'interno di un organismo, come indicatori dell'esposizione a un agente xenobiotico (Van Gestel and Van Brummelend, 1996). Ci sono molti studi che implicano l'utilizzo di alghe come bioindicatori (Pinto et al., 2003; Gerofke et al., 2005). Le alghe sono in grado di assorbire gli agenti inquinanti dall'ambiente acquatico, biotrasformare composti organici e immobilizzare composti inorganici per renderli meno tossici (Pflugmacher et al., 1999). E' noto infatti che esse siano la base della biomagnificazione degli agenti inquinanti e i vettori per il trasferimento di questi a livelli superiori della catena alimentare (Sandermann, 1992). Le alghe sono considerate come potenti bioindicatori dell'inquinamento acquatico e le loro risposte metaboliche agli agenti xenobiotici come importanti biomarcatori (Witton and Kelly, 1995); ad esempio la presenza di metalli nelle alghe induce la sintesi di numerose proteine come le metallotioneine (Romero-Isart e Vasak, 2002). E' stato inoltre dimostrato che la presenza di agenti inquinanti possono indurre uno stress ossidativo e nitrosativo e quindi, dato che le alghe hanno un importante sistema antiossidante, possono essere utilizzate come potenti biomarcatori per l'esposizione all'inquinamento (Pinto et al., 2003). L'inibizione della crescita e della fotosintesi sono i principali effetti della presenza di agenti inquinanti nelle microalghe (Franqueira et al., 2000).

3.3 Bioaccumulazione, degradazione e principali sistemi di difesa: trasformazione xenobiotica e alterazione della modalità trofica nel fitoplancton

La maggior parte degli erbicidi spesso non sono rapidamente degradati, la loro rapida degradazione comprometterebbe la loro applicabilità (Islam e Tanaka, 2004), motivo per cui una gran quantità di residui di pesticidi si accumulano nell'ambiente (Zi-Wei et al., 2002). Una complessa serie di fattori determinano il destino dei pesticidi utilizzati in agricoltura, come il metodo di applicazione,

principi attivi, condizioni climatiche, topografia del terreno, tipo di suolo, etc. Tutti questi fattori influenzano la persistenza e l'estensione dei contaminanti a siti non target (Larson et al., 1995). Inoltre, l'abuso dei pesticidi fa aumentare la probabilità di impatti negativi su organismi non target come organismi marini, piante terrestri, mammiferi e microorganismi del suolo (Tremolada et al., 2004).

La bioaccumulazione è il risultato della presenza di contaminanti negli organismi viventi. Le conseguenze della bioaccumulazione xenobiotica nel sistema biologico si manifestano a livelli gerarchici multipli: dagli effetti fisiologici e/o biochimici di un singolo organismo, a complesse connessioni trofiche nell'ecosistema (Newman and Unger, 2003).

La maggior parte dei composti chimici antropogenici possono comunque essere biodegradati naturalmente all'interno degli ambienti acquatici come risultato di processi multipli attuati da organismi autotrofi e eterotrofi all'interno del sistema biologico (Singer et al., 2004).

Erbicidi come l'isoproturone possono essere metabolizzati dalle alghe, spiegando così la diminuzione delle concentrazioni di erbicidi osservate negli esperimenti. Anche processi fisico-chimici come la fotolisi e l'idrolisi, possono essere coinvolte nella degradazione di queste molecole (Perez et al., 2000). La diminuzione di s-metolachlor può essere correlata alle sue proprietà fisico-chimiche; essendo una sostanza idrofobica si sospende come biofilm.

Gli enzimi delle cellule vegetali come il Citocromo P450, oltre al loro ruolo in diverse vie biosintetiche, giocano un ruolo centrale nella risposta a composti estranei, compresi gli erbicidi. L'alterazione chimica di un erbicida mediata da P-450 generalmente risulta in una riduzione dell'attività biologica. Questa prima fase di biotrasformazione è uno dei più importanti meccanismi di detossificazione biologica. Ad esempio, nelle alghe verdi unicellulari *Chlorella fusca*, e *Chlorella sorokiniana*, il proerbicida piridazinone metflurazone richiede N-demetilazione per formare il derivato attivo

norflurazone, un potente inibitore di fitoene desaturasi, un enzima coinvolto nella biosintesi dei carotenoidi. Una seconda N-demetilazione forma il derivato dimetile SAN 9774, attuando una efficiente detossificazione (Thies et al., 1994).

Studi tossicologici degli effetti di s-metolachlor e isoproturone su diverse specie di diatomee hanno dimostrato che le specie eterotrofe facoltative sono significativamente più avvantaggiate all'esposizione di isoproturone ad alte concentrazioni: specie come *Melosira varians*, *Nitzschia dissipata* e *Cocconeis placentula* non risultano essere affette dall'esposizione agli erbicidi, mentre altre specie come *Eolimna minima* e *Navicula reichardtiana* risultano essere più sensibili. Questi risultati suggeriscono che gli inibitori della fotosintesi come l'isoproturone favoriscono specie in grado di sopravvivere quando l'autotrofia è inibita. Nelle comunità algali esposte a isoproturone si è visto un aumento delle specie eterotrofe facoltative statisticamente significativo nel campione esposto alla più alta concentrazione di erbicida (30 µg/L) rispetto al controllo, effetto non riscontrato nel trattamento con s-metolachlor. Le specie eterotrofe facoltative in presenza di isoproturone passano da autotrofia a eterotrofia, come è stato riscontrato anche in presenza di atrazina (Hamala et al., 1985). Il cambiamento della modalità trofica è un noto processo di sopravvivenza caratteristico di alcune diatomee in condizioni sfavorevoli come buio e inquinamento organico, spiegando così la tolleranza di queste alghe a erbicidi inibitori della fotosintesi. Quando la fotosintesi è inibita, la materia organica rappresenta una fonte di carbonio alternativa per lo sviluppo cellulare.

La maggior resistenza all'Irgarol, un erbicida inibitore della fotosintesi, da parte di Criptofite e altre specie eucariotiche rispetto alle specie procariotiche, può essere correlata a una modalità alternativa di acquisizione dell'energia. La persistente crescita di *R. salina* a severe condizioni di carenza di luce, in associazione alla sua incapacità di regolare il suo fotosistema, è stata interpretata come una evidenza della presenza di un'acquisizione alternativa dell'energia,

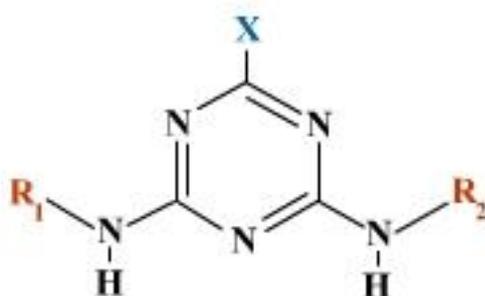
molto probabilmente attraverso l'utilizzo di carbonio organico disciolto (Nyström et al. 2001).

4. CARATTERISTICHE CHIMICHE DEGLI ERBICIDI TRIAZINICI E DEL METOLACHLOR

4.1 Erbicidi triazinici

4.1.1. Struttura:

Le triazine sono composti eterociclici azotati, formati da un anello esa-atomico con alternanza di atomi di carbonio e azoto con gruppi sostituenti in posizione 2 (un atomo di cloro, un gruppo S-CH₃, OH oppure O-CH₃) e in posizione 4 e 6 con gruppi alchilici (etilammina, isopropilammina, terbutilammina).



4.1.2. Meccanismo d'azione:

Il meccanismo d'azione delle triazine erbicide nelle piante superiori è diretto al blocco della fotosintesi a livello del PSII. Il PSII è un complesso multiplo della clorofilla, localizzato nella membrana tilacoidale di tutti gli organismi fotosintetici (piante superiori, alghe, cianobatteri).

La fotosintesi implica la cattura biofisica dell'energia solare per promuovere inizialmente la scissione dell'acqua in ossigeno molecolare e protoni, e quindi la catena di trasporto degli elettroni per produrre NADPH e ATP per il ciclo di riduzione del carbonio.

Le triazine, e quindi la terbutilazina, come altri gruppi di erbicidi, inibiscono la fotosintesi attraverso lo stesso meccanismo d'azione.

Queste competono con il plastochinone (PQ) al sito di legame PQ sulla proteina D1 all'interno del complesso del PSII. L'inibizione del trasporto degli elettroni del PSII blocca la sintesi di NADPH e ATP e il ciclo di riduzione del carbonio, portando a carenza di carboidrati e stress ossidativo.

4.1.3. Resistenza all'erbicida:

E' conferita da una mutazione puntiforme nel gene cloroplastico *psbA*, codificante per la proteina D1, causa una sostituzione dell'aminoacido Ser-264-Gly nel sito di legame del PQ.

Dato che le triazine e il PQ competono direttamente per il sito di legame del PQ, la mutazione a livello di Ser-264-Gly previene il legame della triazina e allo stesso tempo promuove il legame del PQ.

Al sito di legame del PQ sulla proteina D1, Ser-264 mette a disposizione un legame idrogeno importante per il legame o di PQ o della triazina. La sostituzione con glicina rimuove questo legame idrogeno, prevenendo il legame con la triazina.

Pur fornendo un'alta resistenza alla triazina, questa mutazione riduce anche l'affinità verso il PQ, portando a una riduzione dell'attività fotosintetica.

E' stato però provato che l'azione erbicida non riguarda il semplice blocco della fotosintesi in quanto le piante trattate con composti triazinici non presentano i sintomi tipici causati da "affamamento". Secondo alcuni autori la morte della pianta potrebbe essere la conseguenza della formazione di un agente fitotossico secondario, principale responsabile delle proprietà erbicide delle triazine.

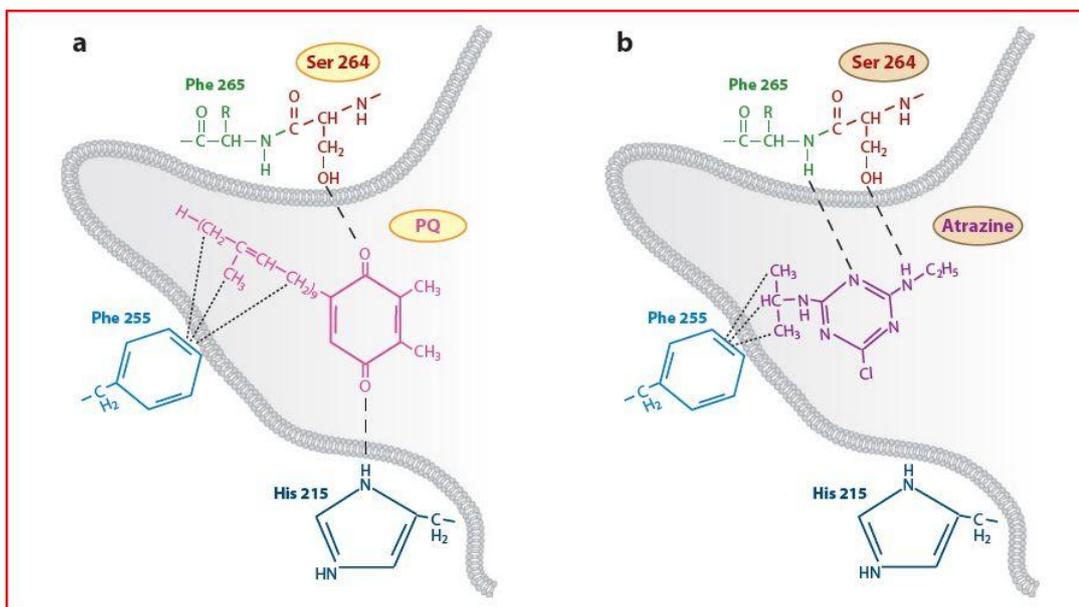
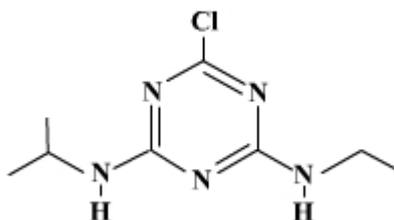


Fig 2.3.1 Interazione del plastoquinone (PQ) e atrazina con gli aminoacidi all'interno del sito di legame del PQ a livello della proteina D1 del PSII. (a) PQ a livello del sito di legame PQ è legato attraverso un legame idrogeno a His-215 e Ser-264. (b) L'atrazina a livello del sito di legame PQ è legata attraverso un legame idrogeno a Phe-265 e Ser-264, prevenendo il legame del PQ. La sostituzione di Ser-264 con Gly rimuove il legame idrogeno, prevenendo il legame dell'atrazina.

4.1.4. Principali Triazine:

a. Atrazina



2-cloro-4-etilammino-6-isopropilammino-1,3,5-triazina

Impiego: E' uno dei composti cloro-triazinici più pericolosi, introdotta nel 1958 come erbicida per il controllo di infestanti appartenenti al gruppo delle dicotiledoni e utilizzata prevalentemente nelle coltivazioni di mais, sorgo e canna da zucchero. Il suo impiego è stato vietato su tutto il territorio nazionale dal 1992 (con Decreto del Ministero della Sanità del 18 marzo 1992, n.705/910) dopo diversi episodi di contaminazione di falde idriche, ma viene ancora prodotta ed utilizzata in molti paesi Europei e negli Stati Uniti (più di 38 milioni di Kg venduti ogni anno). Il prodotto commerciale viene impiegato come dispersione acquosa e agisce come diserbante in pre- e post-emergenza.

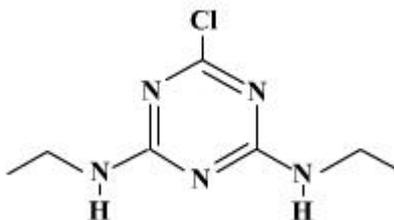
Assunzione: E' un erbicida ad adsorbimento radicale e, in misura minore, fogliare. Viene trasportato per via xilematica.

Residuità: Nonostante la sua solubilità non sia molto elevata, l'atrazina ha dimostrato avere una elevata persistenza ambientale con conseguente inquinamento sia di acque superficiali che di falda dovuto alla capacità di stabilire dei legami forti con i colloidi organici presenti nella frazione argillosa del terreno determinando il lento e continuo rilascio della sostanza e il suo rinvenimento nelle acque anche a distanza di anni dal suo impiego.

Degradazione: La maggior parte degli organismi biodecompositori non riescono a metabolizzare queste sostanze.

Danni alla salute: L'atrazina è una sostanza pericolosa per la salute umana. Alcuni studi su criceti e anfibi hanno evidenziato come questa molecola produca interferenze sull'equilibrio degli ormoni sessuali determinando un effetto femminilizzante.

b. Simazina



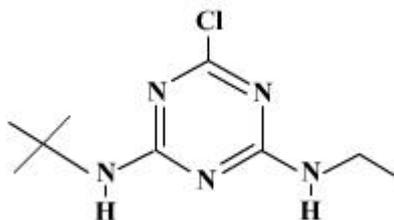
***2-cloro-4,6-bis(etilamino)-
1,3,5-triazina***

Impiego: è un erbicida selettivo, utilizzato in pre- emergenza nel controllo di infestanti a foglia larga e di erbe annuali in molte colture tra cui viti, diversi tipi di verdure, piante ornamentali e soprattutto cereali. Impiegata anche per il controllo di alghe e altre infestanti in acquari e allevamenti di pesci.

Assunzione: Viene assorbita a livello delle radici e raggiunge le foglie.

Residuità: E' moderatamente persistente nell'ambiente, ha un tempo di dimezzamento che va dai 30 ai 150 giorni e può essere adsorbita in terreni argillosi. La sua bassa solubilità (5 mg/L a 20°C) la rende però poco mobile.

c. Terbutilazina e Desetilterbutilazina



2-cloro-4-etilamino- 6-terbutilamino-1,3,5-triazina

IUPAC: *N*²-*tert*-butyl-6-chloro-*N*⁴-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine

CAS: 6-chloro-*N*-(1,1-dimethylethyl)-*N*'-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine

Formula: C₉H₁₆Cl Peso molecolare 229,7

Densità: 1188 Kg m⁻³ (20 °C)

Solubilità in acqua: 8,5 mg l⁻¹ (pH 7, 20 °C)

Punto di fusione: 177-179 °C

Pressione di vapore: 0,15 mPa (25 °C)

Costante di Henry: 4,05 · 10⁻³ Pa m³ mol⁻¹

KOW: Log P = 3,21

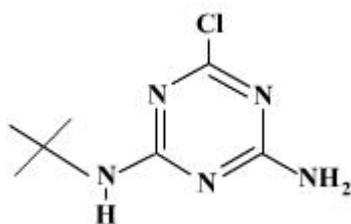
DT50: suolo 30-60 giorni

KOC: 162-278 ml g⁻¹

Classe chimica: Triazine

Impiego: cloro-triazina usata solo per scopi agricoli in preemergenza nelle colture di agrumi, vite, olivo, orzo, mais, segale, sorgo. Sostituisce l'atrazina, ritenuta contaminante delle falde, dal 1986.

Degradazione: Prodotto di degradazione della terbutilazina è la *desetilterbutilazina (DTBZ)*. Si forma mediante dealchilazione del composto precursore e agisce sia nel suolo sia nelle piante come il composto parentale.



2-cloro-4-amino-6-ter-butilamino-1,3,5-triazina

E' più polare e più mobile della terbutilazina. La DTBZ spesso è stata rinvenuta nelle acque di falda in concentrazioni anche superiori a quelle del suo precursore.

Residuità: Il raggiungimento dal suolo alla falda acquifera, la lisciviazione e il percolamento dipendono principalmente da:

1. caratteristiche della molecola
2. caratteristiche dei terreni
3. dosi applicate
4. precipitazioni

Nel suolo si trova più Desetilterbutilazina rispetto alla Terbutilazina perché ha:

1. Maggiori tempi di degradazione (>DT50)
2. Minore affinità formare legami con il suolo (<K_{oc})
3. Maggiore solubilità (è un composto dealchilato)

Le precipitazioni determinano la concentrazione di TBZ e DTBZ nel terreno.

Scarse ed irregolari precipitazioni determinano la permanenza della TBZ nel terreno, la sua degradazione a DTBZ e di conseguenza un aumento della concentrazione di DET.

E' comunque difficile stabilire gli effetti netti delle precipitazioni sulle concentrazioni di TBZ e DTBZ poiché le piogge mobilitano l'erbicida e il metabolita verso le acque sotterranee, ma abbondanti e frequenti piogge diluiscono le loro concentrazioni.

La TBZ raramente raggiunge valori superiori al limite di legge.

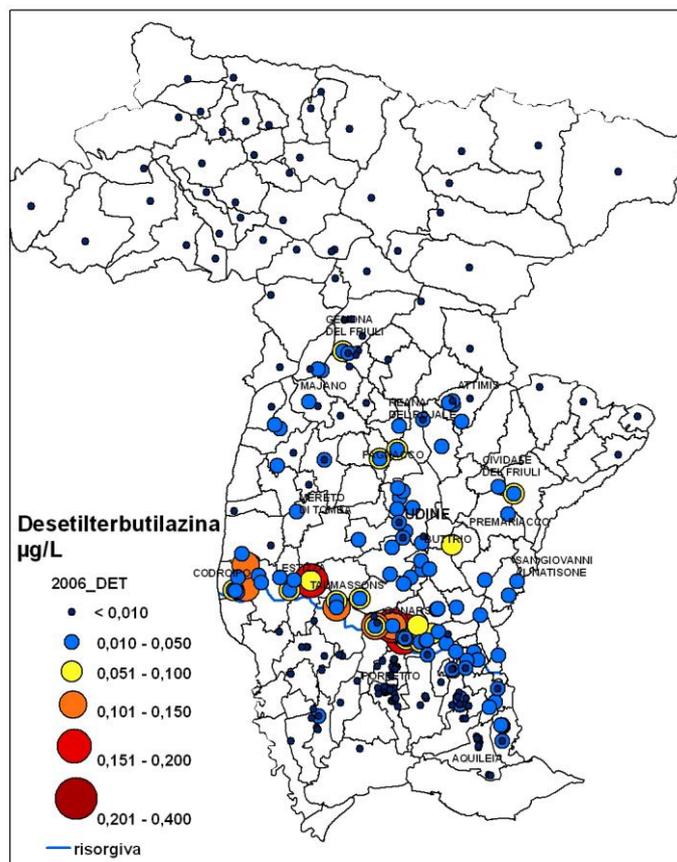
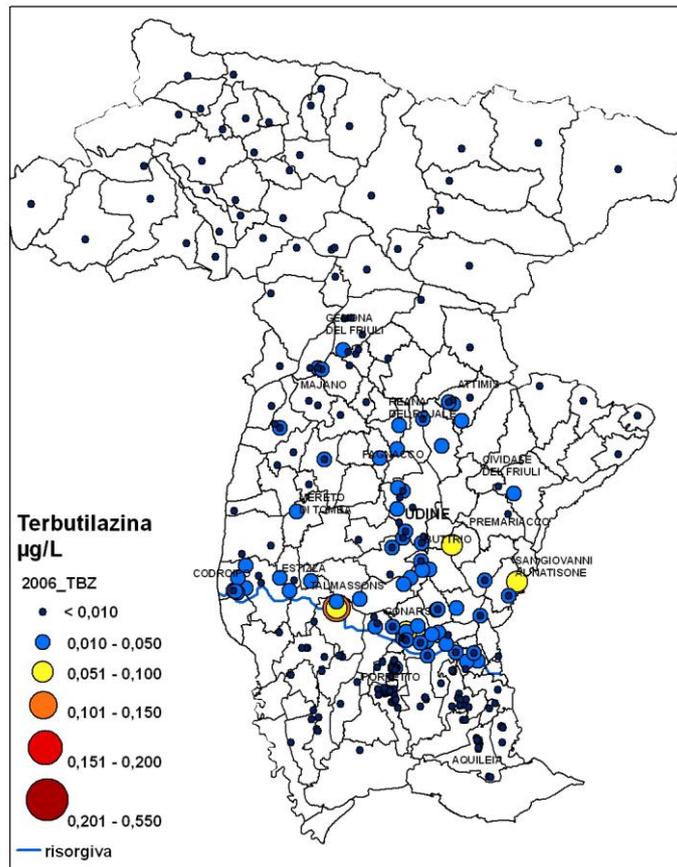


Fig 4.1 esempio di presenza di Terbutilazina e Deseterbutilazina nella provincia di Udine nel 2006

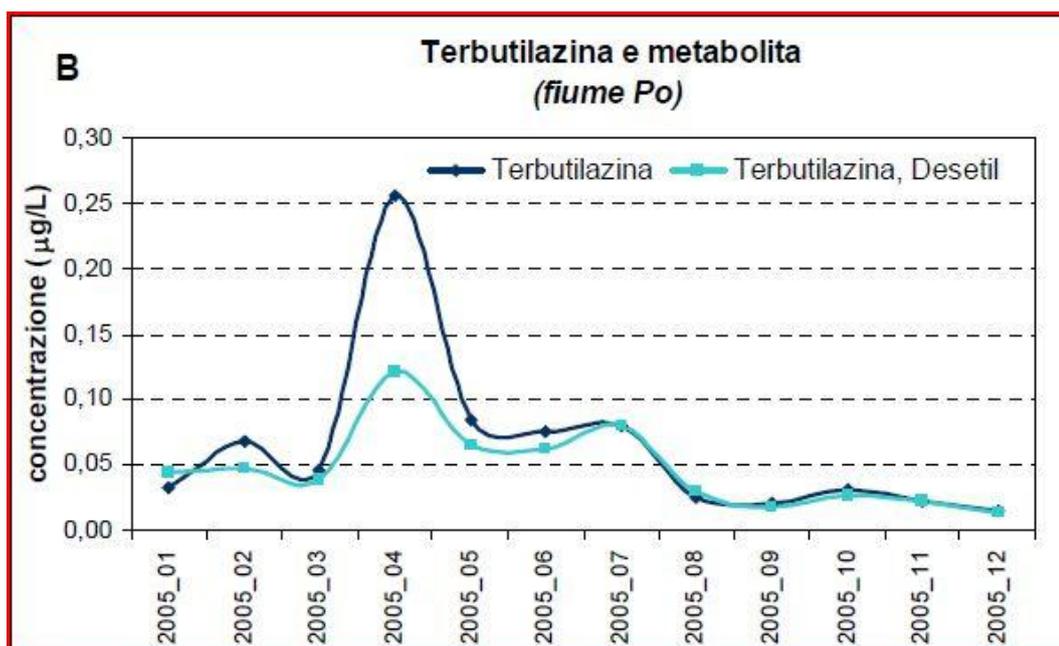
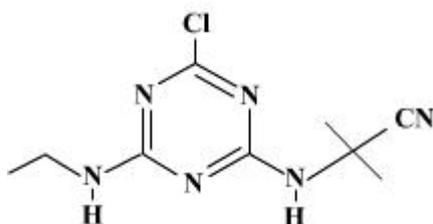


Fig 4.2 Concentrazioni di terbutilazina e desetilterbutilazina presenti nel fiume Po nell'anno 2005.

