

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

Corso di laurea magistrale in Biologia  
Marina

**Analisi sulla presenza di atrazina in organismi  
dell'ordine Chelonia**

Tesi di laurea in

Biologia delle Tartarughe e dei Cetacei

Relatore

Prof.ssa Annalisa Zaccaroni

Presentata da

Carlotta Amadei

Sessione Unica Anno Accademico 2022/23

# Indice

<b>Indice</b>	<b>a</b>
<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
<b>1. Caratteristiche tossicologiche dell'atrazina</b>	<b>5</b>
1.1 Caratteristiche chimiche	5
1.2 Distribuzione ambientale	6
1.3 Dati sul monitoraggio	7
1.4 Tossicodinamica ed effetti sulle specie selvatiche	8
1.5 Effetti tossici dell'atrazina sulle specie marine	10
1.6 Effetti tossici dell'atrazina sui rettili	11
<b>2. Cenni di biologia delle tartarughe</b>	<b>13</b>
2.1 Sistematica ed evoluzione	13
2.2 Alimentazione	15
2.3 Riproduzione	15
<b>3. Scopo della tesi</b>	<b>17</b>
<b>4. Materiali e metodi</b>	<b>18</b>
4.1 Campionamento	18
4.2 Metodica analitica	20
4.3 Elaborazione statistica	20
<b>5. Risultati e discussione</b>	<b>22</b>
<b>6. Conclusioni</b>	<b>29</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>30</b>

# Introduzione

La parola pesticidi si riferisce alle sostanze chimiche, naturali o industriali, utilizzate per eliminare o tenere sotto controllo gli organismi nocivi. Più precisamente la FAO definisce come pesticida qualsiasi sostanza o miscela di sostanze destinata a prevenire, distruggere o controllare qualsiasi parassita, inclusi i vettori di malattie umane o animali, specie vegetali o animali indesiderate che causano danni o interferiscono durante la produzione, la trasformazione, lo stoccaggio, il trasporto o la commercializzazione di alimenti, materie prime agricole, legno e derivati. Sono incluse le sostanze utilizzate come regolatori di crescita delle piante, defoglianti, disseccanti, diradanti o anticaduta dei frutti (FAO, 2003).

I pesticidi, si possono suddividere in diverse categorie in base all'organismo contro cui agiscono (Ruomeng, 2023):

1. Anticrittogamici = utilizzati con lo scopo di contrastare malattie e alterazioni prodotte da batteri, muffe ed alghe
2. Acaricidi = contro gli acari e gli aracnidi
3. Erbicidi = utilizzati contro le erbe infestanti o malerbe
4. Fungicidi = contrastano le malattie e le alterazioni prodotte dai funghi
5. Insetticidi = contro insetti nocivi alle colture agricole, ma anche insetti portatori di malattie per l'uomo o per gli animali domestici
6. Nematocidi = combattono i vermi infestanti del terreno
7. Rodenticida = contro roditori dannosi

Nonostante abbiano bersagli differenti in tutti i pesticidi possiamo ritrovare gli stessi componenti. La sostanza più importante è il principio attivo che agisce contro l'organismo nocivo e permette al prodotto finale di svolgere la propria azione. Ad esso vengono aggiunte altre sostanze utili dette co-formulanti. Tra queste ritroviamo gli emulsionanti, i sinergizzanti e i coadiuvanti. Quest'ultimi utilizzati con lo scopo di aumentare la stabilità e l'efficacia del prodotto o per migliorare la penetrazione nell'organismo bersaglio (Fanti, 2014).

Come detto precedentemente, gli erbicidi, o diserbanti, vengono utilizzati in agricoltura per contrastare le piante infestanti. Quest'ultime infatti competono per acqua, nutrienti e luce con le colture riducendo drasticamente la produzione agricola. Le piante infestanti possono essere classificate come dicotiledoni o monocotiledoni, definite anche specie a foglia larga o a foglia stretta, per le quali esistono erbicidi in grado di colpire le une rispetto le altre.