Regolamentazione in Italia: A partire dal 1° gennaio 2008 non è più consentito utilizzare erbicidi contenenti la sola terbutilazina. I vecchi formulati a base di tale sostanza, infatti, potevano essere venduti e impiegati al massimo entro il 31 dicembre 2007. Con la nuova campagna agraria sono in commercio e vanno impiegati esclusivamente formulati che contengono la terbutilazina in miscela con altre sostanze attive diserbanti. Sulle etichette di tali prodotti sono riportate le seguenti limitazioni all'impiego della terbutilazina: "Rispettare una fascia di sicurezza non trattata, distante almeno cinque metri dai corpi idrici superficiali. Nelle aree definite vulnerabili, ai sensi del decreto legislativo 152/2006 impiegare ad anni alterni ed esclusivamente con interventi localizzati sulla fila di semina". Dunque, negli appezzamenti adiacenti i corpi idrici superficiali deve essere lasciata una fascia di rispetto non trattata pari a cinque metri. Per il momento si rimane in attesa di indicazioni più precise rispetto a cosa si intenda per "corpi idrici superficiali", soprattutto se si tratti dei soli corpi idrici naturali o anche di quelli artificiali. Nelle aree

vulnerabili da fitofarmaci i prodotti contenenti terbutilazina potranno essere impiegati ad anni alterni e con distribuzione localizzata sulla fila.

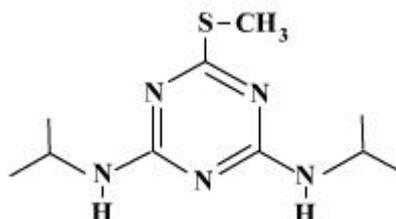
d. **Cianizina:**



***2-cloro-4(1-ciano-1-metiletilamino)-
6-etilamino-1,3,5-triazina***

Impiego: cloro-triazina usata in preemergenza nelle colture di mais e frumento.

e. **Prometrina**



2,4-bis (isopropilamino)-6-metiltio-1,3,5-triazina

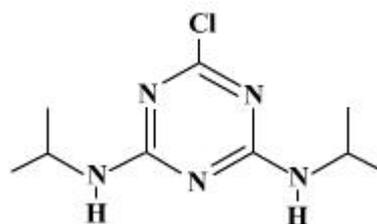
Struttura chimica: Appartiene al gruppo delle tio-triazine, ha come sostituente in posizione 2, un gruppo S-CH₃ al posto del cloro.

Impiego e meccanismo d'azione: E' un erbicida sistemico, assorbito per via radicale e fogliare ed è usato in post-emergenza per il controllo delle piante a foglia larga e altre erbe, nelle colture del cotone e del sedano.

Residuità e degradazione: In terreni argillosi tende a legarsi con le altre sostanze organiche, diminuendo molto la sua mobilità. Ha un tempo di dimezzamento di circa 60 giorni, ma in terreni molto

asciutti o in seguito a molte applicazioni successive la sua persistenza aumenta.

f. **Propazina:**



***2-cloro-4,6-bis(isopropilamino)-
1,3,5-triazina***

Sintesi: sono stati sintetizzati dei polimeri selettivi per le triazine, usando come molecole stampo alcuni erbicidi come l'atrazina, la terbutilazina e la prometrina, attualmente impiegati o comunque ancora presenti nelle acque a causa del lento rilascio da parte del terreno. Poiché i polimeri sintetizzati hanno la tendenza a rilasciare una parte del template durante le analisi, anche dopo il lavaggio in soxhlet, si è provveduto a sintetizzare un polimero con una cloro-triazina non impiegata attualmente nelle zone dove si è prelevata l'acqua di fiume per le analisi di campione reale. La molecola scelta è la *propazina*, una cloro triazina con forma molto simile alle molecole monitorate durante le analisi.

4.2 Metolachlor

IUPAC: 2-chloro-N-(2-ethyl-6-methyl-phenyl)-N-(1-methoxypropan-2-yl)acetamide

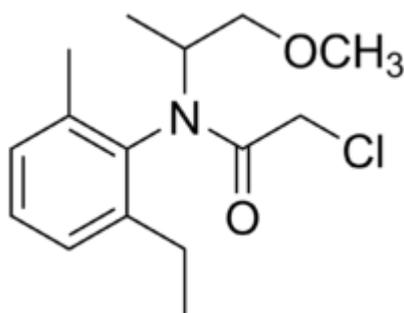
Formula: C₁₅H₂₂ClNO₂

Peso molecolare: 283,793 g/mol

Solubilità in acqua: 530 ppm a 20°C

Punto di fusione: 100°C a 0,001 mmHg

Classe chimica: Chloroacetanilidi



2-chloro-N-(2-ethyl-6-methyl-phenyl)-N-(1-methoxypropan-2-yl)-acetamide

E' un composto organico ampiamente usato come erbicida. E' un derivato dell'anilina ed è un membro degli erbicidi cloroacetanilidici.

Meccanismo d'azione: Agisce attraverso l'inibizione delle elongasi e del geranylgeranyl pirofosfato ciclastasi (GGPP), che fanno parte delle vie biosintetiche degli acidi grassi a lunga catena. E' utilizzato per il controllo della crescita delle erbe e piante a foglia larga come mais, soia, nocciole, sorgo e cotone. E' spesso utilizzato in combinazione con altri erbicidi

Metolachlor è stato trovato in acque sotterranee e superficiali in concentrazioni che vanno da 0.08 a 4,5 parti per bilione (ppb).

Effetti: E' stato classificato come pesticida di categoria C, che indica una certa carcinogenicità. E' stata riscontrata bioaccumulazione di metolachlor in specie di pesci commestibili e il suo effetto

contrastante la loro crescita e sviluppo, con conseguenze sulla salute dell'uomo. Induce effetti citotossici e genotossici nei linfociti umani e influenza la crescita cellulare, in particolare è stato visto che la divisione cellulare nel lievito è ridotta (Extoxnet, 1993).

5. MICROALGHE STUDIATE

Gli effetti dell'azione degli erbicidi terbutilazina del suo prodotto di degradazione, deseterbutilazina, e del metolachlor sono stati studiati su una specie di microalga fitoplanctonica, *Skeletonema marinoi*.

5.1 Il fitoplancton

Per fitoplancton si intende l'insieme degli organismi autotrofi fotosintetizzanti presenti nel plancton, ovvero gli organismi in grado di sintetizzare sostanza organica a partire dalle sostanze inorganiche disciolte, utilizzando la radiazione solare come fonte di energia.

Il fitoplancton è quindi il primo anello della catena trofica perché a questo gruppo di organismi, insieme alle macroalghe, si deve la produzione delle sostanze organiche che alimentano i consumatori del primo livello trofico e dei livelli superiori. E' quindi molto importante conoscere quali sono i fattori che regolano la distribuzione e l'accrescimento dei vegetali e come essi agiscono (Ghirardelli, 1981). Il fitoplancton produce inoltre la metà dell'ossigeno totale prodotto dagli organismi vegetali della Terra.

I principali organismi costituenti il fitoplancton sono:

1. *cianobatteri*
2. *proclorofite*
3. *cloroficee*
4. *criptoficee*
5. *crisoficee*
6. *dinoflagellati*
7. *diatomee*

Ecologia del Fitoplancton: La crescita e la successione stagionale del Fitoplancton sono influenzate da vari fattori, tra i quali principalmente:

1. **Intensità luminosa:** L'intensità luminosa influisce sull'attività fotosintetica. Nelle regioni temperate le condizioni favorevoli per lo sviluppo vanno dalla primavera all'autunno. Un eccesso di intensità luminosa può anche avere effetti inibitori sulla fotosintesi. La penetrazione della luce alle varie profondità è uno dei fattori più importanti che influiscono sulla distribuzione delle varie specie lungo la colonna d'acqua.

2. **Temperatura:** entro certi limiti l'aumento di temperatura favorisce i processi metabolici, quindi ad una maggiore temperatura corrisponde generalmente una maggiore produzione di biomassa fitoplanctonica. La temperatura influisce anche su altri fattori importanti per il fitoplancton, quali ad esempio la solubilità dell'ossigeno ed i movimenti delle masse d'acqua, ai quali il plancton è per definizione vincolato.

3. **La disponibilità di nutrienti:** La disponibilità di nutrienti è legata alla loro immissione dall'esterno del corpo d'acqua ed alla loro mobilitazione dal fondo, dove avviene la degradazione della sostanza organica e dove quindi essi tendono ad accumularsi. Nel caso di un lago la mobilitazione di nutrienti dal fondo è legata alle fasi di piena circolazione (vedi proprietà termiche dei laghi) che avvengono, per un tipico lago di zona temperata, in primavera ed in autunno.

4. **Fattori biologici:** Le interazioni fra le diverse specie dell'ecosistema acquatico, quali competizione, predazione, parassitismo, hanno una notevole influenza sul fitoplancton, in particolare sulla successione stagionale delle specie che lo compongono.

5.2 *Skeletonema marinoi*



Divisione: Bacillariophyta

Classe: Coscinodiscophyceae

Sottoclasse: Thalassiosirophyceae

Ordine: Thalassiosirales

Famiglia: Thalassiosiraceae

Genere: *Skeletonema*

Dati morfometrici: Asse apicale 2-21 μm; asse peralvare 2-61 μm; processi marginali 6-30.

Cellule generalmente coloniali contenenti uno o due cloroplasti a forma di coppa. Sono diatomee, pertanto sono vegetali unicellulari racchiusi in un caratteristico guscio siliceo detto frustulo, formato da due valve o teche dette epiteca ed ipoteca che si incastrano l'una dentro l'altra. Tra le due valve c'è la zona del cingolo, composto dalle bande intercalari. L'involucro è composto da una pectina impregnata di silice, pertanto per il loro sviluppo necessitano, oltre che di azoto e fosforo, anche di silice in forma solubile.

Come tutte le diatomee svolgono un ruolo molto importante nel controllare la quantità di silicio, che assumono sottoforma di acido orto silicico Si(OH)_4 , infatti nelle acque superficiali la concentrazione di silice può notevolmente abbassarsi dopo le fioriture primaverili.

Essendo eucarioti fotosintetici, hanno un nucleo ed un numero variabile di cloroplasti di colore giallo o bruno dorato (rossi in fluorescenza) aventi all'interno lamelle formate da tre tilacoidi ed una

lamella cingolare che le include tutte. Contengono clorofilla *a* e clorofilla *c*, i pigmenti accessori sono beta-carotene e xantofille.

La riproduzione avviene per divisione, l'aumento del volume del citoplasma allontana le due valve e con la divisione della cellula ognuna delle due cellule figlie eredita una valva; successivamente ciascuna cellula riforma la valva mancante.

La specie, insieme alla specie affine *S. costatum*, è comune nel Mar Adriatico dove, a fine inverno inverno, è responsabile del massimo annuale di biomassa fitoplanctonica. Durante le fioriture invernali sono stati riscontrati nei copepodi tassi di riproduzione estremamente bassi, a causa della produzione di aldeidi che interferiscono con il normale sviluppo delle uova (Ianora et al. 2004, citato come *S. costatum*).

6. SCOPO DELLA TESI

Gli erbicidi sono fra le sostanze più frequentemente riscontrate sia nelle acque superficiali che in quelle sotterranee dell'area Padana. Tra i vari composti identificati, i più abbondanti sono rappresentati da alcuni erbicidi triazinici, come atrazina, terbutilazina, insieme ad alcuni prodotti di degradazione, come la desetilterbutilazina, e dal metolachlor,. Le concentrazioni di questi composti sono spesso superiori al limite fissato per le acque potabili, e attraverso i corsi d'acqua, in particolare il Po, raggiungono le acque del mar Adriatico.

L'esposizione delle microalghe a questi erbicidi può avere effetti che si ripercuotono su tutto l'ecosistema: le specie fitoplanctoniche, in particolare le diatomee, sono i produttori primari più importanti dell'ecosistema: questi organismi rivestono un ruolo fondamentale nella fissazione del carbonio, rappresentando il primo anello della catena alimentari degli ambienti acquatici e contribuendo al rifornimento di ossigeno nell'atmosfera.

In questa tesi è stato studiato l'effetto dell'esposizione della diatomea *S. marinoi* agli erbicidi maggiormente utilizzati nella pianura Padana e riscontrati in acque dolci e salmastre di zone limitrofe al mare Adriatico. E' stata scelta una specie molto comune nel Nord Adriatico e importante per il suo annuale contributo alla produzione primaria.

Gli erbicidi scelti consistono in terbutilazina e metolachlor, già noti per avere un effetto di inibizione su vie metaboliche dei vegetali; in aggiunta è stato valutato l'effetto anche di un prodotto di degradazione della terbutilazina, la desetilterbutilazina, anche questo presente in concentrazioni pari al prodotto di origine e su cui non si avevano informazioni circa la tossicità sul fitoplancton. L'effetto di diverse concentrazioni di ciascun composto è stato valutato seguendo l'andamento della crescita e dell'efficienza fotosintetica di *S. marinoi*. Per meglio determinare la sensibilità di questa specie agli erbicidi, l'effetto della terbutilazina è stato valutato anche al variare della temperatura. Infine, dal momento che gli organismi acquatici sono solitamente esposti a una miscela di composti, è stato valutato l'effetto

sinergico di due erbicidi, entrambi somministrati a bassa concentrazione.

7. MATERIALI E METODI

7.1 Preparazione delle colture algali

7.1.1. Preparazione del terreno di coltura

Il mezzo di coltura è costituito da acqua di mare arricchita, ottenuto da acqua marina oligotrofica prelevata in Adriatico filtrata e la successiva aggiunta di nutrienti.

L'acqua di mare è filtrata attraverso un sistema di filtrazione a vuoto, utilizzando filtri GF/C (WHATMAN), dalla maglia di 1,2 μm . Viene così trattenuto il fitoplancton e la maggior parte della materia organica e inorganica particellata.

Viene misurata la salinità dell'acqua di mare attraverso un rifrattometro, e questa viene portata al valore di 35 psu attraverso una formula di correzione:

$$V_i (\text{acqua di mare}) * S_i = V_f (\text{Terreno di coltura}) * S_f$$

V_i = volume di acqua di mare da cui partire

V_f = volume finale di terreno da ottenere

S_i = salinità iniziale

S_f = salinità finale

Con questa formula, ottengo il volume di acqua di mare da portare a volume attraverso la diluizione con acqua deionizzata. L'acqua di mare filtrata e portata al valore di salinità prescelto viene poi sterilizzata in autoclave con un ciclo a 120°C, per 20 min a 1 atm. A questo punto si prepara il terreno di coltura. Il terreno di coltura di base è il Medium F/2 (Guillard and Ryther, 1962) al quale sono state apportate modifiche per quanto riguarda la concentrazione di N e P, scegliendo concentrazioni 7,6 volte più basse di N e 5 volte più basse di P rispetto a quelle tipiche del terreno F/2 per ricreare una

condizione più vicina a quella del Mare Adriatico, mantenendo il rapporto di Redfield N/P di 16:1.

Il terreno di coltura da noi utilizzato per la crescita di *Skeletonema marinoi* è fN/15,2 P/10, ottenuto aggiungendo all'acqua di mare sterilizzata i nutrienti in piccoli volumi prelevandoli da soluzioni stock sterili, sotto cappa sterile.

NUTRIENTI	SOLUZIONI MADRI	AGGIUNTA (ml)	CONCENTRAZIONE FINALE (M)
<u>Macronutrienti</u>			
NaNO ₃	7,5 g / 100 ml	0,1315	8,82·10 ⁻⁴
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,5 g / 100 ml	0,2	3,62·10 ⁻⁵
Na ₂ SiO ₃ ·H ₂ O *	15,3 g / 100 ml	2,5-3	1,066-2,13·10 ⁻⁴
<u>Micronutrienti</u>			
Na ₂ ·EDTA	4,36 g / 900 ml	1	1,17·10 ⁻⁵
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,15 g / 900 ml	1	1,17·10 ⁻⁵
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,98 g / 100 ml	1	3,93·10 ⁻⁵
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,20 g / 100 ml	1	7,65·10 ⁻⁸
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,00 g / 100 ml	1	4,20·10 ⁻⁸
MnCl ₂ ·4H ₂ O	18,00 g / 100 ml	1	9,10·10 ⁻⁷
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,63 g / 100 ml	1	2,60·10 ⁻⁸
Na ₂ SeO ₃	1,73 mg / 100 ml	0,08	1·10 ⁻⁸
<u>Vitamine</u>			
Tiamina HCl	20 mg	0,5	2,96·10 ⁻⁷
Biotina	10 mg / 96 ml 1 ml	0,5	2,05·10 ⁻⁹
B ₁₂	10 mg / 8,9 ml 0,1 ml	0,5	3,69·10 ⁻¹⁰
<u>Soluzione tampone</u>			
HEPES	23 g / 100 ml	1	9,58·10 ⁻⁴

Fig 7.1 Composizione standard del terreno N/15,2 P/10

I silicati vengono aggiunti al terreno di coltura solo se si utilizzano specie algali che li necessitano, come la diatomea *Skeletonema marinoi*. Il terreno di coltura viene diviso in aliquote da 200 ml in 6 beute opportunamente sterilizzate.

7.1.2. Preparazione delle soluzioni degli erbicidi usati

Sono state preparate le soluzioni madre pesando 10mg di ciascun erbicida e sciogliendoli in 10mL di Metanolo. Sono state fatte successivamente delle diluizioni, sempre in metanolo, in modo da avere concentrazioni finali di 2 - 1 e 0,5 mg/L, con lo scopo di limitare la quantità di metanolo da aggiungere nelle colture.

a. Aggiunta di erbicida:

Dopo aver preparato le 6 beute contenenti il terreno di coltura, a 5 di queste vengono aggiunte opportune quantità di erbicida terbutilazina in modo da ottenere le seguenti concentrazioni finali:

Terbutilazina	Metanolo aggiunto
controllo	-
TBZ 1 µg/L	< 0,0001%
TBZ 5 µg/L	< 0,0001%
TBZ 10 µg/L	< 0,0001%
TBZ 20 µg/L	< 0,0001%
TBZ 30 µg/L	< 0,0001%

Desetilterbutilazina	Metanolo aggiunto
Controllo	-
Controllo + metanolo	0,006 %
D-TBZ 1 µg/L	0,001%
D-TBZ 5 µg/L	0,002%
D-TBZ 10 µg/L	0,003%
D-TBZ 20 µg/L	0,004%
D-TBZ 30 µg/L	0,006 %

Metolachlor	Metanolo aggiunto
Controllo	-
Controllo + metanolo	0,002 %
MTC 1 µg/L	0,001%
MTC 5 µg/L	0,001%
MTC 10 µg/L	0,001%
MTC 20 µg/L	0,002%
MTC 30 µg/L	0,0015%

Metolachlor	+	Metanolo aggiunto
terbutilazina		
Controllo		-
Controllo + metanolo		0,001 %
TBZ + MTC 0,5 + 0,5 µg/L		0,001%
TBZ + MTC 1 + 1 µg/L		0,002%
TBZ + MTC 2,5 + 2,5 µg/L		0,001%
TBZ 2,5 µg/L		0,0005%
MTC 2,5 µg/L		0,0005%

b. Inoculo delle alghe

Viene prelevato 1 ml di coltura algale dalla beuta madre e opportunamente diluito per poter effettuare il conteggio al microscopio. Risalendo alla concentrazione di cellule algali della beuta madre, si calcola quanti ml devono essere prelevati da questa e inoculati in ciascuna beuta per ottenere 6 colture di *Skeletonema marinoi* alla concentrazione di 8000 cellule/ml.

7.2 Valutazione della crescita algale

7.2.1. Conteggio:

Il conteggio delle cellule presenti in un determinato volume d'acqua è uno dei metodi più semplici per stimare la biomassa algale

Ogni giorno viene effettuato da ogni beuta un prelievo di 4 ml di coltura algale, messo in provetta e fissato con 2-3 gocce di una soluzione a base di iodio-ioduro detta Lugol, bloccando la crescita delle alghe.

Da ognuna di queste provette viene prelevato 1ml di coltura algale e posto in una camera di sedimentazione. Dopo aver atteso almeno mezz'ora per consentire la sedimentazione delle cellule, si effettua il conteggio del campione attraverso un microscopio ottico binoculare con ingrandimento 32x.

Si contano le cellule algali presenti all'interno di un reticolo per circa 40 campi lungo un diametro, si calcola la media delle alghe contate in ogni campo e si moltiplica per un fattore (4710), che rappresenta il rapporto tra l'area della camera di sedimentazione (452,12 mm²) e l'area del reticolo (0,096 mm²).

$$\frac{\sum N^{\circ} cell}{N^{\circ} campi} * 4710 = N^{\circ} cell / ml$$

Eventualmente, si moltiplica anche per il fattore di diluizione: se le alghe del nostro campione sono troppo concentrate, vengono opportunamente diluite con il terreno di coltura per permettere un efficiente conteggio, in modo che le cellule presenti nel reticolo non siano più di 60.

7.2.2. Curva di crescita:

I prelievi vengono fatti quotidianamente in modo da seguire la crescita delle microalghe in esame elaborando i dati ottenuti attraverso il conteggio per costruire la curva di crescita che mette in relazione il numero di cellule per millilitro con il tempo.

La curva di crescita delle microalghe è rappresentata da una curva sigmoide, in cui si riconoscono 4 fasi:

- b) Fase lag: periodo di adattamento dell'alga al terreno di coltura subito dopo l'inoculo.
- c) Fase esponenziale: si ha una rapida crescita cellulare con andamento logaritmico. E' rappresentata dal tratto di curva con pendenza maggiore.
- d) Fase stazionaria: il numero di cellule rimane costante, la rapida crescita cellulare è frenata dall'esaurimento dei nutrienti.
- e) Fase di declino: la coltura muore in seguito all'esaurimento dei nutrienti.

7.2.3. Biovolume e Carbonio

Il calcolo del volume cellulare è importante per comprendere le variabilità dimensionali nelle diverse fasi di crescita dell'organismo e le differenze che possono esistere fra i ceppi analizzati in presenza di differenti concentrazioni di erbicida.

La cellula di *Skeletonema marinoi* viene approssimata a un cilindro più due mezze sfere, come descritto da Hillebrand et al. (1996).

Vengono considerate due misure: l'altezza del cilindro e il diametro delle mezze sfere.

Queste misure sono effettuate per mezzo di un programma di lettura di immagine, con fotocamera Nikon integrata al microscopio.

Il procedimento per la preparazione del campione è lo stesso effettuato per il conteggio.

La formula per il calcolo del biovolume è:

$$V = \pi * d^2 * \left(\frac{h}{4} + \frac{d}{6} \right)$$

Dove:

d = diametro del cilindro e delle semisfere

h = altezza del cilindro

Ottenuto il biovolume, si può calcolare la quantità di Carbonio espressa in picogrammi attraverso questa formula:

$$C = 0,42 * V^{0,85}$$

7.2.4. Analisi della torbidità

L'analisi dell'assorbanza allo spettrofotometro, come misura della torbidità, è una misura indiretta della crescita algale, che viene effettuata fin dal giorno 0 per ogni campione.

Come prima cosa, si analizza la assorbanza del bianco, cioè del terreno di coltura, la quale poi verrà sottratta all'assorbanza di ogni successivo campione analizzato per conoscerne l'assorbanza netta.

Queste analisi vengono effettuate alla lunghezza d'onda di 750 nm.

7.2.5. Analisi dell'attività fotosintetica

L'attività fotosintetica delle cellule algali viene misurata attraverso un fluorimetro PAM (Walz, modello 101/102/103 PDA-100).

È un'analisi indiretta dell'attività fotosintetica, perché questa viene misurata attraverso l'analisi della fluorescenza emessa, assumendo che l'energia assorbita dalla clorofilla può avere 3 diversi destini:

1. Utilizzata per la fotosintesi
2. Dissipata come calore
3. Riemessa come fluorescenza, ovvero come fotoni di lunghezza d'onda più alta.

Sulle colture di *S. marinoi* sono state eseguite due tipi di misure, una consistente nella misura del rendimento fotosintetico dopo

adattamento al buio e dopo 5 min di illuminazione con luce attinica e l'altra basata sulla esecuzione delle cosiddette curve di induzione.

7.2.6. Misura del rendimento quantico della fotosintesi al buio e alla luce

Il campione di cellule algali sulle quali si vuole misurare l'attività fotosintetica è prima adattato al buio per 15 – 20 minuti, dopodiché viene sottoposto a diversi tipi di illuminazione e si misura la fluorescenza emessa che induce il tipico effetto Kautsky (Kautsky and Hirsch, 1931) rappresentato nella fig 7.2.

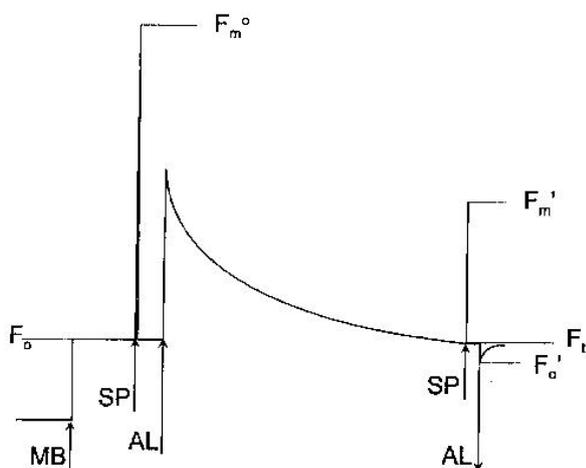


Fig 7.2 fluorescenza emessa dalle microalghe in seguito a diversi tipi di illuminazione

Dapprima si fornisce un impulso luminoso (MB), di intensità pari a $2 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, non sufficiente a stimolare la fotosintesi ma in grado di promuovere un segnale di fluorescenza (F_0), che è il valore minimo di fluorescenza che viene emessa quando tutti i centri di reazione sono aperti (disponibili per la fotosintesi).

Viene poi emessa una luce saturante (SP) ad alta intensità $>2000 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ che riduce tutti gli accettori del fotosistema II, e la fluorescenza emessa raggiunge i valori massimi (F_m), cioè quelli che si ottengono in assenza di fotochimica.

Da questa misura è possibile ottenere il rendimento quantico massimo ovvero:

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

Per valutare lo stato della coltura in esame si misura il valore iniziale dal rapporto F_v / F_m (yield massimo); il valore ottenuto può variare a seconda dello stato fisiologico delle cellule. Un valore attorno a 0,5-0,6 indica che la coltura è in buone condizioni mentre una diminuzione indica uno stato di sofferenza.

Infine viene messa una luce attinica (AL) che permette la fotosintesi: la fluorescenza diminuisce per via del quenching fotochimico fino a raggiungere un valore costante (F_t). Dopo 5 minuti viene dato un altro flash di luce saturante (SP) e si ha la misura della fluorescenza massima del campione alla luce (F_m'), che è più bassa di quella osservata nel campione adattato al buio. Quando si ottiene F_m' il PQA è di nuovo tutto ridotto e la differenza tra F_m' e F_t riflette il quenching della clorofilla dovuto alla fotochimica, mentre la differenza fra F_m e F_m' indica il quenching dovuto alla dissipazione di calore. Dopo il flash la luce attinica viene rimossa e viene somministrata luce rosso

scuro che stimola il PSI e fa ritornare i componenti del trasporto di elettroni allo stato ossidato; questo permette di misurare F_0' .

Da questi dati si possono ottenere (Fig 7.3):

1. **Rendimento quantico massimo** (F_v/F_m , ovvero $(F_m - F_0)/F_m$), che si ha quando tutti i centri di reazione sono aperti.
2. **Rendimento quantico effettivo alla luce** (F_v'/F_m' , ovvero $(F_m' - F_t)/F_m'$, cioè il rendimento quantico del trasferimento di elettroni a livello del foto sistema II, misura il quale proporzione la luce assorbita dalla clorofilla viene utilizzata per la fotochimica.
4. **Quenching fotochimico** ($(F_m' - F_t)/(F_m' - F_0')$), che riflette lo stato redox dell'accettore primario del PSII, ovvero il QA.
5. **Quenching non fotochimico** ($(F_m - F_m')/(F_m - F_0)$), che è l'energia dissipata come calore legata all'energizzazione della membrana dei tilacoidi.

Queste misure sono state eseguite nel corso della crescita delle colture di *S. marinoi*.

7.2.7. Esecuzione delle curve di induzione

Nei giorni in cui il rendimento quantico della fotosintesi presentava i valori più alti, o in giorni precoci di esposizione all'erbicida, sono state eseguite le curve di induzione. Queste consistono nel misurare lo yield massimo dopo adattamento al buio, come nelle misure precedenti, quindi numerosi flash saturanti vengono applicati ad intervalli regolari di 1 min fornendo numerose misure di F_m' .

Un andamento tipico della fluorescenza nel corso dell'esecuzione delle curve di induzione è rappresentato in fig. 7.3.

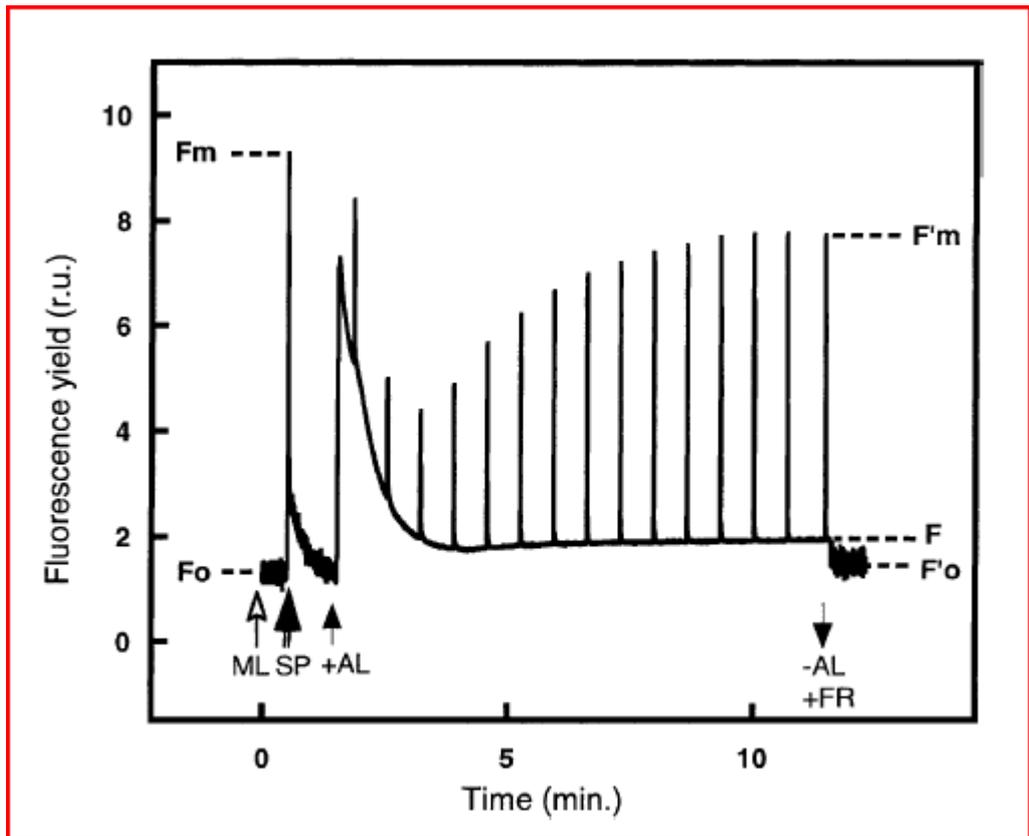


Fig 8.3. Rappresentazione schematica della cinetica di induzione della fluorescenza ottenuta attraverso l'utilizzo del fluorimetro PAM. I differenti tipi di luce usati durante le misurazioni sono indicate come: ML = luce modulata, SP = luce saturante, AL = luce attinica, FR = luce infrarossa; mentre i rendimenti di fluorescenza necessari per calcolare i parametri di fluorescenza sono indicati come: F_0 = fluorescenza costante, F_m = massima fluorescenza emessa al buio, F_m' = massima fluorescenza emessa alla luce, F = livello di fluorescenza in stato stazionario del trasporto di elettroni, F_0' = fluorescenza minima alla luce.

7.2.8. Analisi della clorofilla

Sono prelevati 50 ml di acqua di coltura per tutti i campioni di *Skeletonema marinoi* al giorno 4 di tutti gli esperimenti effettuati e filtrati sottovuoto attraverso un filtro Millipore di cellulosa da 0,45 µm con un diametro di 47 mm, per raccogliere l'alga. Dopo la preparazione i campioni vengono conservati, avvolti in carta stagnola, a -20° per un tempo non superiore ad una settimana. Per effettuare l'analisi è necessaria una soluzione di acetone al 90%, che si ottiene mescolando una piccola dose di Na₂CO₃ anidro all'acetone puro. Si agita vigorosamente la beuta e si lascia decantare finchè tutto il carbonato si deposita sul fondo e la soluzione diventa limpida; a questo punto si filtra il solvente con carta da filtro, si pone il cilindro graduato e lo si diluisce con acqua distillata, così da ottenere la soluzione di acetone al 90%. Dopo questa fase di preparazione si può procedere all'analisi della clorofilla. Il filtro, precedentemente congelato, viene posto in una provetta con 10 ml di soluzione acetonica al 90%; la provetta viene agitata vigorosamente su un vortex per ottenere la completa dissoluzione del filtro. Il campione viene incubato al buio per 20 ore a 4°C effettuando, dopo la prima ora, una seconda agitazione con il vortex. Al termine del periodo di incubazione il campione va acclimatato al buio a temperatura ambiente per 15 minuti. Si aggiungono altri 5 ml di soluzione acetonica al 90% e si agita nuovamente. A questo punto i campioni vengono centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti ad una temperatura di 20°C, al termine vengono tenuti i soprannatanti. Si procede con l'analisi utilizzando uno spettrofotometro UV/VIS Jasco 7800. Si riempiono due cuvette con la soluzione acetonica al 90% e si effettua l'autozero, alle lunghezze d'onda di 665 nm e 750 nm, per la misura del bianco (b); a questo punto riempiendo la cuvetta anteriore con il campione (c) si effettuano le due letture a 665 nm e a 750 nm rispetto al bianco.

La concentrazione di clorofilla a, espressa in mg/m³, viene infine calcolata con la seguente formula:

$$Chla = 11.9 * ABS_{665} * \frac{V}{V_f * L}$$

Dove ABS₆₆₅ è l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 665 nm, la variabile V rappresenta i millilitri di soluzione actnica (15 ml), V_f è il volume di acqua di coltura filtrato, espresso in litri (100 ml = 0,1L) e L è il cammino ottico della cuvetta (nel nostro caso 1 cm).

Nella formula precedente ABS₆₆₅ viene calcolato come:

$$ABS_{665} = (ABS_{665c} - ABS_{665b}) - (ABS_{750c} - ABS_{750b})$$

Dove c corrisponde al campione esaminato e b al bianco nel caso in cui non venga effettuato l'auto-zero.

8. RISULTATI

8.1 Effetto degli erbicidi sulla crescita di *S. marinoi*

La crescita di *Skeletonema marinoi* in coltura è stata valutata sia effettuando conteggi delle cellule al microscopio, a intervalli regolari per tutto il periodo degli esperimenti, sia effettuando misure di torbidità della coltura. Nel primo caso i risultati sono stati rappresentati in grafici in cui nell'asse delle ascisse è riportato il tempo di crescita e nell'asse delle ordinate il numero di cellule per millilitro di coltura; nel secondo caso in ordinata sono riportati i valori di assorbanza a 750 nm.

In queste curve è possibile riconoscere le differenti fasi di crescita delle microalghe: nei primi giorni si osserva il periodo di adattamento delle cellule al nuovo mezzo di coltura (fase lag), nei successivi giorni le cellule hanno una crescita esponenziale fino a raggiungere la fase stazionaria.

Di seguito sono riportate le due curve di crescita (per numero di cellule e assorbanza) per ogni trattamento di *Skeletonema marinoi*, raggruppate in funzione dell'erbicida a cui la diatomea è stata esposta. Per l'erbicida terbutilazina le alghe sono state fatte crescere a 3 diverse temperature (15, 20, 25°C) .

8.1.1. Esposizione a Terbutilazina

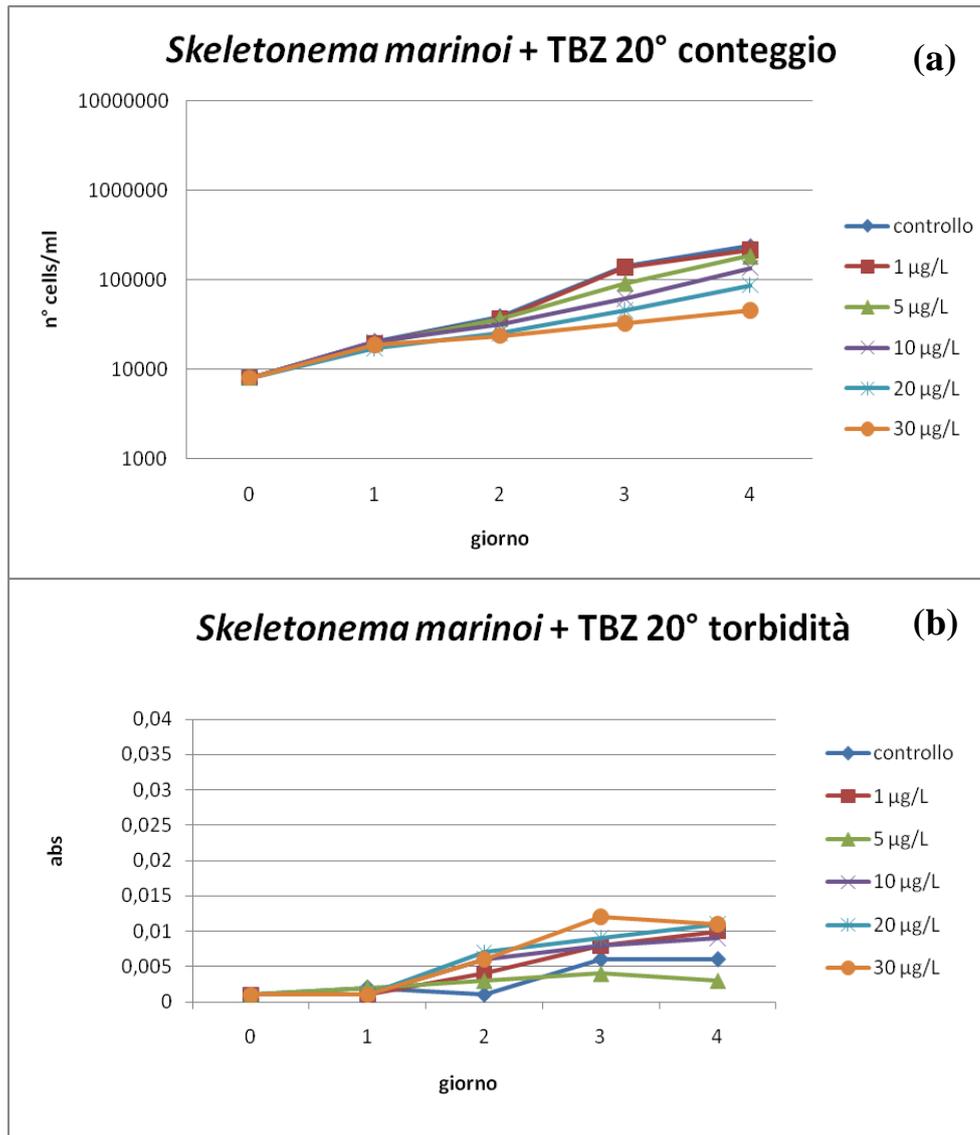


Fig 8.1: Curve di crescita di *Skeletonema marinoi* a 20°C in presenza di concentrazioni crescenti di terbutilazina. a) numero di cellule per ml; b) assorbanza a 750 nm.

I grafici mostrati in figura 8.1 a e b mostrano la crescita di *Skeletonema marinoi* e l'assorbanza della coltura in seguito all'esposizione a terbutilazina, somministrata in 5 diverse concentrazioni alla temperatura di 20°. Questa è la temperatura alla quale sono stati condotti tutti gli altri esperimenti descritti in seguito, nei quali *S. marinoi* è stata esposta ad altri erbicidi.

Osservando il grafico in figura 8.1 a, si nota come la crescita di *S. marinoi* abbia fin dal primo giorno di esposizione una correlazione negativa con la concentrazione di terbutilazina; già al giorno 4 il numero di cellule per ml della coltura di controllo di *S. marinoi* è di un ordine di grandezza maggiore rispetto al trattamento eseguito con la maggior concentrazione di terbutilazina (30 µg/L); alle concentrazioni di 5 µg/L e 10 µg/L si hanno invece densità algali intermedie.

Il grafico in figura 8.1 b mostra invece i valori di assorbanza relativi a *S. marinoi* esposta alle diverse concentrazioni di terbutilazina, come misura indiretta della crescita algale. I valori ottenuti in seguito all'analisi spettrofotometrica dell'assorbanza non forniscono però informazioni attendibili sulla crescita algale, in particolare nei primi giorni dell'esperimento; infatti non c'è sempre corrispondenza con la crescita in quanto questo tipo di misura è più impreciso in quanto influenzato dall'interferenza dell'erbicida alle concentrazioni più elevate: l'assorbanza è più alta quando l'erbicida è a più alta concentrazione e le alghe non sono ancora cresciute. Solo con il passare dei giorni, quando la coltura comincia a crescere, questo effetto si riduce, poiché prevale l'assorbanza data dall'aumento della densità algale rispetto a quella dell'erbicida.

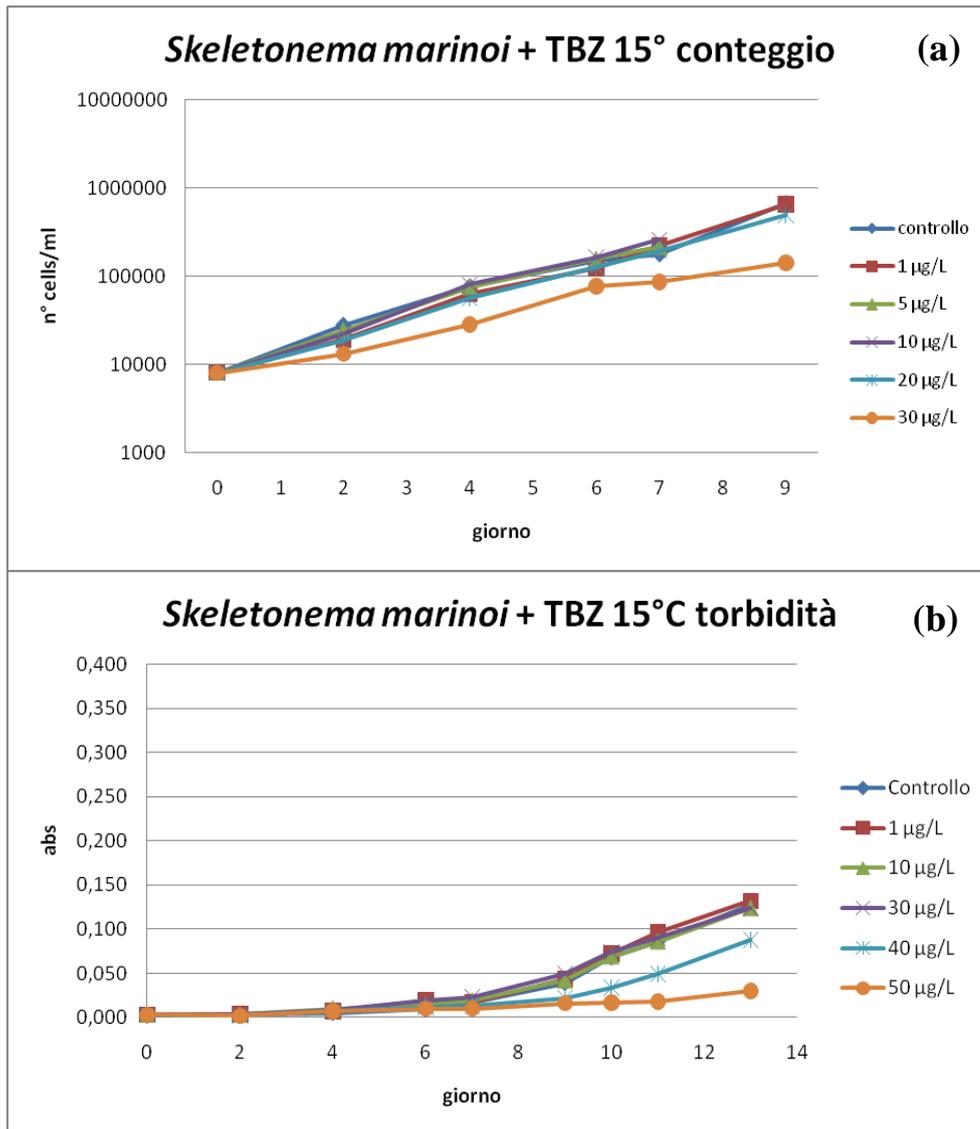


Fig 8.2: Curve di crescita di *Skeletonema marinoi* a 15°C in presenza di concentrazioni crescenti di terbutilazina. a) numero di cellule per ml; b) assorbanza a 750 nm.