La classificazione degli erbicidi può avvenire secondo diversi parametri. Possiamo infatti classificarli in base alla modalità d'azione, al tempo di applicazione o secondo la chimica del principio attivo (Fanti, 2014). In base al tempo di azione dividiamo gli erbicidi in composti di pre-emergenza, che impediscono lo sviluppo della plantula, e di post-emergenza, che eliminano l'infestante già sviluppata. Per quanto riguarda la composizione chimica, siamo in grado di distinguere cinque categorie: i composti bipiridilici, gli organofosfati, gli erbicidi ureici, gli erbicidi triazinici e i derivati dell'acido fenossiacetico. Per la classificazione in base al meccanismo d'azione possiamo seguire quella proposta da Peterson et al. nel 2013:

- Regolatori della crescita = modificano l'equilibrio ormonale interferendo sulle fasi della crescita
- Inibitori della crescita = inibiscono la divisione cellulare
- Inibitori della fotosintesi = bloccano la fotosintesi mediante l'interruzione delle biomembrane. Le piante, quindi, muoiono a causa di un accumulo di molecole altamente reattive che distruggono le membrane cellulari (Lushchak et al. 2018, de Albuquerque 2020)
- Inibitori della biosintesi degli amminoacidi = questi composti impediscono la biosintesi di alcuni amminoacidi come tirosina, triptofano e fenilalanina (Ruomeng, 2023)
- Inibitori della biosintesi lipidica = inibiscono la biosintesi dei lipidi e ciò comporta l'impossibilità di formare membrane biologiche.
- Inibitori della biosintesi dei pigmenti = attraverso la loro azione le piante non sono più in grado di produrre i pigmenti fotosintetici e quindi non sono più in grado di svolgere la fotosintesi
- Disgregatori della membrana cellulare = portano a necrosi i tessuti con i quali vengono a contatto

L'impiego degli erbicidi è iniziato nel primo dopoguerra ed erano principalmente composti organici come sali di rame, sali di arsenico o clorato di sodio. Questi sono stati poi sostituiti da prodotti organici di sintesi a partire dagli anni 40 e ancora oggi vengono sintetizzate nuove sostanze. Oggigiorno la ricerca si sta spostando però verso la sintesi di prodotti più rispettosi dall'ambiente, in quanto il largo impiego di queste sostanze negli anni passati ha causato un consistente impatto ambientale. Gli erbicidi ma in generale tutti i pesticidi, possono modificare l'equilibrio naturale degli ecosistemi e causare cambiamenti ecologici sostanziali anche se utilizzati secondo buone pratiche agricole (Lushchak et al. 2018). La caratteristica che porta alcuni erbicidi a causare danni ambientali è la loro elevata persistenza nel terreno. Infatti, la

scarsa degradazione di alcune sostanze fa sì che gli erbicidi possano passare dal terreno al ciclo biologico, con la possibilità per alcuni di accumularsi anche all'interno degli organismi viventi (Figura 1).

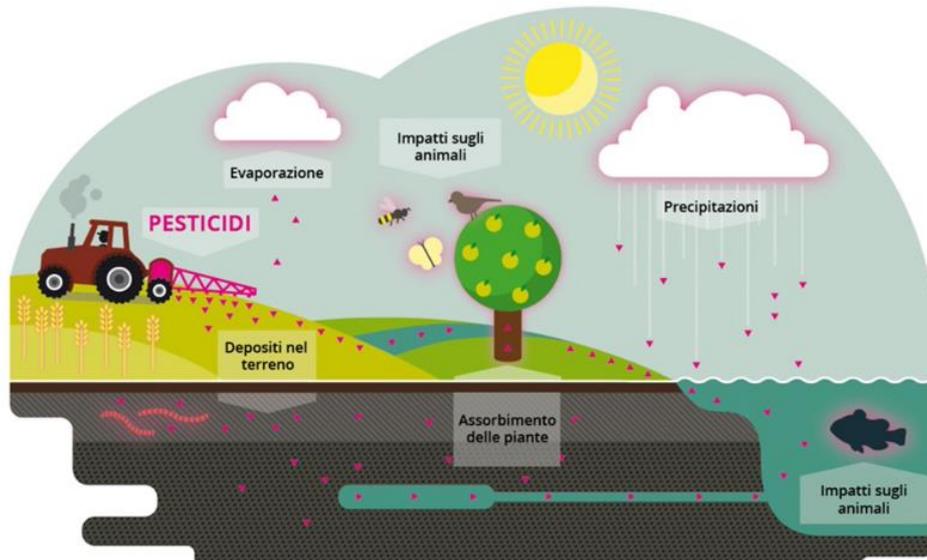


Figura 1: Il movimento dei pesticidi nel ciclo idrogeologico (da de Albuquerque et al. 2020)