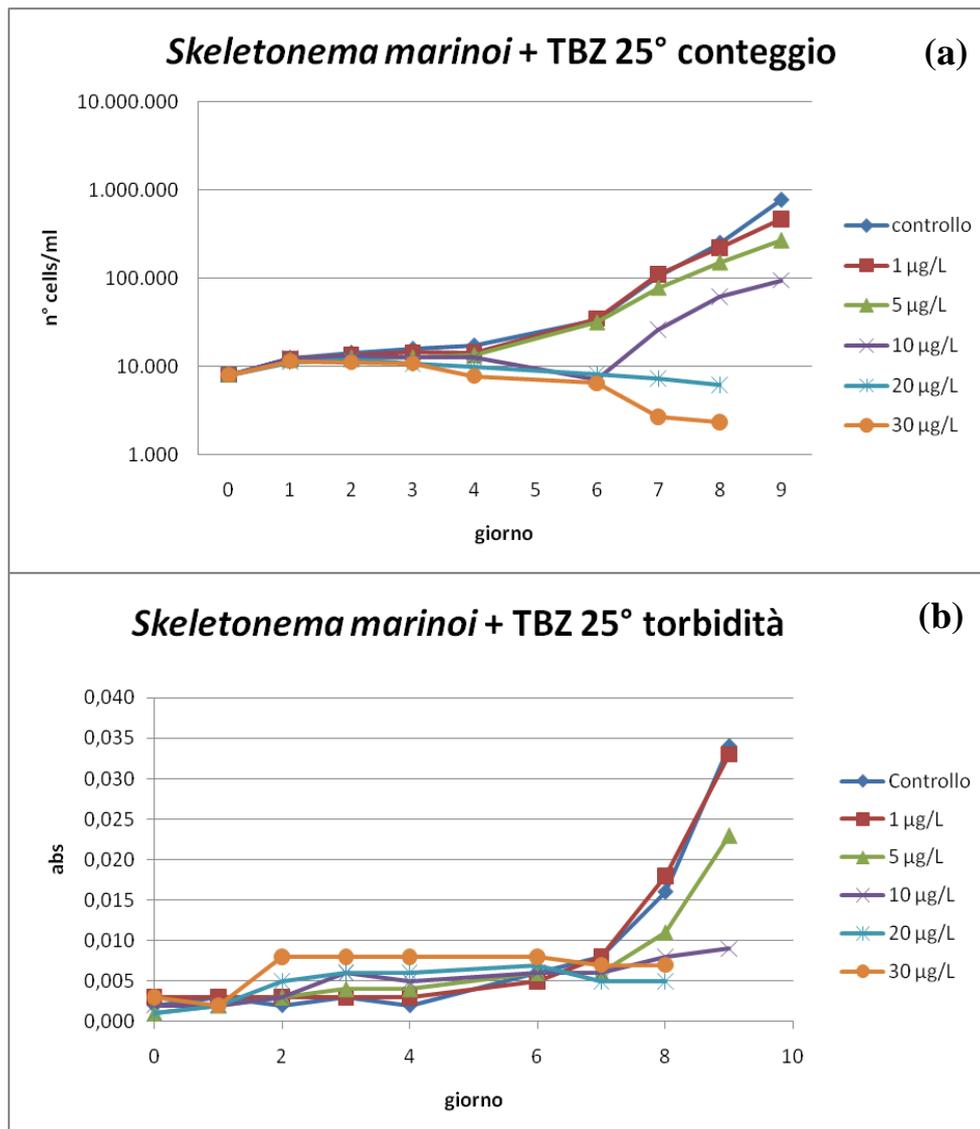


Fig 8.3: Curve di crescita di *Skeletonema marinoi* a 25°C in presenza di concentrazioni crescenti di terbutilazina. a) numero di cellule per ml; b) assorbanza a 750 nm.

Mettendo a confronto i valori di crescita ottenuti con il passare dei giorni nei 3 esperimenti condotti alle 3 temperature si può notare come alla temperatura di 15° (Fig. 8.2 a) la crescita risulti essere rallentata rispetto al controllo, in quanto le colture impiegano 7 giorni per raggiungere lo stesso numero di cellule presenti al giorno 4 nelle colture senza erbicida. Alla temperatura di 25° (Fig. 8.3 a) si può notare la necessità di un periodo di acclimatazione di circa 4-6 giorni in cui le colture non presentano crescita. Le condizioni ottimali per

Skeletonema marinoi risultano essere quelle alla temperatura di 20°C, dove la microalga presenta una crescita più rapida, tuttavia anche nelle colture cresciute a temperature diverse *S. marinoi* mantiene la capacità di raggiungere numeri di cellule dello stesso ordine di grandezza di quelli ottenuti a 20°C.

Osservando i grafici, si nota la correlazione negativa tra la crescita di *Skeletonema marinoi* e la concentrazione di terbutilazina alle 3 temperature (Fig. 8.1 a, 8.2 a, 8.3 a). In particolare, si nota una drastica inibizione della crescita in seguito all'esposizione alla concentrazione di 30 µg/L di erbicida, fin dal primo giorno dell'esperimento, mentre la correlazione tra le concentrazioni più basse di terbutilazina (1, 5, 10 e 20 µg/L) e l'inibizione della crescita algale si manifesta in maniera sempre più marcata con il passare dei giorni.

Un'ulteriore conferma sono i dati ottenuti attraverso l'analisi spettrofotometrica dell'assorbanza come misura della torbidità (Fig. 8.1 b, 8.2 b, 8.3 b). La torbidità, mostra infatti un aumento solo dopo almeno 5 giorni dall'inizio degli esperimenti a 15° (Fig 8.2 b) e a 25° (Fig 8.3 b), presentando, come detto prima, una correlazione positiva con la crescita algale solo dopo il raggiungimento di una certa densità cellulare.

Questi risultati sono confermati da diversi studi che dimostrano come le diatomee, come tutti gli altri organismi, siano influenzati dalla temperatura ambientale. Lo studio condotto da Montagnes et al. (2001) ad esempio fornisce prove sugli effetti del cambiamento di temperatura sulle dimensioni, biomassa e tasso di crescita delle diatomee, attraverso la stima di tre parametri biologici:

1. la diminuzione delle dimensioni all'aumentare della temperatura (Atkinson 1994).
2. il tasso di crescita, che segue un risposta Q_{10} : in tutti i casi si è verificato un aumento del tasso di crescita specifico all'aumentare della temperatura.

3. le differenze nel rapporto Carbonio : Volume (C : V) tra le diatomee e altre specie fitoplanctoniche (Strathmann 1967) . Nonostante il volume cellulare delle diatomee possa variare con la temperatura, il contenuto di Carbonio cellulare può rimanere inalterato, quindi questo rapporto non rimane costante (Durbin 1977, Raven and Geider 1988). Per 5 delle 8 specie di diatomee studiate, si è verificata una significativa diminuzione del volume cellulare all'aumentare della temperatura. Per *Coscinodiscus* sp. invece, il volume cellulare aumentava all'aumentare della temperatura.

8.1.2 Esposizione a Desetilterbutilazina

Di seguito è riportata la curva di crescita di *Skeletonema marinoi* al trattamento con il prodotto di degradazione della terbutilazina, la desetilterbutilazina.

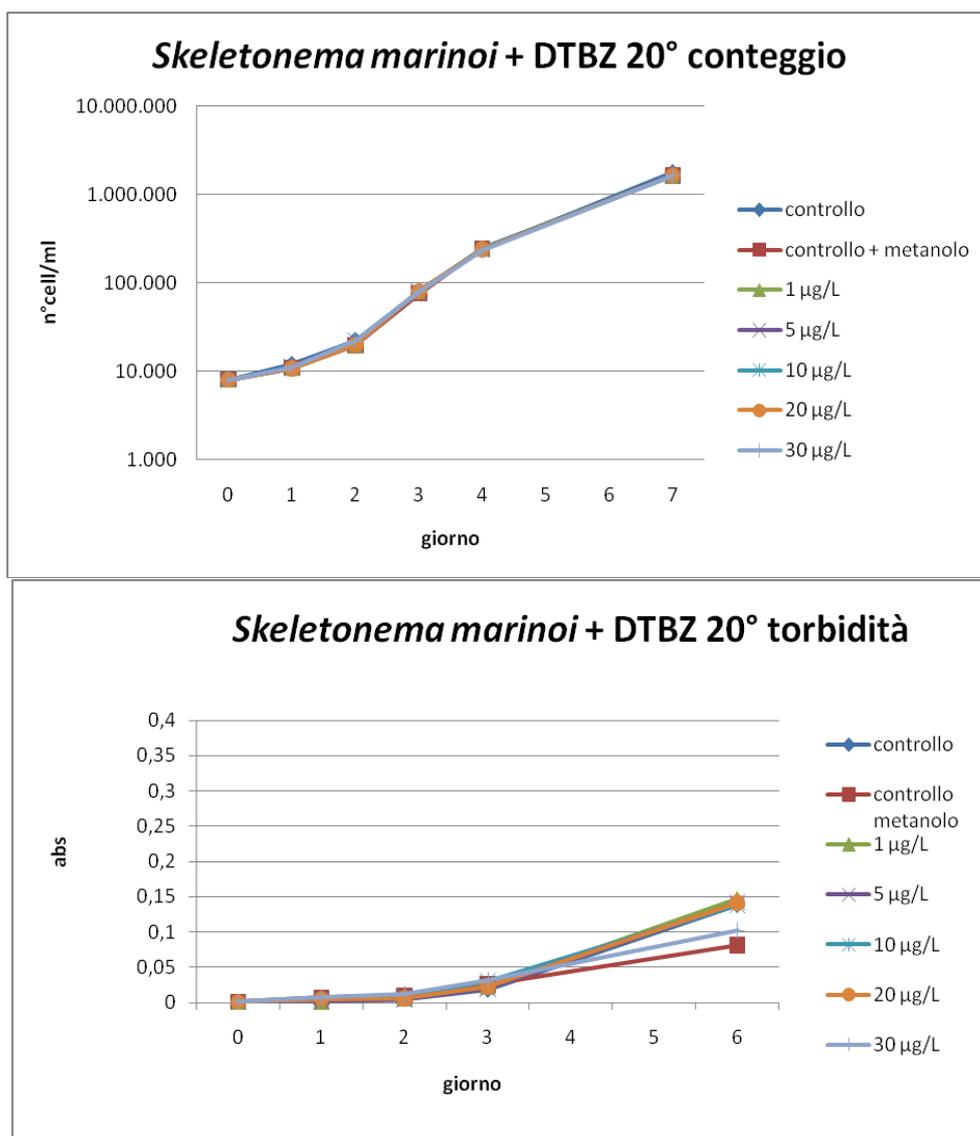


Fig 8.4: Curve di crescita di *Skeletonema marinoi* a 20°C in presenza di concentrazioni crescenti di desetilterbutilazina. a) numero di cellule per ml; b) assorbanza a 750 nm.

.Come si può notare chiaramente osservando il grafico, non c'è alcuna correlazione negativa tra la crescita di *Skeletonema marinoi* e la

concentrazione di desetilterbutilazina; il prodotto di degradazione della terbutilazina è quindi privo di effetti sulla crescita di *S. marinoi*. Per quanto riguarda l'andamento della crescita valutato come assorbanza, osservando la fig. 8.4 b, si può osservare un effetto di inibizione alla concentrazione maggiore di DTBZ e nel controllo + metanolo; entrambi gli effetti sono probabilmente dovuti alla concentrazione simile di metanolo presente nei due campioni.

A differenza della desetilterbutilazina, la desetilatrazina, il principale metabolita dell'atrazina, ha mostrato una tossicità leggermente inferiore dell'atrazina, come ha dimostrato lo studio di De Lorenzo et al. (1998). Come già detto nel capitolo dedicato agli effetti degli erbicidi sulle microalghe, gli effetti dell'atrazina e del suo metabolita risultano molto simili. La capacità fotosintetica è fortemente inibita dopo 24 ore di esposizione sia all'atrazina che alla deetilatrazina; anche la clorofilla a e l'assimilazione fototrofica del carbonio risultano fortemente ridotte rispetto ai controlli ad entrambe le concentrazioni di erbicida e del suo metabolita.

8.1.3 Esposizione a Metolachlor

Di seguito è riportato l'andamento della crescita di *Skeletonema marinoi* in seguito al trattamento con metolachlor a 20°C.

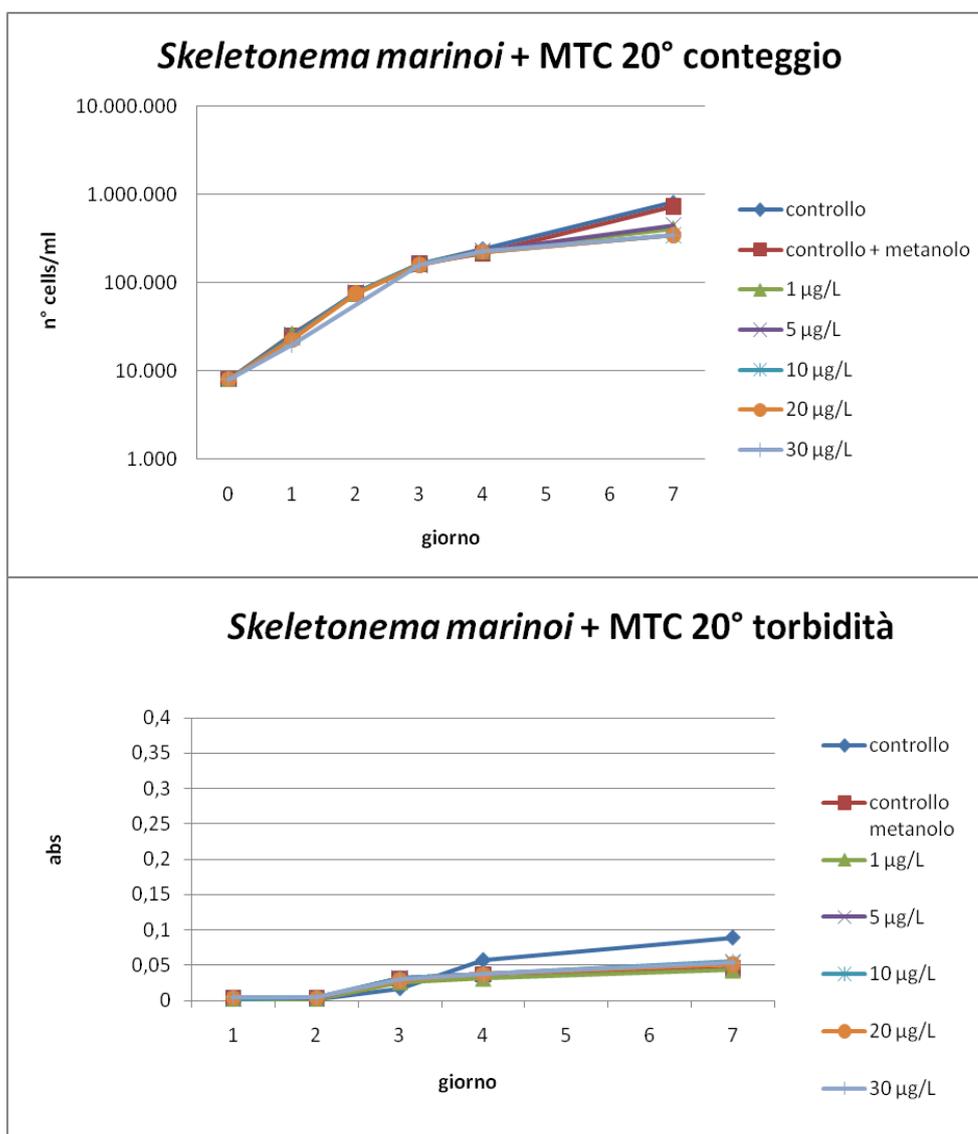


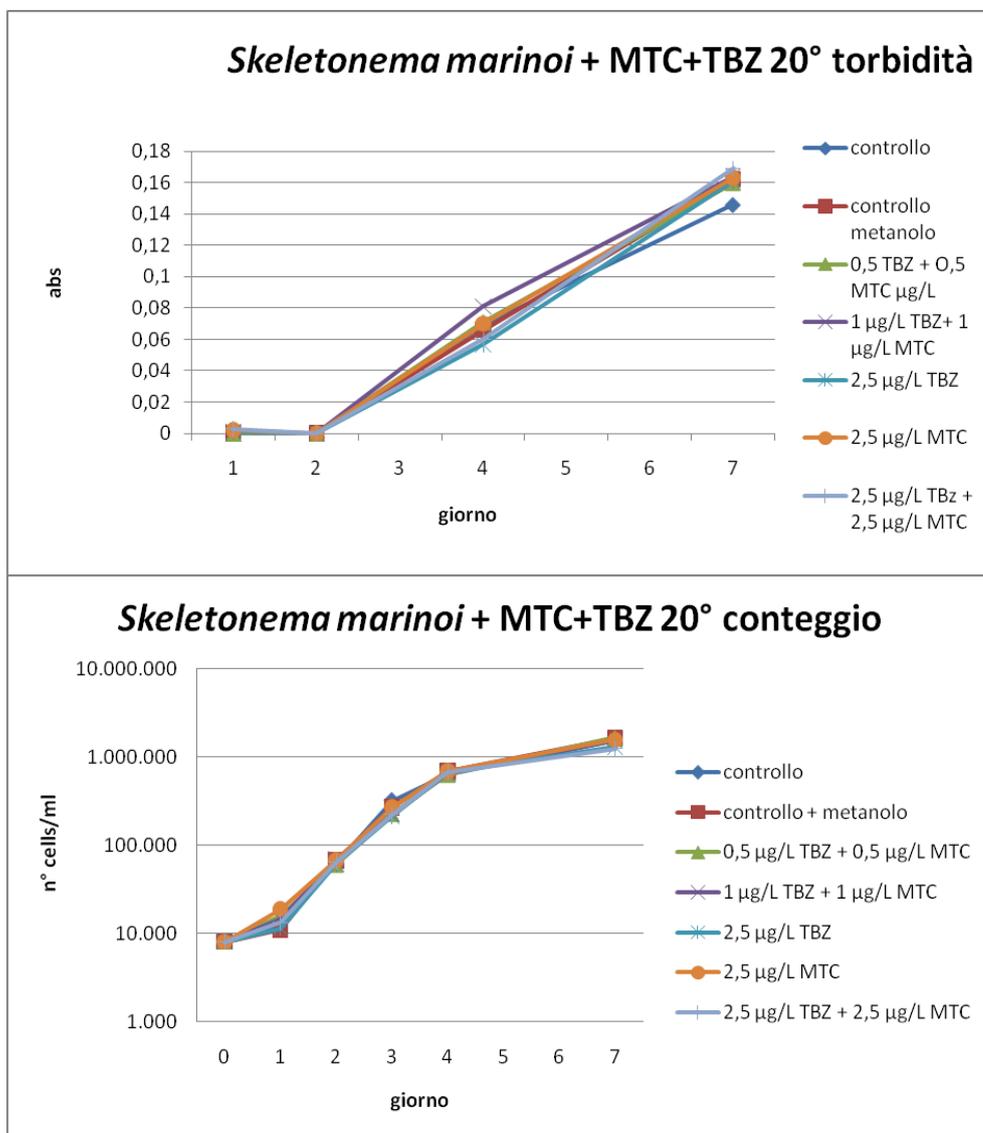
Fig 8.5: Curve di crescita di *Skeletonema marinoi* a 20°C in presenza di concentrazioni crescenti di metolachlor. a) numero di cellule per ml; b) assorbanza a 750 nm.

Osservando il grafico in Fig 8.5, si nota come *Skeletonema marinoi* sia molto meno suscettibile all'esposizione a metolachlor rispetto al trattamento con terbutilazina a 20°. La crescita risulta essere più rapida e regolare in tutti i trattamenti e la correlazione

negativa tra la crescita di *S. marinoi* e la concentrazione di metolachlor è molto più bassa. L'esposizione a metolachlor dimostra quindi una influenza negativa ma molto meno severa sulla crescita di *S. marinoi* rispetto a terbutilazina, come confermato dall'analisi spettrofotometrica dell'assorbanza riportata in Fig. 8.5 b.

8.1.4 Esposizione a Terbutilazina + metolachlor

Di seguito sono riportate le curve di crescita di *S. marinoi* al trattamento con terbutilazina e metolachlor.



8.6: Curve di crescita di *Skeletonema marinoi* a 20°C in presenza di concentrazioni di terbutilazina, metolachlor e terbutilazina + metolachlor. a) numero di cellule per ml; b) assorbanza a 750 nm.

Con questo esperimento si è voluto vedere l'effetto della presenza contemporanea di due erbicidi diversi, precedentemente saggiati singolarmente (terbutilazina e metolachlor). I due composti sono stati aggiunti alle colture in quantità paragonabili a quelle rilevate

nell'ambiente e che da sole non avevano dato alcun effetto di inibizione sulla crescita. I risultati evidenziano che non c'è nessun effetto sinergico delle due sostanze anche quando la somma delle loro concentrazioni è uguale a 5 µg/L, ovvero la concentrazione a cui si cominciano a vedere effetti di inibizione della TBZ sulla crescita.

8.2 Effetto degli erbicidi sull'efficienza fotosintetica di *S. marinoi*

Di seguito sono riportati i grafici relativi al rendimento quantico massimo, misurato dopo adattamento delle alghe al buio, al rendimento quantico effettivo misurato dopo esposizione alla luce, e le curve di induzione.

Queste misure sono state fatte sulle stesse colture di *Skeletonema marinoi*, cresciute in condizioni standard o in seguito a trattamento con erbicidi, su cui è stata valutata la crescita.

8.2.1. Esposizione a Terbutilazina

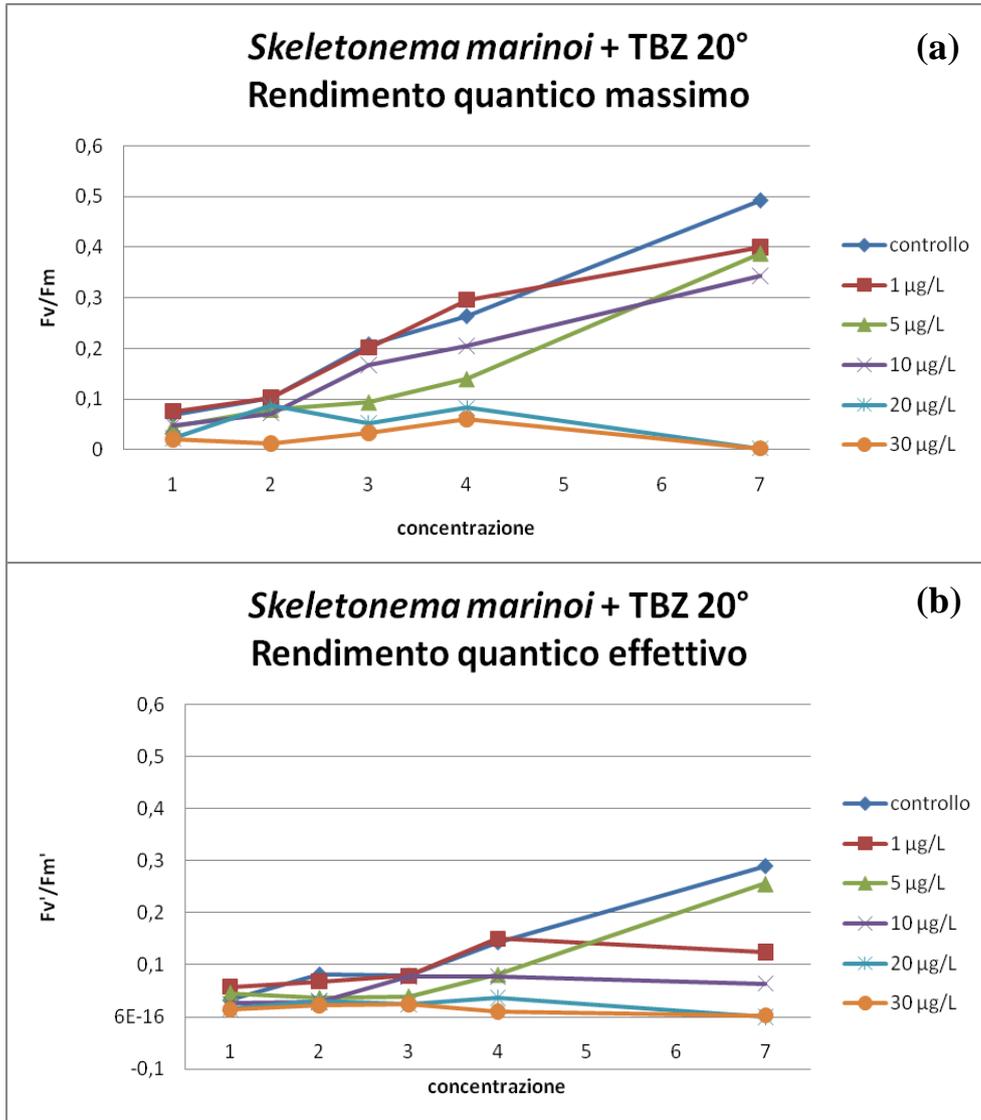


Fig 8.7: Rendimento quantico della fotosintesi nei giorni di esposizione di *Skeletonema marinoi* a diverse concentrazioni di terbutilazina a 20°C, misurato dopo adattamento al buio (Fig 8.7 a) e in seguito a esposizione a luce attinica (Fig 8.7 b).

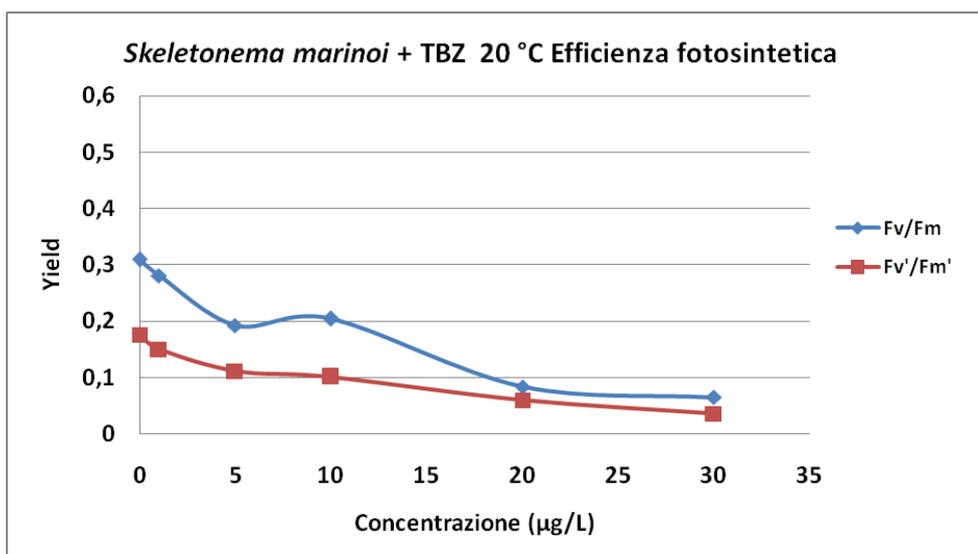


Fig 8.8: Rendimento quantico della fotosintesi in Skeletonema marinoi esposta a terbutilazina a 20°C, misurato dopo adattamento al buio (F_v/F_m) e dopo esposizione a luce attinica (F_v'/F_m') nel giorno 4 di crescita.

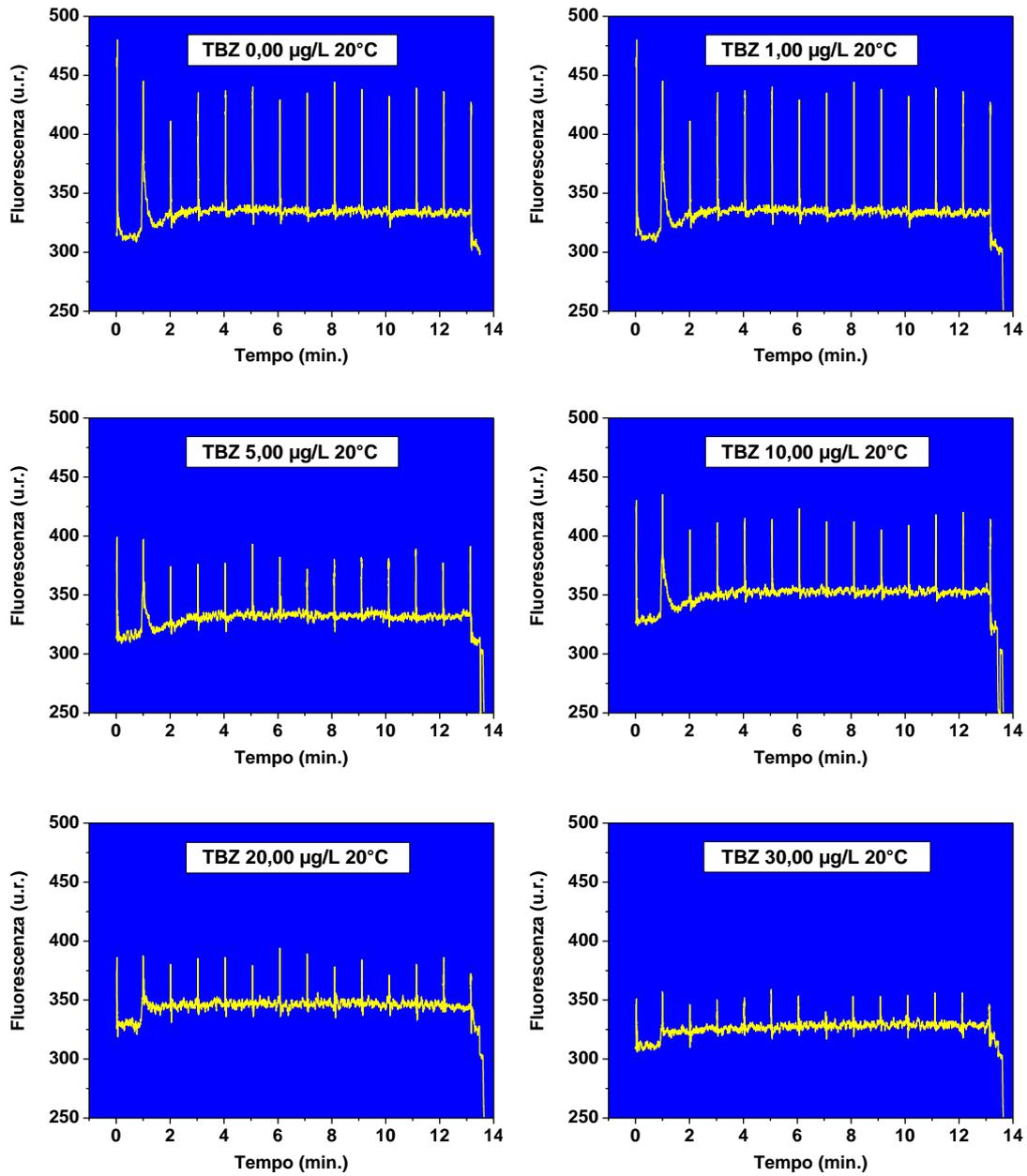


Fig 8.9: Curve di Induzione di *Skeletonema marinoi* esposta a terbutilazina a 20°C.

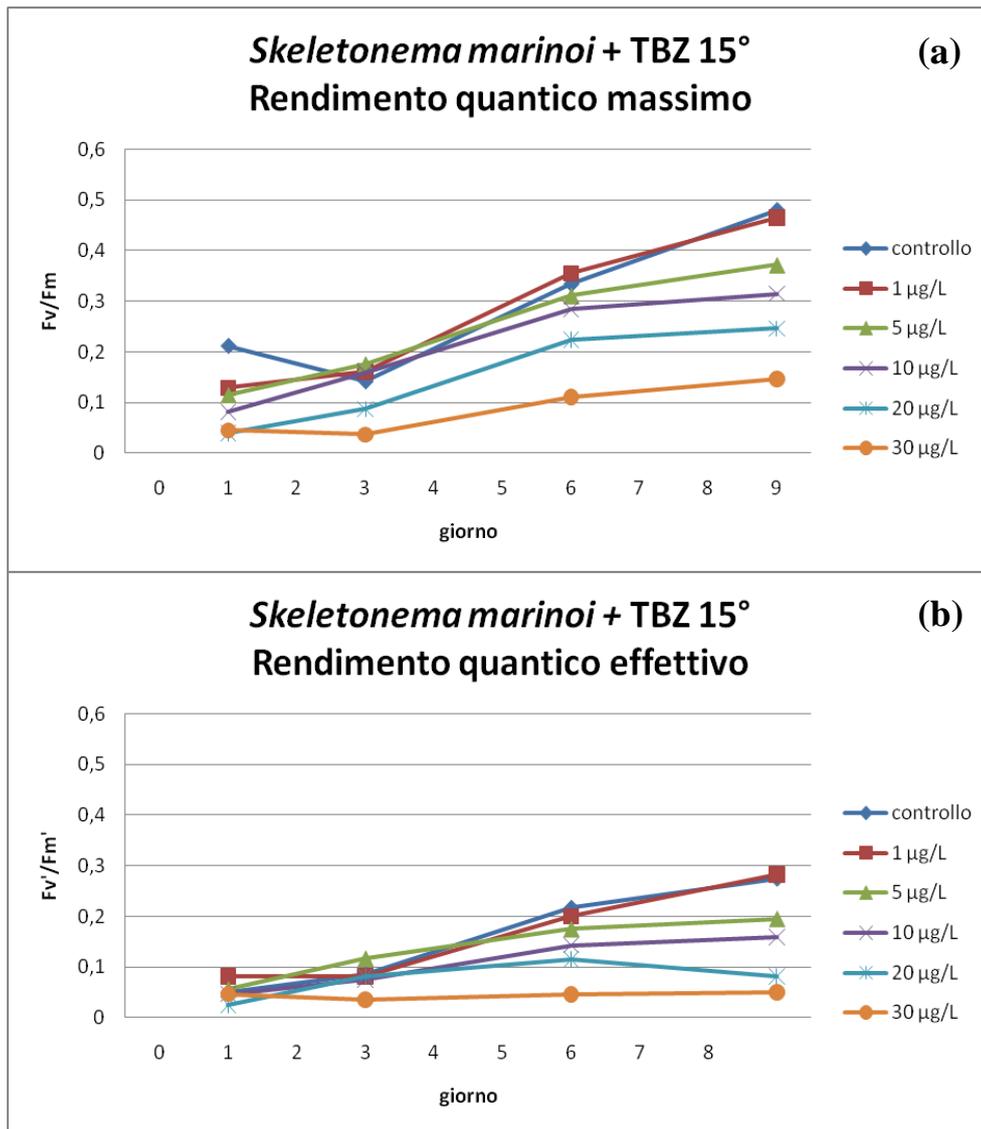


Fig 8.10: Rendimento quantico della fotosintesi nei giorni di esposizione di *Skeletonema marinoi* a diverse concentrazioni di terbutilazina a 15°C, misurato dopo adattamento al buio (Fig 8.10 a) e in seguito a esposizione a luce attinica (Fig 8.10 b).

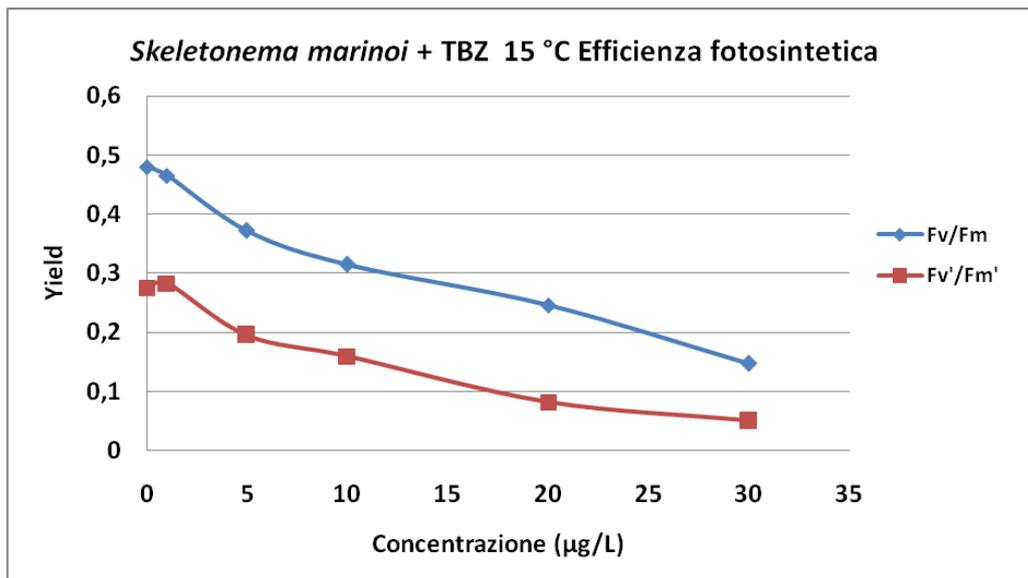


Fig 8.11: Rendimento quantico della fotosintesi in Skeletonema marinoi esposta a terbutilazina a 15°C, misurato dopo adattamento al buio (Fv/Fm) e dopo esposizione a luce attinica (Fv'/Fm') al giorno 9 di crescita

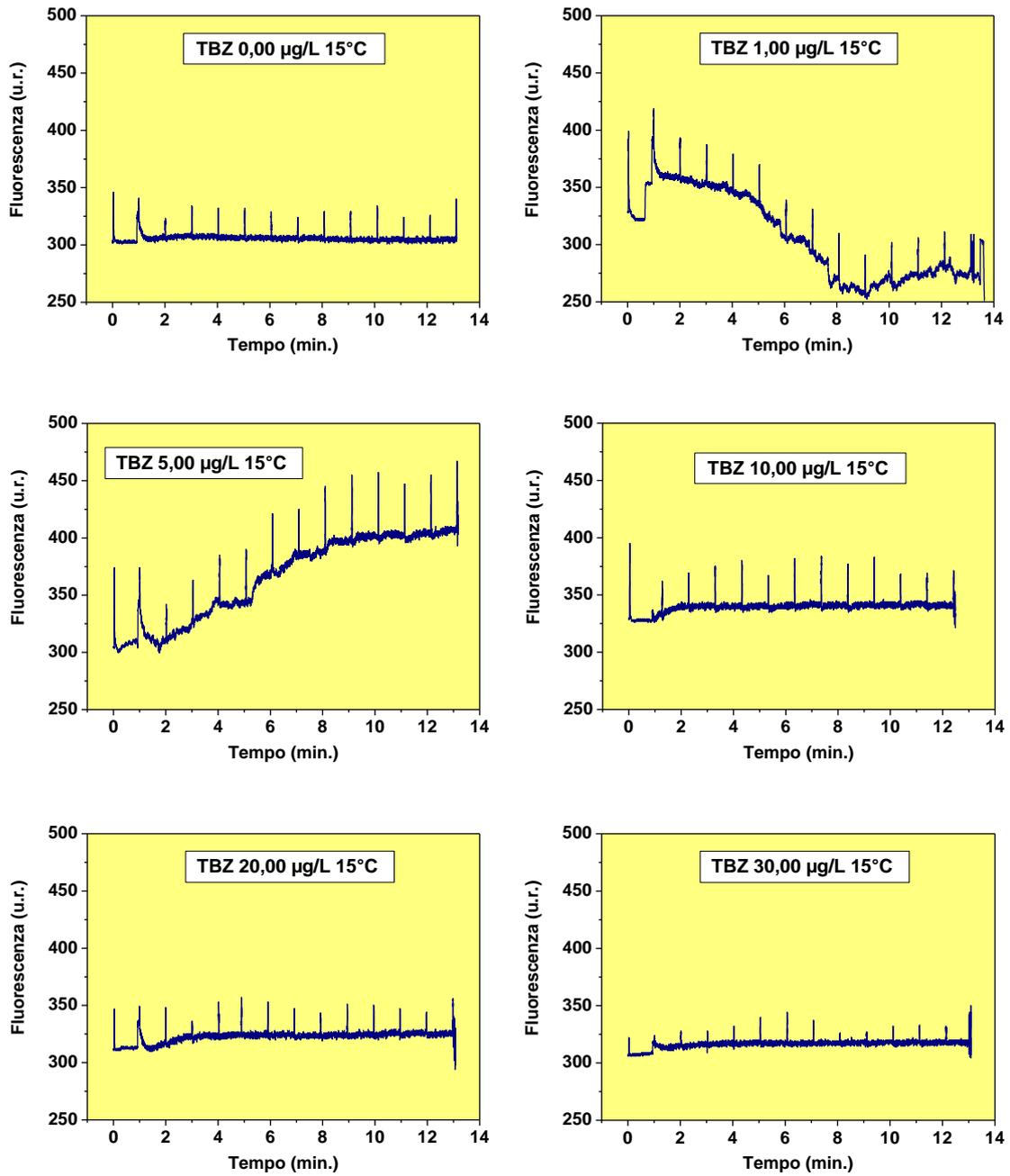


Fig 8.12: Curve di Induzione di *Skeletonema marinoi* esposta a terbutilazina a 15°C.

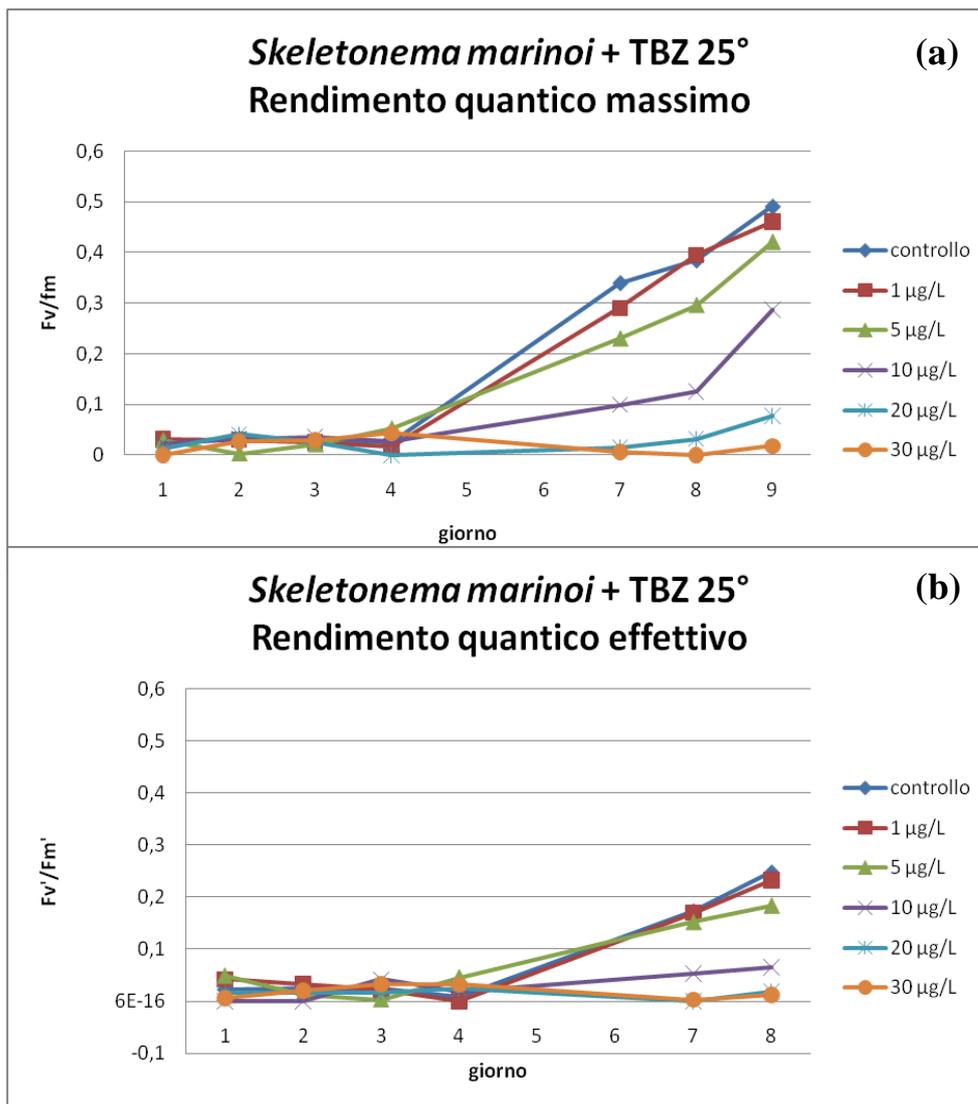


Fig. 8.13: Rendimento quantico della fotosintesi nei giorni di esposizione di *Skeletonema marinoi* a diverse concentrazioni di terbutilazina a 25°C, misurato dopo adattamento al buio (Fig 8.13 a) e in seguito a esposizione a luce attinica (Fig 8.13 b).