In base alla struttura chimica del principio attivo che compone l'erbicida questo può subire o meno degradazione microbica o fotodegradazione (Ruomeng, 2023). Le caratteristiche chimiche inoltre influenzano la matrice ambientale nella quale i vari composti andranno ad accumularsi. Ad esempio, pesticidi altamente solubili in acqua difficilmente si accumuleranno nel suolo o nei sedimenti (Lushchak et al. 2018). La matrice ambientale in cui è più facile trovare i pesticidi è l'acqua, in quanto si accumulano in essa a causa del deflusso dei campi e delle strade adiacenti. La maggior parte del trasporto dei pesticidi nel deflusso avviene durante le prime piogge o eventi di irrigazione; pertanto, la maggior parte del carico annuale si verifica in un periodo di tempo relativamente breve. Basti pensare che dal monitoraggio delle acque del fiume Po, effettuate dall'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale nel 2014, la presenza di pesticidi è stata rilevata nel 70% dei siti nelle acque superficiali e nel 40% in quelle sotterranee (Rapporto Ispra 256/2017). In linea generale, gli erbicidi triazinici (terbutilazina, atrazina) e i loro metaboliti sono la tipologia di sostanze più frequentemente rilevata.

Questi dati dovrebbero destare preoccupazione, in quanto l'erbicida atrazina, in accordo al regolamento CLP sulla Classificazione ed etichettatura delle sostanze (Regolamento (CE) n. 1272/2008), ha la seguente classificazione: sensibilizzazione della pelle (cat. 1), tossicità

specifica per organi bersaglio per esposizione ripetuta (cat.2), pericolo acuto per l'ambiente acquatico (cat. 1) e pericolo cronico per l'ambiente acquatico (cat. 1). È inoltre inserita nella lista delle sostanze prioritarie all'interno dell'UE-Strategy (EC, 1999, EC, 2000) come interferente endocrino. Per questi motivi, in diverse parti del mondo l'utilizzo di atrazina è stato regolamentato. In Italia, ad esempio ne è stato inizialmente limitato l'uso nel 1986 fino a che, nel 1990, il composto fu ufficialmente bandito da tutto il paese. Per quanto riguarda la situazione internazionale, dal 2004 l'Europa ha deciso di revocare le autorizzazioni dei prodotti fitosanitari contenenti il composto chimico, ma in altre parti del mondo è ancora ampiamente utilizzato. Alla luce di queste informazioni abbiamo incentrato il nostro studio su questo composto chimico.