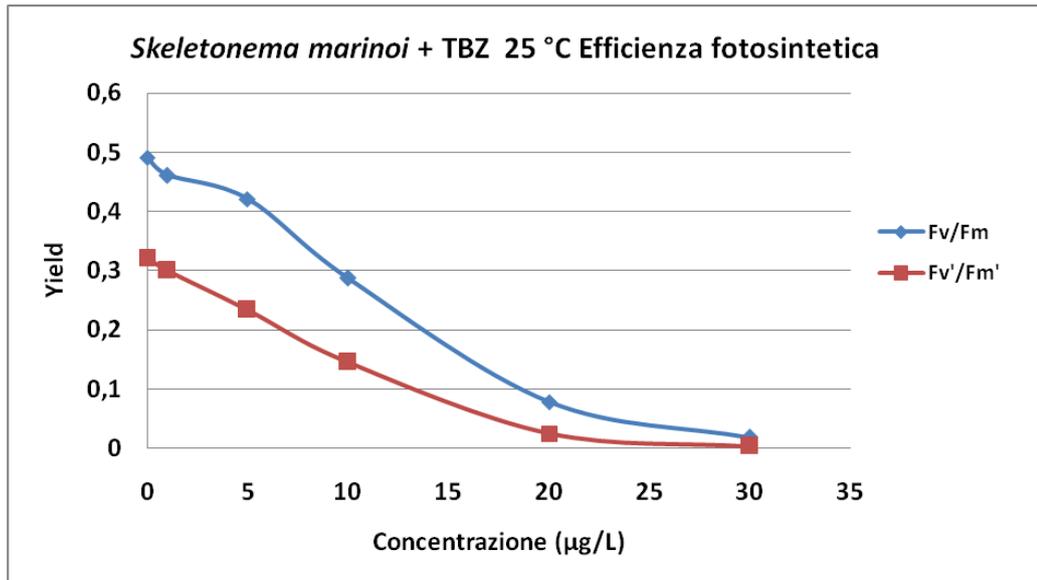


Fig 8.14: Rendimento quantico della fotosintesi in *Skeletonema marinoi* esposta a terbutilazina a 25°C, misurato dopo adattamento al buio (F_v/F_m) e dopo esposizione a luce attinica (F_v'/F_m') al giorno 9 di crescita

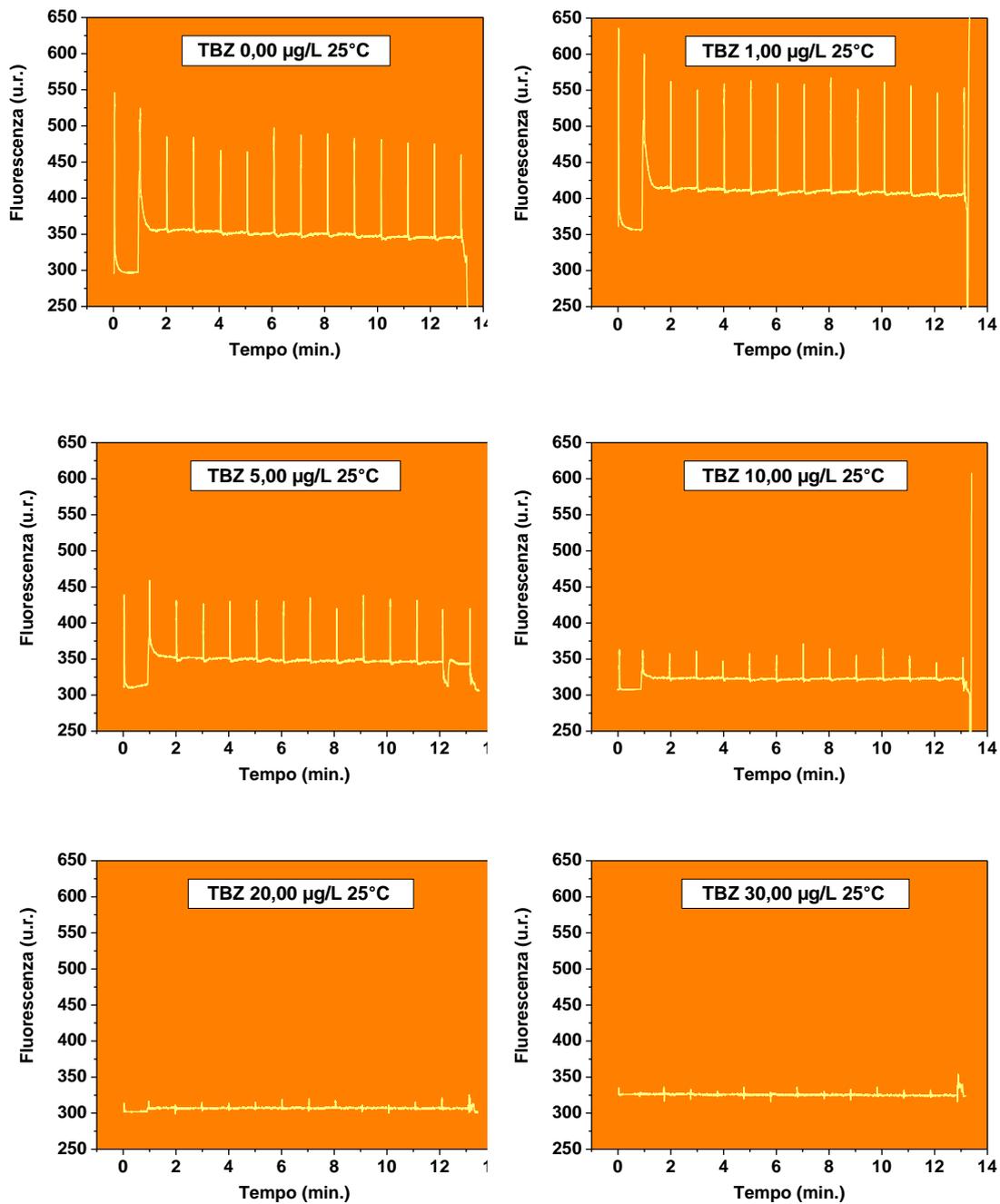


Fig 8.15: Curve di Induzione di *Skeletonema marinoi* esposta a terbutilazina a 25°C.

Il rendimento quantico della fotosintesi, sia massimo che effettivo, cresce all'aumentare della crescita algale in quanto nei primi giorni dopo il trasferimento nel nuovo terreno le cellule sono stressate e molto probabilmente fotoinibite. Il rendimento quantico effettivo è sempre più basso di quello massimo, ottenuto dopo adattamento al buio, in quanto in presenza di luce, con l'avvio della fotosintesi e della fotochimica si ha una diminuzione della fluorescenza.

A tutte e tre le temperature (15°, 20° e 25°C), sia al buio che alla luce, come per la crescita algale, si riscontra una correlazione negativa tra la concentrazione di erbicida e l'efficienza fotosintetica di *S. marinoi*. Come già osservato per la crescita, a 25°C si nota un certo ritardo nella risposta all'erbicida, dovuto all'acclimatazione di cui necessitano le alghe prima di iniziare a crescere manifestando quindi bassi e costanti valori di rendimento quantico nei primi 4 giorni di esposizione, sia al buio che alla luce.

A differenza di quanto rilevato tramite le misure di crescita, l'influenza negativa della presenza dell'erbicida sul rendimento quantico algale, in funzione delle concentrazioni di esposizione, si osserva per tutti gli esperimenti condotti fin dai primi giorni con differenze più marcate: come già detto precedentemente, il rendimento quantico al buio (F_v/F_m) e alla luce (F_v'/F_m') è un parametro estremamente sensibile alla presenza di tossicità e che manifesta lo stress fisiologico dell'alga in maniera immediata e precoce, a differenza dell'analisi della crescita algale, sulla quale la tossicità ha un effetto non immediato ma ritardato di un paio di giorni.

L'esecuzione delle curve di induzione, mostrate in Fig. 8.9, 8.12 e 8.15, permette di ottenere una misura più precisa del rendimento quantico effettivo. In questo caso le curve ottenute danno un'ulteriore conferma dell'effetto di diminuzione dell'efficienza della fotosintesi all'aumentare della concentrazione di terbutilazina, effetto che viene potenziato all'aumentare della temperatura.

Per valutare meglio le differenze rilevate nei 3 esperimenti a diversa temperatura si possono osservare i grafici riportati in Fig. 8.7, 8.10 e 8.13, che riportano i valori di rendimento quantico alla luce e al buio in giorni prescelti nel corso della durata dell'esperimento. Si può chiaramente notare la correlazione negativa con la concentrazione di terbutilazina, confermando lo stress tossicologico indotto dall'erbicida sull'efficienza fotosintetica di *S. marinoi*. Su queste curve sono stati calcolati i valori di EC50 riportati nella tabella seguente:

	TBZ 15°		TBZ 20°		TBZ 25°	
	Fv/Fm	Fv/Fm'	Fv/Fm	Fv/Fm'	Fv/Fm	Fv/Fm'
EC50	17,43	10,65	11,27	10,53	11,42	8,76
St. error	2,00	1,17	3,14	2,09	0,51	0,73

Si può notare un andamento diverso prendendo in considerazione il rendimento quantico massimo o quello effettivo: per le alghe adattate al buio la TBZ mostra un effetto tossico maggiore, e di uguale entità, per le alghe cresciute alla temperatura di 20 e 25°C rispetto a quelle a 15°C; in seguito a illuminazione, quindi con fotosintesi in corso, l'effetto dannoso è maggiore alla temperatura di 25°C. Questo evidenzia una maggiore sensibilità dell'apparato fotosintetico di *S. marinoi* alle alte temperature.

8.2.2. Esposizione a Desetilterbutilazina

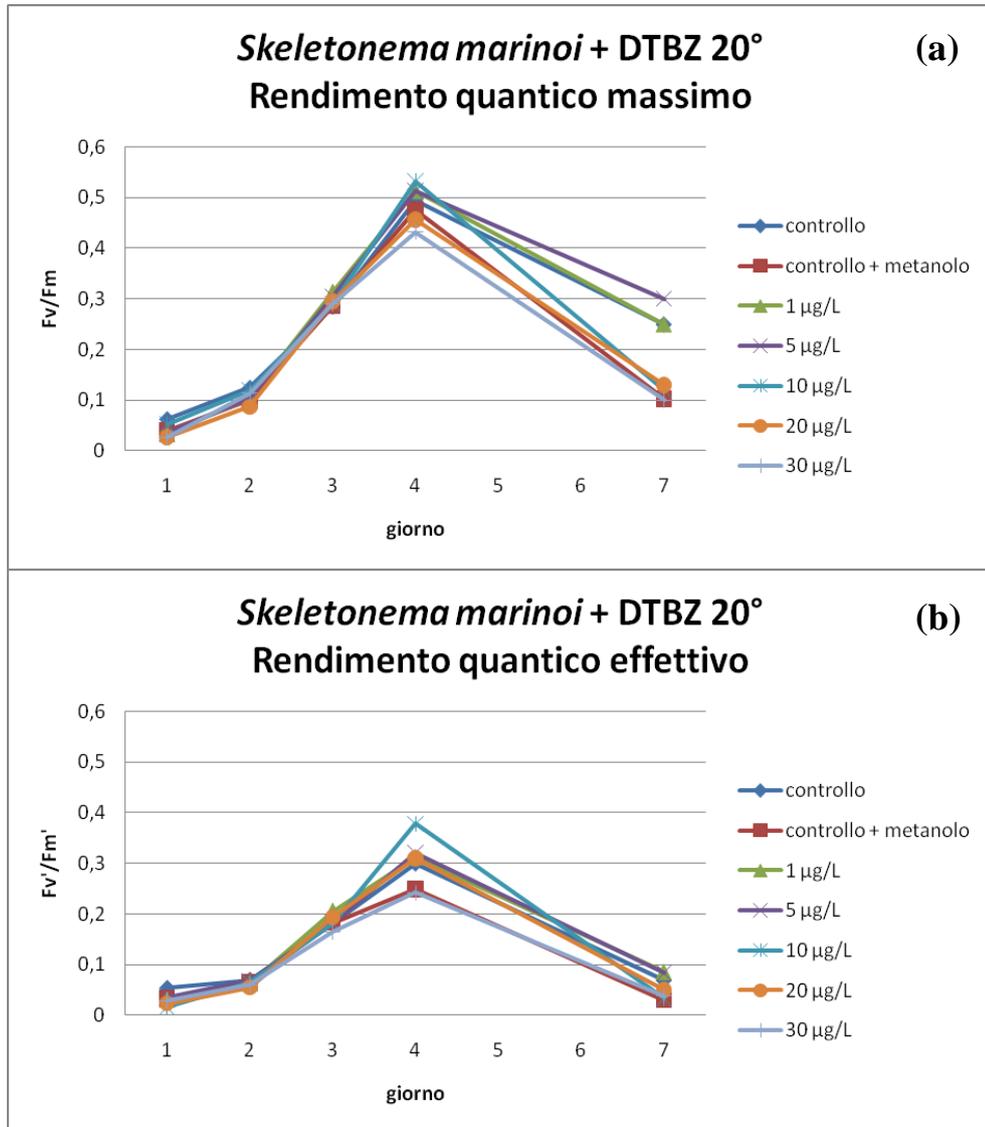
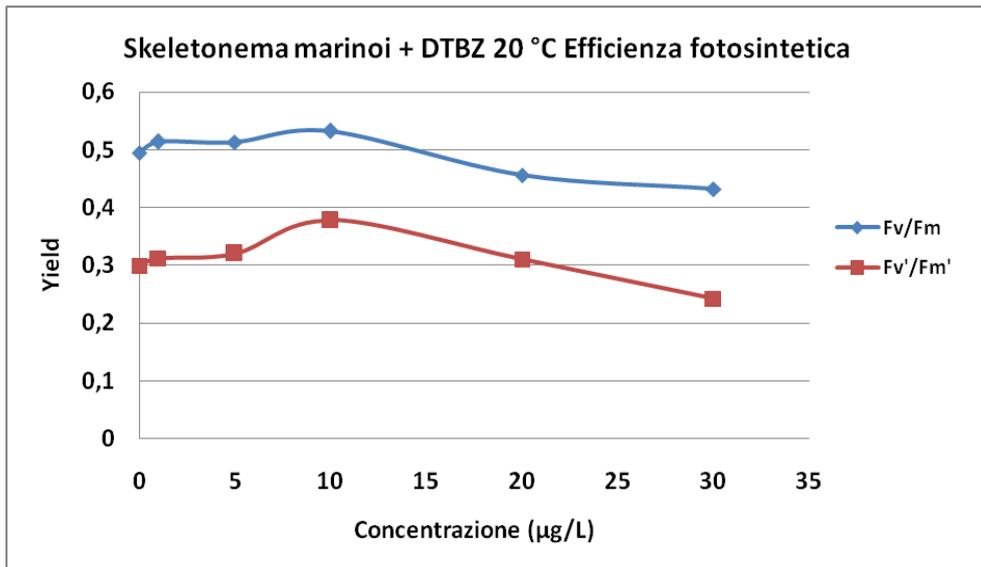


Fig 8.14: Rendimento quantico della fotosintesi nei giorni di esposizione di *Skeletonema marinoi* a diverse concentrazioni di desetilterbutilazina a 20°C, misurato dopo adattamento al buio (Fig 8.14 a) e in seguito a esposizione a luce attinica (Fig 8.14 b).



8.15: Rendimento quantico della fotosintesi in *Skeletonema marinoi* esposta a desetilbutilazina a 20°C, misurato dopo adattamento al buio (F_v/F_m) e dopo esposizione a luce attinica (F_v'/F_m') al giorno 4.

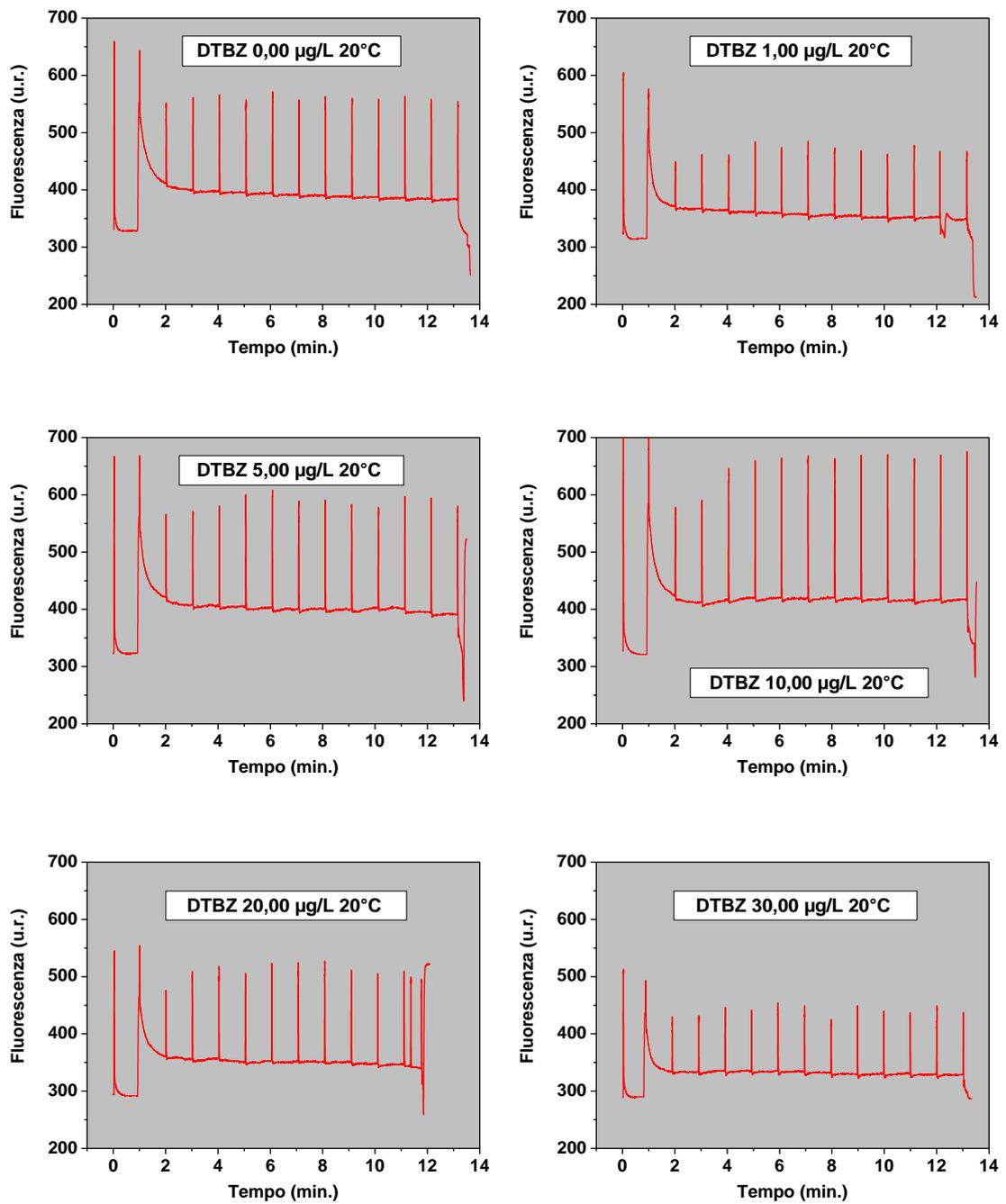


Fig 8.16: Curve di Induzione di *Skeletonema marinoi* esposta a desetilterbutilazina a 20°C.

Osservando i grafici riportati in fig. 8.14 a e b e in fig. 8.15 si osserva che a qualsiasi concentrazione di esposizione, il prodotto di degradazione della terbutilazina non ha alcuna influenza sull'efficienza fotosintetica, come già osservato per la crescita. Il grafico riportato in fig 8.15 e le curve di induzione (Fig. 8.16) mostrano come la desilterbutilazina alla concentrazione di 30 $\mu\text{g/L}$ abbia una leggera influenza negativa sul rendimento quantico alla luce e al buio, questa inibizione però sembrerebbe essere legata non tanto alla presenza di erbicida quanto alla presenza di metanolo usato per la soluzione, come dimostra il valore di rendimento quantico alla luce e al buio per il trattamento controllo + metanolo che risulta essere sempre inferiore rispetto al controllo senza metanolo.

La concentrazione di metanolo usata in questo esperimento era di 0,006% pari a quella aggiunta nel campione con 30 $\mu\text{g/L}$ di DTBZ, e non è stata più usata negli altri esperimenti dove i livelli non hanno mai superato 0,002%.

8.2.3. Esposizione a metolachlor

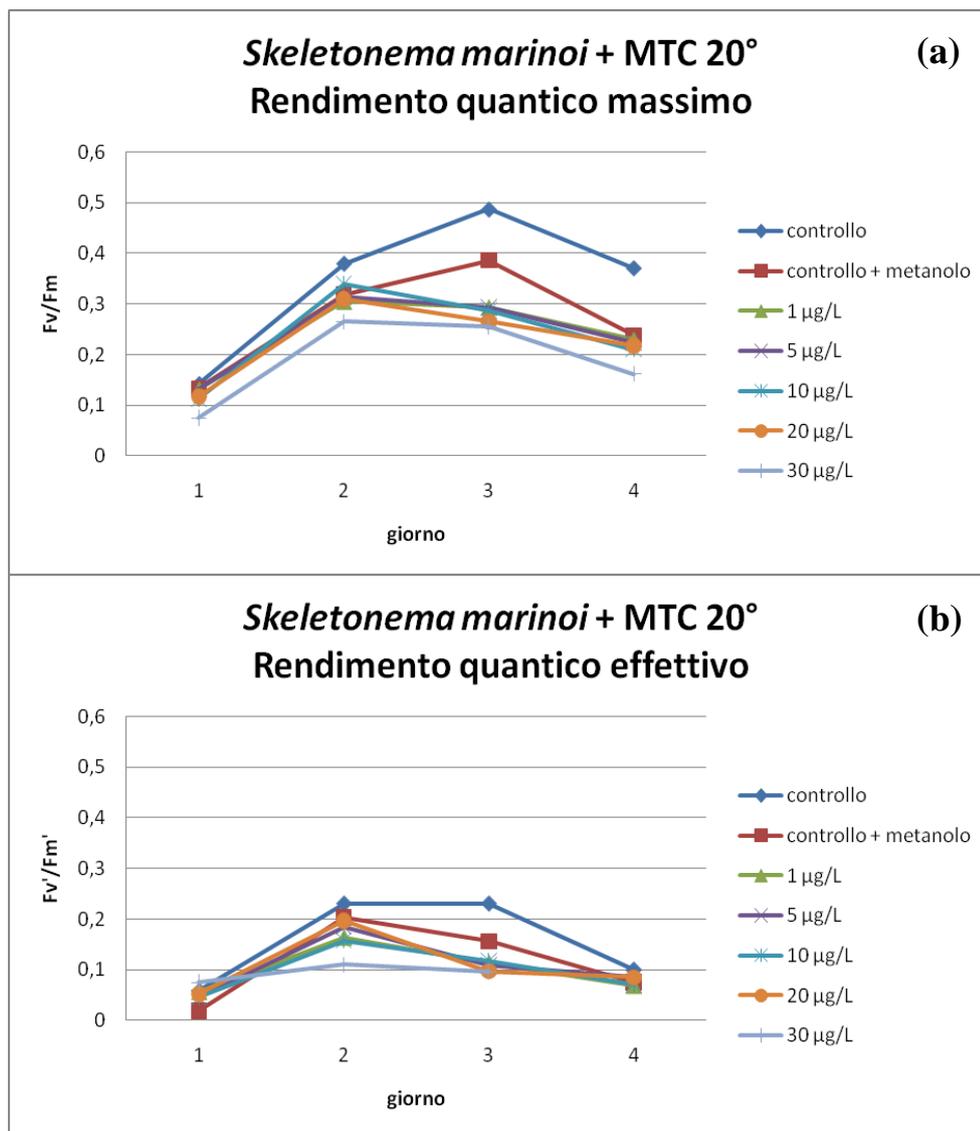


Fig. 8.17: Rendimento quantico della fotosintesi nei giorni di esposizione di *Skeletonema marinoi* a diverse concentrazioni di metolachlor a 20°C, misurato dopo adattamento al buio (Fig 8.17 a) e in seguito a esposizione a luce attinica (Fig 8.17 b) .