## 1. Caratteristiche tossicologiche dell'atrazina

### 1.1 Caratteristiche chimiche

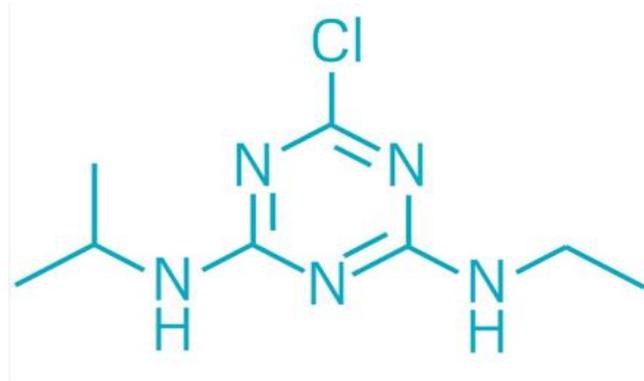


Figura 2: formula di struttura dell'erbicida atrazina

L'atrazina (2-cloro-4-etilammino-6-isopropilammino-1,3,5-triazina) è un principio attivo erbicida appartenente alla classe delle clorotriazine, utilizzato con lo scopo di controllare le erbe infestanti nelle colture di canna da zucchero, grano, sorgo, noci e mais (Singh et al., 2017). È stato inoltre utilizzato per il diserbo di vaste aree per scopi industriali. Chimicamente appartiene alla classe delle ammine e si presenta sotto forma di cristalli incolori. La sua struttura chimica porta l'atrazina ad avere una bassa tendenza a volatilizzarsi come si può osservare dalla bassa costante alla legge di Henry ( $2.48 \times 10^{-4} \text{ Pa m}^{-3} \text{ mol}^{-1}$ ), mentre risulta elevata la solubilità in acqua (28 mg/L a 20 °C) se rapportata alla quantità di sostanza utilizzata (Capel, 2001).

Agisce sugli organismi bersaglio inibendo la fotosintesi con blocco del trasporto di elettroni nel fotosistema II (Figura 3). Una volta assorbita attraverso le radici o le foglie l'atrazina interrompe il flusso di elettroni tra i fotosistemi legandosi al sito di legame del plastochinone QB (de Albuquerque et al., 2020). In questo modo dalle reazioni non si ottiene ATP e NADPH, causando distruzione della clorofilla fogliare, inibizione della sintesi dei carboidrati e accumulo di anidride carbonica all'interno delle cellule vegetali (de Albuquerque et al., 2020). Inoltre, in presenza di atrazina le piante, bersaglio e no, soffrono di stress ossidativo causato dalla generazione di specie reattive dell'ossigeno come il radicale idrossile, l'ossigeno singoletto e il perossido di idrogeno (Singh et al., 2017).

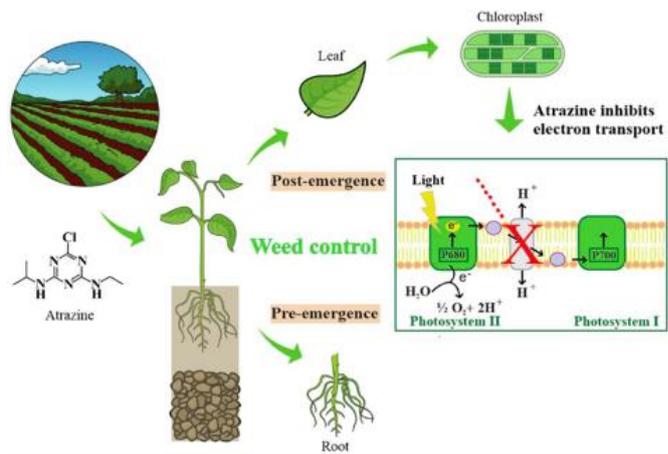


Fig. 3. L'assorbimento dell'atrazina negli organismi bersaglio. Inibisce la fotosintesi, bloccando il trasporto di elettroni nel fotosistema II. (da de Albuquerque et al. 2020).

L'atrazina una volta dispersa nell'ambiente può subire reazioni chimiche, fotochimiche e biologiche che portano alla formazione dei suoi metaboliti. In particolare, sono cinque i processi che portano alla degradazione del composto: idrolisi, adsorbimento, fotodegradazione, degradazione microbologica e volatilizzazione (Andreini et al, 2022). Attraverso la biodegradazione otteniamo DIA (deisopropiltriazina), DEA (desetilatrazina) e DDA (didealchiltriazina) mentre HA (idrossiatrazina) e DEHA (deetilidrossiatrazina) si ottengono come prodotto da reazioni chimiche nel suolo (Graymore et al., 2001). Anche questi composti, così come l'atrazina, mostrano vari gradi di tossicità e persistenza ambientale.

## 1.2 Distribuzione ambientale

L'atrazina è il secondo pesticida più utilizzato al mondo, infatti nonostante ne sia stato vietato l'utilizzo in diverse parti del mondo, ogni anno ne vengono consumate tra le 70 e le 90 mila tonnellate (Singh et al., 2017). Avendo un basso coefficiente di adsorbimento nel suolo, grandi quantità non vengono assorbite e rimanendo nei campi causano inquinamento all'ambiente acquatico attraverso deflusso superficiale e lisciviazione (Tulcan et al., 2021). Le caratteristiche fisiche del suolo, in particolare la tipologia e sua struttura, la percentuale di materia organica e il pH incidono molto sulla persistenza dell'atrazina nel suolo (Graymore et al., 2001). In un profilo di suolo ben strutturato con macropori, ad esempio, il potenziale di lisciviazione dell'atrazina è molto elevato.