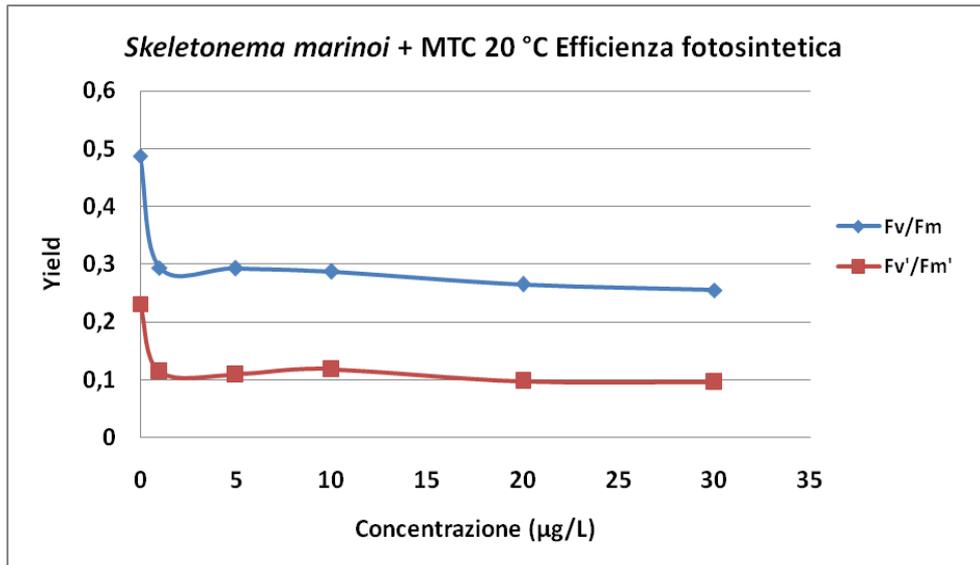


Fig. 8.18: Rendimento quantico della fotosintesi in Skeletonema marinoi esposta a metolachlor a 20°C, misurato dopo adattamento al buio (F_v/F_m) e dopo esposizione a luce attinica (F_v'/F_m') al giorno 3.

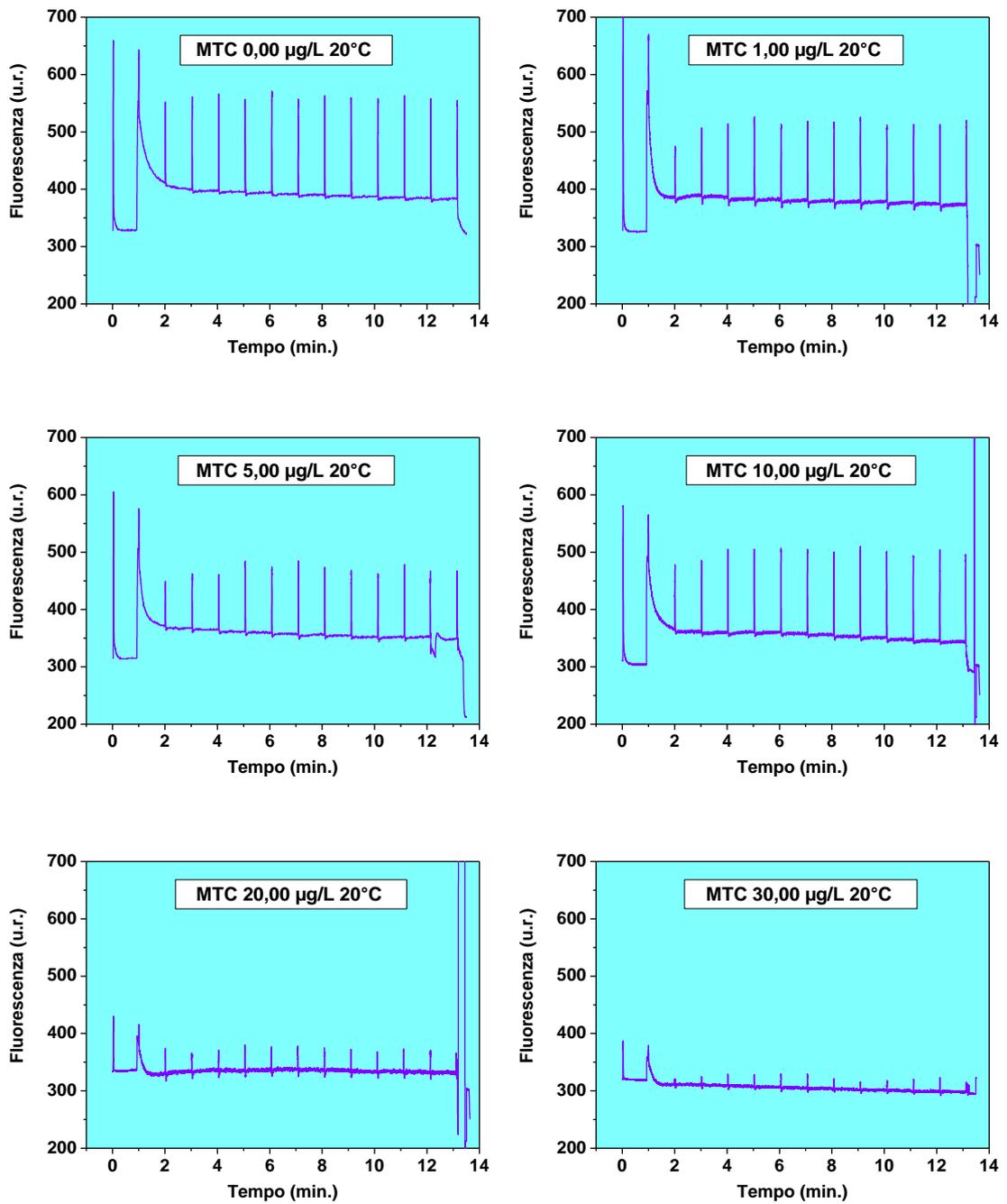


Fig 8.19: Curve di Induzione di *Skeletonema marinoi* esposta a metolachlor a 20°C.

Osservando i grafici riportati in fig. 8.17 a e b e in fig. 8.18 si rileva un leggero effetto del metolachlor sul rendimento quantico della fotosintesi di *S. marinoi*. C'è un effetto di inibizione dovuto alla presenza di metanolo, aggiunto però in quantità (0,002%) pari a quelle presenti nel resto dei campioni con metolachlor che però risultano più inibiti anche se in maniera indipendente dalla concentrazione. L'effetto di inibizione del rendimento quantico del metolachlor alle più alte concentrazioni risulta più evidente osservando le curve di induzione (fig. 8.19).

Il minore effetto del metolachlor, rispetto alla TBZ, sulla fotosintesi può essere dovuto al meccanismo d'azione diverso dei due erbicidi. Quest'ultimo non ha effetti diretti sul PSII e si può pensare che provochi un effetto indiretto di inibizione della fotosintesi, dovuto ad una alterazione del metabolismo.

Confrontando questi risultati con quelli ottenuti dalla crescita, è importante osservare che, mentre la diminuzione del numero di cellule si osservava solo dopo il giorno 4, il rendimento quantico presenta variazioni già al giorno 2.

8.2.4. Esposizione a Metolachlor + Terbutilazina

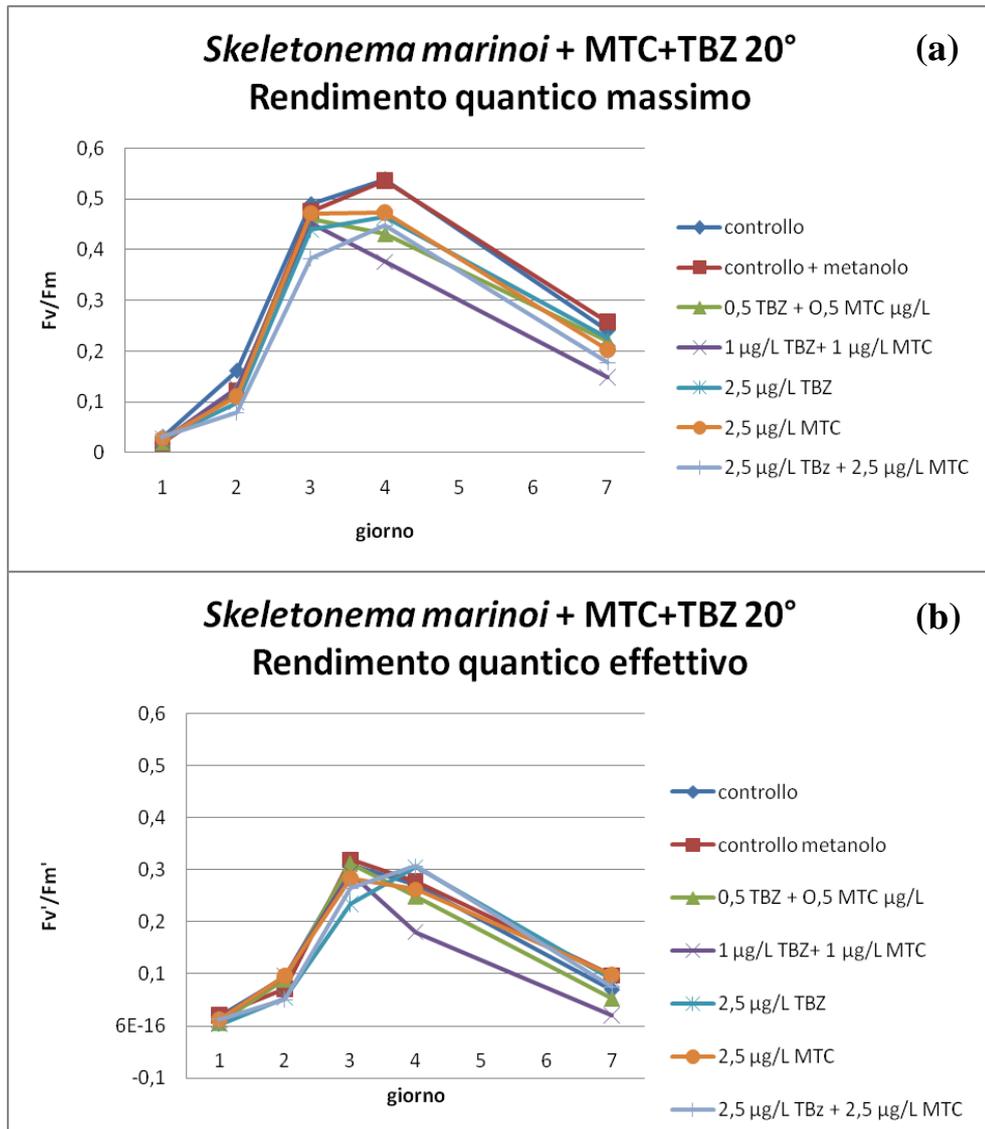
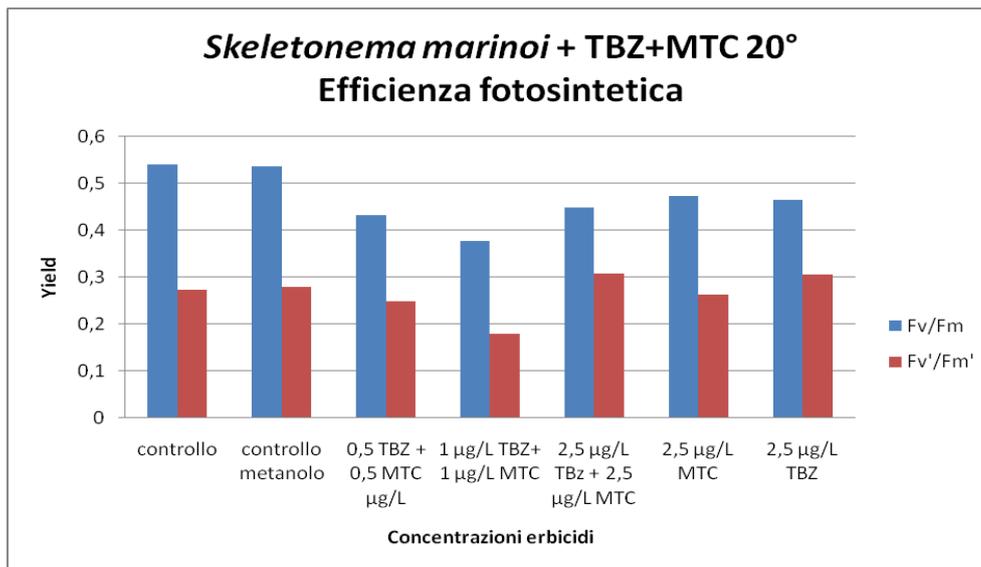


Fig. 8.20: Rendimento quantico della fotosintesi nei giorni di esposizione di *Skeletonema marinoi* contemporaneamente a terbutilazina e metolachlor a 20°C, misurato dopo adattamento al buio (Fig 8.20 a) e in seguito a esposizione a luce attinica (Fig 8.20 b).



*Fig. 8.20: Rendimento quantico della fotosintesi in *Skeletonema marinoi* esposta a terbutilazina e a metolachlor a 20°C, misurato dopo adattamento al buio (F_v/F_m) e dopo esposizione a luce attinica (F_v'/F_m') al giorno 4.*

L'efficienza fotosintetica al buio risulta leggermente più bassa in tutti i campioni con gli erbicidi rispetto sia al controllo normale che al controllo con metanolo; l'effetto però non aumenta all'aumentare della concentrazione dei composti aggiunti. L'efficienza fotosintetica alla luce, invece, in tutti i campioni con erbicida oscilla tra valori simili a quelli dei controlli.

Non sembra pertanto che le basse concentrazioni di 2 erbicidi diano effetti sinergici evidenti, anche se sono necessarie ulteriori indagini di conferma.

8.3 Effetto della Terbutilazina sul contenuto intracellulare di Carbonio e Clorofilla

I grafici in Fig 8.21 a e b riportano, rispettivamente, i valori del biovolume cellulare e della clorofilla *a* misurati al quarto giorno dall'inizio della crescita nelle colture esposte ai 3 erbicidi (TBZ, DTBZ e MTC) a 20°C.

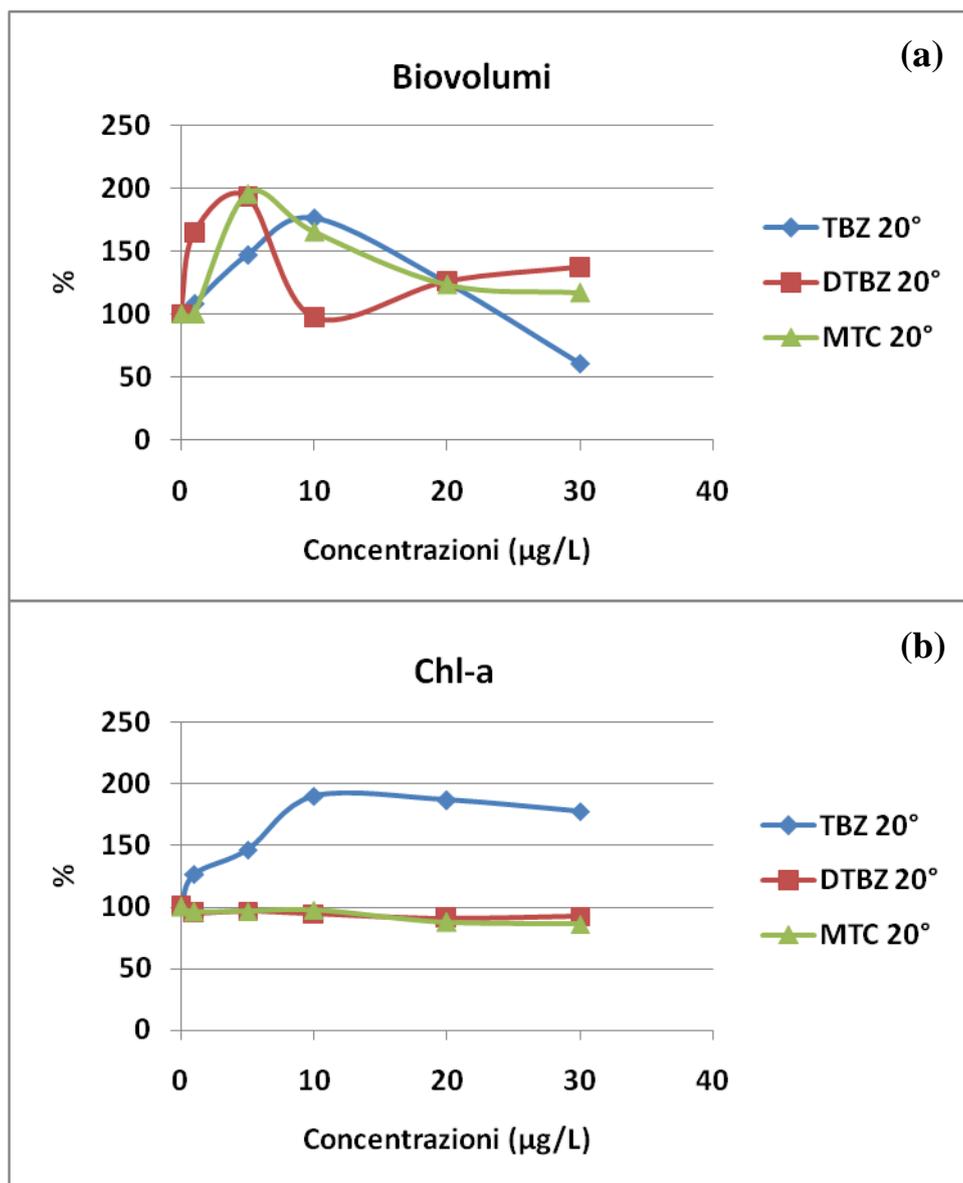


Fig. 8.21: Valori del biovolume cellulare (a) e della clorofilla (b) a misurati al quarto giorno dall'inizio della crescita nelle colture esposte ai 3 erbicidi.

Per quanto riguarda il biovolume (Fig. 8.21 a), in ogni trattamento si nota un iniziale aumento, seguito da un calo alle concentrazioni di erbicida più elevate. L'aumento di biovolume indica l'aumento delle dimensioni cellulari come conseguenza della difficoltà a dividersi in una situazione di stress, mentre la conseguente diminuzione alle concentrazioni maggiori di erbicida è dovuto alla maggiore tossicità del composto, osservabile soprattutto nelle colture effettuate in presenza di TBZ.

Anche la Clorofilla (Fig. 8.21 b), nelle colture esposte a TBZ, presenta un iniziale aumento fino alla concentrazione di 10 µg/L, probabilmente per aumentare l'efficienza fotosintetica in condizioni di stress, mantenendosi poi a valori più o meno costanti. Nelle colture esposte a DTBZ e MTC non si osserva nessun aumento di clorofilla probabilmente in quanto l'apparato fotosintetico è meno stressato rispetto a quelle esposte a TBZ.

Nella Fig. 8.22 a, b, c sono riportati i valori di carbonio cellulare, ricavato dal biovolume tramite una formula di conversione, e di clorofilla per litro di coltura; si può osservare un confronto tra le colture esposte a TBZ alle tre diverse temperature e l'andamento del rapporto tra C/Chl nelle cellule.

Da questi grafici si può rilevare il maggiore effetto tossico della terbutilazina per le colture cresciute a temperatura più alta. L'effetto si manifesta soprattutto in un calo del carbonio all'aumentare delle concentrazioni di erbicida, rispetto a quelle cresciute a 15 e 20°C.

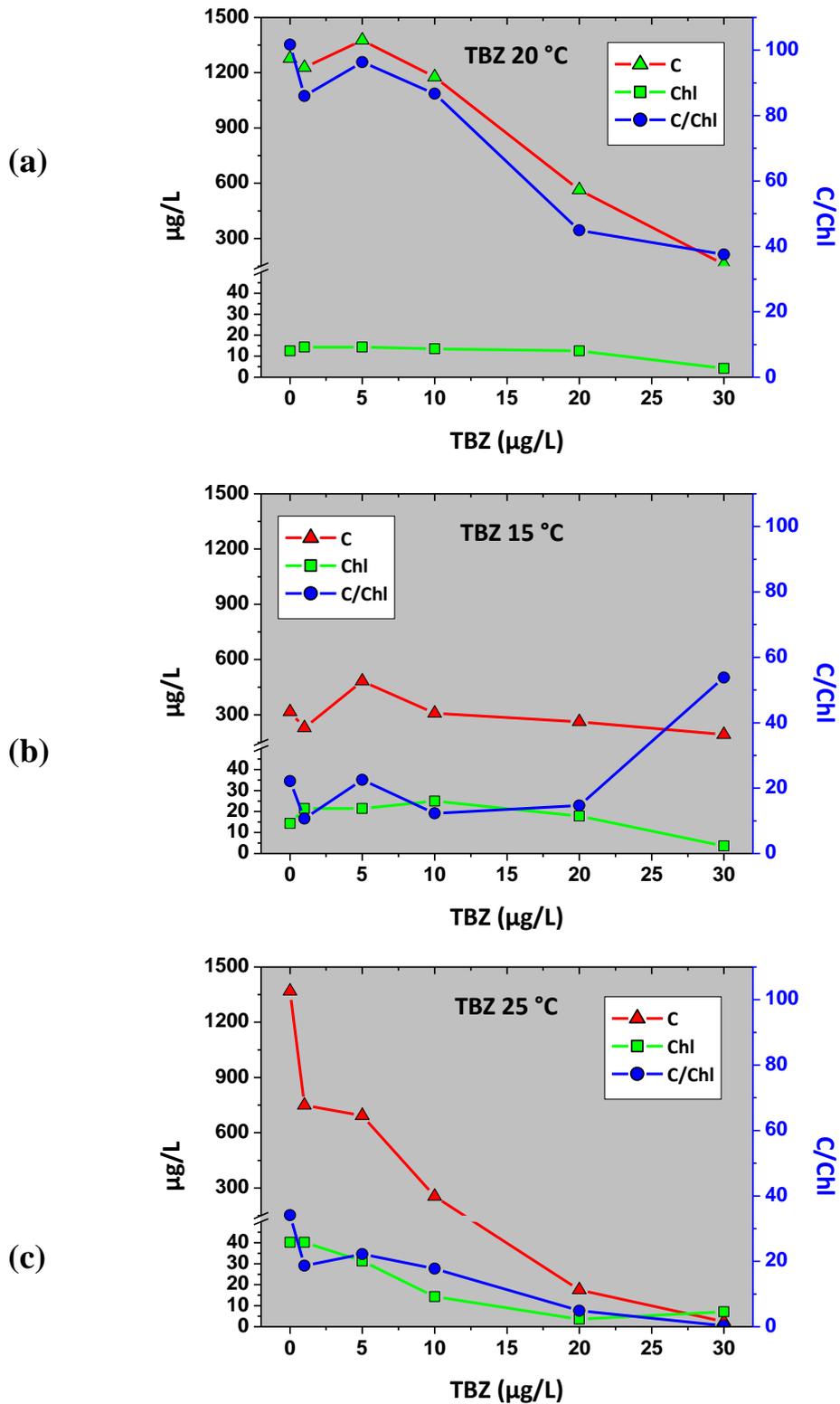


Fig. 8.22: Contenuto cellulare di Carbonio e Clorofilla e loro rapporto in funzione della concentrazione di terbutilazina alle tre temperature 20° (a), 15° (b) e 25° (c).

9. CONCLUSIONI

Le colture di laboratorio condotte con la diatomea *Skeletonema marinoi* esposta a concentrazioni crescenti di diversi erbicidi e, in un caso anche a diverse temperature, indicano che l'erbicida al quale la microalga mostra maggiore sensibilità è la Terbutilazina, uno dei composti più abbondanti tra quelli riscontrati in acque superficiali e profonde dell'area padano-veneta. Infatti a parità di concentrazioni, la sensibilità della microalga alla terbutilazina è risultata molto più alta rispetto al suo prodotto di degradazione, la Desetilterbutilazina e all'erbicida Metolachlor.

Attraverso l'analisi di densità algale, di efficienza fotosintetica, di biovolume e di contenuto intracellulare di Carbonio e Clorofilla, è stato dimostrato l'effetto tossico dell'erbicida Terbutilazina che, agendo come inibitore del trasporto degli elettroni a livello del PS-II, manifesta la sua tossicità nell'inibizione della fotosintesi e di conseguenza sulla crescita e sulle proprietà biometriche delle microalghe.

E' stato visto come la temperatura sia un parametro ambientale fondamentale sulla crescita algale e anche sugli effetti tossici di Terbutilazina; la temperatura ideale per la crescita di *S. marinoi* è risultata essere 20°C. Crescendo a 15°C la microalga presenta un rallentamento nella crescita, una minore efficienza fotosintetica, variazione nei valori biometrici, mostrando al microscopio forme irregolari e di dimensioni inferiori rispetto alle microalghe cresciute alle temperature maggiori, ed infine incapacità di formare le tipiche congregazioni a catena. A 25° invece si sono rivelate difficoltà nell'acclimatazione: sembra che la microalga si debba abituare a questa alta temperatura ritardando così la divisione cellulare di qualche giorno rispetto agli esperimenti condotti a 15° e a 20°C. Gli effetti della terbutilazina sono stati maggiori per le alghe cresciute a 25°C che hanno mostrato un calo più evidente di efficienza fotosintetica effettiva e una diminuzione di carbonio e clorofilla all'aumentare delle concentrazioni di erbicida.

Sono presenti in letteratura studi che attestano effetti tossici paragonabili dell'atrazina e del suo principale prodotto di degradazione, la deetilatrazina (De Lorenzo et al., 1998); nei nostri studi invece non sono stati evidenziati effetti tossici significativi del principale prodotto di degradazione della terbutilazina, la desetilterbutilazina. Si può ipotizzare quindi che la desetilterbutilazina perda la propria capacità di legarsi al sito di legame per il plastochinone (PQ) sulla proteina D1 all'interno del complesso del PSII, permettendo quindi il normale trasporto degli elettroni del PSII e la conseguente sintesi di NADPH e ATP e il ciclo di riduzione del carbonio.

Il Metolachlor non evidenzia una tossicità severa come Terbutilazina nei confronti di *S. marinoi*, probabilmente a causa del suo diverso meccanismo d'azione. Infatti, a differenza degli erbicidi triazinici, metolachlor agisce attraverso l'inibizione delle elongasi e del geranilgeranil pirofosfato ciclasi (GGPP). In letteratura sono riportati casi studio degli effetti inibitori di Metolachlor sulla sintesi degli acidi grassi e di conseguenza della divisione cellulare su specie fitoplanctoniche d'acqua dolce (Carter et al., 1998). Negli esperimenti da noi condotti sono stati evidenziati lievi effetti inibitori su *S. marinoi*. E' interessante notare come attraverso la valutazione della sola crescita non sia stato messo in evidenza alcun effetto mentre, tramite l'analisi dell'efficienza fotosintetica, si possa osservare che il metolachlor determina una inibizione della fotosintesi.

La presenza contemporanea di due erbicidi a basse concentrazioni non sembra determinare un effetto sinergico sui parametri presi in considerazione.

10. BIBLIOGRAFIA

Adua, M., Bellucci, V., Brunori, A., Campana, L., Carlini, E., Cascone, C., Ciccicarese, L., Cipollaro, S., Crosti, R., Forcioni, V., Francaviglia, R., Giardina, F., Giovannelli, V., Giunta, M., Greco, M., Lucci, S., Mattaliano, N., Pallotti, A., Piccini, C., Pettenella, D., Raineri, V., Rastelli, V., Romeo, M., Sannino, R., Secco, L., Segazzi, L., Staiano, G., Settori produttivi Agricoltura e selvicoltura, 2009.

Al-Mendoufi, O., Ashton, F.M., 1984, Benzaton influence on selected metabolic processes of isolated bean leaf cells. *Journal of Plant Growth Regulation* 3 (1-3), 121-126.

Atkinson, D. 1994. Temperature and organism size – a biological law for ectotherms. *Adv. Ecol. Res.* 25: 1-54

Barreiro R, Pratt JR (1994) Interaction of toxicants and communities: the role of nutrients. *Envir. Toxicol. Chem* 13: 361-368.

Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Long, S.P., Baker, N.R., Oquist, G., Schreiber, U., Lechner, E.G., 1989. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecol.* 3, 497-514.

Buma A.G.J., Sjollem S.B., Van de Poll, W., Klamer, H., Bakker, J., 2009. Impact of the antifouling agent Irgarol 1051 on marine phytoplankton species. *Journal of Sea Research* (2009) 133-139.

Carder, J.P. Hoagland, K.D., 1998. Combined effects of alachlor and atrazine on benthic algal communities in artificial streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1415-1420.

Carniel, A., *Le acque del fiume Livenza*, ARPA Dipartimento provincial di Pordenone (2008).

Darley, W.M., 1977. Biochemical composition. In: Werner, D. (Ed.), *The biology of Diatoms*. Blackwell, Oxford, pp. 198-223.

De Lorenzo, M., Scott G., Ross, P., 1999. Effects of the agricultural pesticides atrazine, deethylatrazine, endosulfan, and chlorpyrifos on an estuarine microbial food web. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 18, No. 12, pp. 2824-2835, 1999.

Debenest, T., Pinelli, E., Coste, M., Silvestre, J., Mazzella, N., Madigou, C., Delmas, F., 2009. Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. *Aquatic Toxicology* 93 (2009) 11-17.

Drake, J., Huxel, G., Hewitt, C., 1996. Microcosms as models for generating and testing community theory. *Ecology* 77, 670-677.

Dortch, Q., Roberts, T.L Clayton, J.R., Ahmed, S.I., 1983, RNA/DNA ratios and DNA concentrations as indicators of growth rate and biomass in planktonic marine organisms. Mar. Ecol. Prog. Ser. 13, 61-71.

Durbin, E.G. 1977. Studies on the autoecology of the marine diatom *Thalassiosira nordenskiöldii*. The influence of cell size on growth rate, and carbon, nitrogen, chlorophyll a and silica content. J. Phycol.13: 150 – 155.

Eullafroy, P., Vernet, G., 2002. The F684/F735 chlorophyll fluorescence ratio: a potential tool for rapid detection and determination of herbicide phytotoxicity in algae. Water Research 37 (2003) 1983-1990.

Extension Toxicology Network, 1993. A Pesticide Information Project of Cooperative Extension Offices of Cornell University, Michigan State University, Oregon State University, and University of California at Davis.

Freeman C, Gresswell R, Guasch H, Hudson J, Lock MA, Reynold B, Sabater S, Sabater F (1994) The role of drought in the impact of climatic change on microbiota of peatland streams. Freshwat. Biol. 32: 223-230.

Gardinali, P., Plasencia, M., Maxey, C., 2004. Occurrence and transport of Irgarol 1051 and its major metabolite in coastal waters from South Florida, Marine Pollution Bulletin 49, 1072-1083.

Genty, B., Briantais, J.-M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophys. Acta 990, 87-92.

Gerofke, A., Kamp, P., McLachlan, M.S., 2005. Bioconcentration of persistent organic pollutants in four species of marine phytoplankton. Environ. Toxicol. Chem. 24, 2908-2917.

Guasch, H., Ivorra, N., Lehmann, V., Paulsson, M., Real, M., Sabater, S., 1998. Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors. Journal of Applied Phycology 10: 203-213, 1998.

Frenqueira, D., Orosa, M., Torres, E., Herrero, C., Cid, A., 2000. Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. Sci. Total Environ. 247, 119-126.

Hamala, J.A., Kollig, H.P., 1985, The effects of atrazine on periphyton communities in controlled laboratory ecosystems. Chemosphere 14, 1391-1408.

Haynes, D., Muller, J., Carter, S., 2000a. Pesticide and herbicide residues in sediments and seagrasses from the great barrier reef world heritage area and Queensland coast. Marine Pollution Bulletin 41, 279-287.

- Haynes, D., Ralph, P., Pranges, J., Denninson, B., 2000. The impact of the herbicide diuron on the photosynthesis in three species of tropical seagrasses, *Marine pollution Bulletin* 41 (7-12), 288-293.
- Hillebrand, H. & Sommer, U. 1996. Nitrogenous nutrition of the potential toxic diatom *Pseudonitzschia pungens f. multiseriata* Hansle. *J. Plankton Res.* 18:295-301.
- House, W.A., Leach, D., Long, J.C.A., Cranwell, P., Smith, C., 1997. Micro-organic compounds in the Humber rivers. *Sci. Toxicol. Environ.* 194-195, 357-371
- Huber, R., Otto, S., 1994. Environmental behavior of bentazone herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 137, 11-134.
- Isalm, M.S., Tanaka, M., 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 624-649.
- Jones, R.J., Kerswell, A.P., 2003. Phytotoxicity of photosystem II (PSII) herbicides to coral. *Marine ecology Progress Series* 261, 149-159.
- Juneau, P., Dewez, D., Matsui, S., Kim, S.G., Popovic, R., 2001. Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metolachlor by PAM-fluorometry. *Chemosphere* 24 (2001) 589-598.
- Krause, G.H., Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 313-349.
- Larson, S.J., Capel, P.D., Goolsby, D.A., Zaugg, S.D., Sandstrom, M.W., 1995. Relations between pesticide use and riverine flux in the Mississippi River basin. *Chemosphere* 31, 3305-3321.
- Macedo R.S., Lombardi, A.T., Omachi, C.Y., Rörig L.R., 2008. Effects of the herbicide bentazone on growth and photosystem II maximum quantum yield of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Toxicology in Vitro* 22 (2008) 716-722.
- Maggiore, T., Salamini, F., 2004. Ricerca, innovazione e progresso dell'agricoltura italiana. *Agricoltura, origine e diffusione.*
- Magnusson, M., Heimann, K., Negri, A., 2008. Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae. *Marine Pollution Bulletin* 56 (2008) 1545- 1552.
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51 (345), 659-668.
- Mayasich JM, Karlander EP, Terlizzi DE Jr (1986) Growth responses of *Nannochloris oculata* Droop and *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin to the herbicide atrazine as influenced by light intensity and temperature.

- Millie, D., Hersh, C., 1987. Statistical characterizations of the atrazine induced photosynthetic inhibition of *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyta). *Aquatic Toxicology* 10, 239-249.
- Mitchell, C., Brodie, J., White, I., 2005. Sediments, nutrients and pesticide residues in event flow conditions in streams of the Mackay Whitsunday region, Australia. *Marine pollution Bulletin* 51, 23-36.
- Montagnes, S. S. Kimmance, and Wilson, D., In press. Effects of global and local temperature changes on free living, aquatic protists. In L. Bolis, *Proceedings of the international conference on comparative physiology: Climate changes: Effects on plants, animals and humans*.
- Navarro, S., Vela, N., Giménez, M.J., Navarro, G., 2004. Persistence of four s-triazine herbicides in river, sea and groundwater samples exposed to sunlight and darkness under laboratory conditions
- Newman, M.C., Unger, M.A., 2003, *Fundamentals of Ecotoxicology*, second ed. Lewis Publishers, New York, 458pp.
- Nyström, B., Becker-Van Slooten, K., Bèrard, A., Grandjean, D., Druart, J.C., Leboulanger, C., 2001. Toxic effects of Irgarol 1051 on phytoplankton and macrophytes in Lake Geneva. *Water Research* 36, 2020-2028.
- Peakall, D.B., Walker, C.H., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (3). *Vertebrate Ecotoxicol.* 3, 173-179.
- Peeler, T.C., Naylor, A.W., 1988. The influence of dark adaptation temperature on the reappearance of variable fluorescence following illumination. *Plant Physiology* 86, 152-154.
- Pérez-Ruzafa, a., Navarro, S., Barba, A., Marcos, C., Càmara, M.A., Salas, F., Gutiérrez, J.M., 2000. Presence of pesticides throughout trophic compartments of the food web in the Mar Menor Lagoon (SE Spain). *Mar. Pollut. Bull.* 40, 140-151.
- Pinckney J., Örnöfisdóttir E.B., Lumsden S.E., 2002. Estuarine phytoplankton group-specific responses to sublethal concentrations of the agricultural herbicide, atrazine. *Marine Pollution Bulletin* 44 (2002) 1109-1116.
- Pflugmacher, S., Wiencke, C, Sandermann, H., 1999. Activity of phase I and phase II detoxification enzymes in Antarctic and Arctic macroalgae. *Mar. Environ. Res.* 48, 23-36.
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitao, M.A.A., Okamoto, o.K., Morse, D., Colepicolo, P., 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 39, 1008-1018.
- Ranke, J., Jastorff B., 2000. Multidimensional risk analysis of antifouling biocides. *Environ. Sci. Poll. Res.* 7 (2), 109-110.

- Raven, J. A., and R. J. Geider. 1988. Temperature and algal growth. *New Phytol.* 110: 441-461.
- Readman, J.W. Devilla R.A, Tarran, G., 2004. Flow cytometry and pigment analysis as tools to investigate the toxicity of herbicides to natural phytoplankton communities. *Mar. Environ Res.* 58 (353-358).
- Sandermann Jr., H., 1992. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem. Sci.* 17, 82-84.
- Schödel, R., Irrgang, K.D., Voigt, J., Renger, G., 1999. Quenching of Chlorophyll Fluorescence by Triplets in Solubilized Light-Harvesting Complex II (LHCII). *Biophysical Journal* 76, 2238-2248.
- Schreiber, U., Muller J.F., Hauggl, A., Gadermann, R., 2002. New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. *Photosynthesis Research* 74, 317-330.
- Singer, A.C., Thompson, I.P., Bailey, M.J., 2004. The tritrophic trinity: a source of pollutant-degrading enzymes and its implications for phytoremediation. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 239-244.
- Solomon KR, et al. 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ Toxicol Chem* 15:31 – 76.
- Strathmann, R. R. 1967. Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume: *Limnol. Oceanogr.* 12: 411-418
- Ravanel, P., Taillandier, G., Tissut, M., Benoit-Guyod, J.L., 1985. Effect of chlorophenols on isolated plant mitochondria activities: a QSAR study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 9, 300-320.
- Readman J.W., Devilla, R.A., Tarran,G., 2004. Flow cytometry and pigment analyses as tools to investigate the toxicity of herbicides to natural phytoplankton communities. *Marine Environmental Research* 58,353-358.
- Romero-Isart, N., Vasak, M., 2002. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.* 88, 388-396.
- Thies F, Grimme LH (1994) In vivo O-dealkylation of resorufin and coumarin ethers by green alga *Chlorella fusca* analysed by a rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic assay. *J Chromatogr* 684: 168-173.
- Thies, F., Backhaus, T., Bossmann, B., Grimme, L.H., 1996. Xenobiotic Biotransformation in Unicellular Green Algae: Involvement of Cytochrome P450 in the activation and selectivity of the Pyridazinone Pro-Herbicide Metflurazon. *Plant Physiol.* (1996) 112: 361-370.
- Thurman EM, Meyer MT, Mills MS, Zimmerman LR, Perry CA, Goolsby DA, 1994. Formation and transport of deethylatrazine and deisopropylatrazine in surface water. *Environ Sci Technol* 28:2227-2277.

Torres, M., Barros, M., Campos, S., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R., Colepicolo, P., 2008. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71 (2008) 1-15.

Tremolada, P., Finizio, A., Villa, S., Gaggi, C., Vighi, M., 2004. Quantitative interspecific chemical activity relationship of pesticides in the aquatic environment. *Aquat. Toxicol.* 67, 87-103.

Van Gestel, C.A., Van Brummelen, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217-225.

WHO- world Health Organization, 1993. International Programme on Chemical safety (IPCS) Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. World Health Organization, Geneva, 57pp.

Whitton, B.A., Kelly, M.G., 1995. Use of algae and other plants for monitoring rivers. *Aust. J. Ecol.* 20, 45-56.

Yang, S., Wu, S.S., Kong, Y.C., 2002. Physiological and cytological responses of the marine diatom *Skeletonema costatum* to 2,4-dichlorophenol. *Aquatic Toxicology* 60 (2002) 33-41.

Zamora, I., Gardinali, P., Jochem, F., 2006. Assessing the effects of Irgarol 1051 on marine phytoplankton populations in Key Largo Harbor, Florida. *Marine Pollution Bulletin* 52 (2006) 935-941.

Zi-wei, Y., Gui-Bin, H., Heng-zhen, Xu., 2002. Distribution of organochlorine pesticides in seawater of the Bering and Chukchi Sea. *Environ. Pollut.* 116, 49-56.

RINGRAZIAMENTI

Ripercorrendo con la mente tutte le vicissitudini che mi sono capitate durante questo breve ma intenso percorso, sono diverse le persone che emergono come meritevoli candidati a esser protagonisti di questa pagina conclusiva, ma indubbiamente, più di chiunque altro, questo traguardo è dedicato al mio caro Matti.

Sono sicura che da quando Carmen, Ivan e Viviana mi hanno delegato a proseguire con successo la strada in cui Matti si è precocemente fermato, ho affrontato con molta più forza, motivazione e determinazione ogni ostacolo ed è per questo che ora lo ringrazio e lo ricordo come non ho mai smesso di fare ogni giorno, da un anno e mezzo. Ogni volta che mi sedevo con il batticuore su quella seggiolina maledetta davanti alla cattedra di fronte al prof, il mio primo pensiero era sempre una richiesta di solidale compartecipazione a te, e tu lo sai bene, perché tutti quegli esami li hai affrontati anche tu insieme a me... ed è per questo, caro Matti, che a questo traguardo ci sei anche tu; ho seguito le orme che tu avevi proiettato nel tuo futuro ed ho realizzato ogni tua aspettativa... avresti saputo far di meglio!?

Un riverente ringraziamento va a tutte le persone che mi hanno addestrato alla metodica del lavoro in laboratorio: non so proprio come incominciare! Sono consapevole di essere stata una persona molto impegnativa da disciplinare tra tutti quegli strumenti, metodi, protocolli da seguire, etc... ma sono convintissima di essere stata per tutte voi un proficuo allenamento di lavoro in condizioni estreme!

“Domo arigatoo” alla Prof. Pistocchi che in tutti questi mesi mi ha seguita con pazienza, facendomi acquisire quella confidenza e indipendenza in laboratorio che prima mi era totalmente sconosciuta, ma soprattutto per aver riposto fiducia in me permettendomi di realizzare le mie ambizioni. Grazie alla Manu per avermi avvicinata per la prima volta agli strumenti di laboratorio, insegnandomi fino all’exasperazione le regole fondamentali che fin dalla tenera età mi son sempre state estranee: la precisione, il metodo e l’ordine! Che

dire della Franca... Grazie di cuore per le lunghe chiacchierate, per avermi sostenuto nei momenti più difficili, grazie per le risate e per i consigli che mi hai dato da prof, da amica e soprattutto da mamma... e per la frutta nostrana dell'orto di Bagnacavallo! Grazie alla Laura per avermi svelato i trucchi magici di Word Office ed Excell... grazie alla tua ineguagliabile destrezza hai saputo lasciarmi a bocca aperta con un clic di mouse! Grazie alla Silvana, perchè trovavo sempre stimolante mettere alla prova la sua pazienza, creando situazioni di irripetibile ilarità... e sono sicura che dopotutto si è divertita anche lei! Grazie Silvana per i tuoi puntigliosi consigli... però, quanto avrei voluto smanettare un po' anch'io con il tuo contacellule Made in Catania che custodivi gelosamente vicino al microscopio!

E a proposito di questo... mi sorge spontaneo un Grazie speciale al mio caro collega di laboratorio Luca Canonico, perché la sua presenza è stata assolutamente indispensabile e insostituibile... grazie per le sane e grasse risate che solo tu mio caro Canonico hai potuto regalarmi! Evviva i coccolitoforidi!!!

Un grazie di cuore va a tutti i miei compagni di università che in questi mesi mi hanno aiutata, che hanno creduto in me e che hanno fatto il tifo per me! Sono diversi i nomi che meritano di essere citati, ma per non creare la spiacevole situazione imbarazzante di dimenticarmi di qualcuno mi limiterò a ringraziare espressamente la mia azzecagarbugli "Matilda", che ho ufficialmente nominato come mia badante, visto che ultimamente sembra che le mie sinapsi neuroniche non lavorino con efficienza ottimale..., ma per fortuna che c'è lei a togliermi dai guai! Grazie Mati per avermi dato in comodato d'uso la dependance di casa tua invece di lasciarmi per strada all'addiaccio, e grazie per il delizioso vitto all inclusive!

Grazie a Rossano, che nonostante tutto in tutti questi anni ha avuto la perseveranza e la costanza di pagare le tasse universitarie fino all'ultima... bè dai, adesso non ci possiamo lamentare! E giuro che di tasse universitarie non se ne dovranno pagare più!

Grazie a Camilla che dopo i periodi infrasettimanali a Ravenna di digiuno per pigrizia e imperizia culinaria e domestica, ogni weekend mi ha sempre fatto il pieno di primizie , e non solo, permettendomi di tornare al lunedì mattina in laboratorio a Ravenna più carica che mai!!! (ma non è vero!!!)

Ed infine... chi più di lui merita un “köszönöm” di cuore speciale... chi più del mio piccolo Reni?! Lo ammetto, hai reso tutto più difficile mettendomi in balia del mio cuore, che è sempre rimasto lassù in Trentino con te, e del mio dovere qui in Romagna, ma ora non ci saranno più sveglie alle 4 per prendere il treno a Rovereto, non ci saranno più lacrime né ciao con la manina dal finestrino fino a perdersi di vista, non ci saranno più serate passate al telefono per sentirci più vicini...! Grazie per avermi sempre dimostrato tutto il bene che mi vuoi, grazie per esser stato per me in tutti questi mesi un amico, un compagno, un amante e un fratello in un'empatia perfetta!