Nel sistema acquatico, l'atrazina ha un'emivita relativamente lunga, e questo fa sì che, una volta entrata nel sistema idrico superficiale, raggiunga l'oceano senza elevate perdite. Inoltre, essendo l'atrazina più efficace su terreni umidi viene spesso applicata dopo forti piogge. Questo fa sì che il composto sia maggiormente soggetto a lisciviazione. Oltre che dal deflusso agricolo la contaminazione dell'atrazina dell'ambiente costiero può avvenire anche tramite i trattamenti

delle acque reflue o tramite il deposito di polvere e aerosol. Infatti, l'atrazina è stata rilevata in atmosfera anche lontano dal punto di applicazione (Rapporto Ispra 256/2017).

### 1.3 Dati sul monitoraggio

Come accennato precedentemente nelle indagini sulla contaminazione dell'ambiente acquatico da pesticidi l'atrazina è uno dei composti maggiormente trovati. Infatti, da diverse indagini sulle acque Italiane superficiali e sotterranee condotte dall'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale l'atrazina e i suoi metaboliti erano sempre tra le più rivenute. Come possiamo osservare nella figura numero 4, proveniente dall'edizione 2020 del rapporto nazionale pesticidi nelle acque (dati 2017-2018) la frequenza di ritrovamento dell'atrazina risulta elevata. Nel tempo questa frequenza diminuisce, in linea con il fatto che la sostanza è fuori commercio da molti anni, e quella riscontrata è la coda di una contaminazione storica, dovuta alla persistenza ambientale.

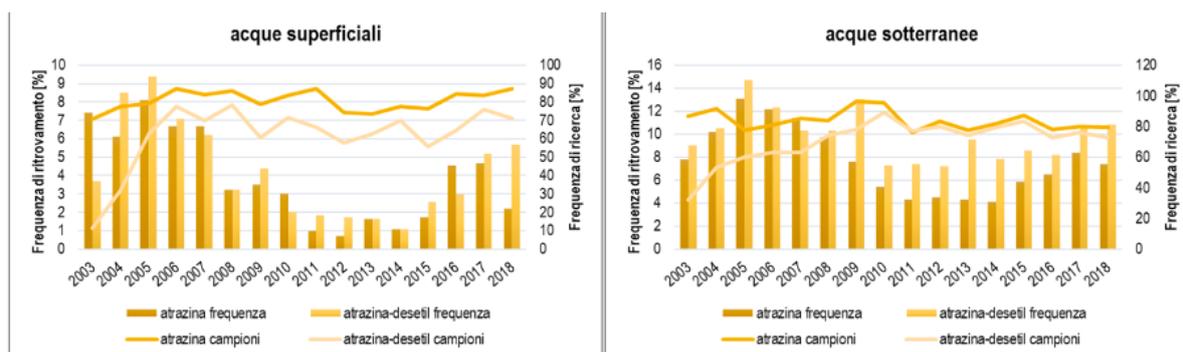


Fig. 4: Trend di atrazina e atrazina-desetil secondo le indagini ISPRA nelle acque del nostro territorio.

Anche nell'edizione 2022 del rapporto nazionale pesticidi nelle acque condotto da Ispra, la frequenza di ritrovamento dell'atrazina e dei suoi metaboliti risulta elevata. Ad esempio, la presenza di atrazina-desetil desisopropil nelle acque sotterranee nel 2% dei casi supera lo Standard di Qualità Ambientale.

La presenza di Atrazina è stata riscontrata anche nel mar Adriatico in uno studio condotto da Andreini nel 2022 e nelle acque greche del Mar Egeo da Nodler et al. nel 2013. Nello specifico, nel primo caso le concentrazioni erano ridotte (non superando il valore limite per l'acqua potabile di  $<0,1 \mu\text{g/L}$ ), mentre nelle acque del Mar Egeo le concentrazioni erano elevate.

Risultati simili vengono riscontrati in tutto il mondo. Infatti, indagini sul campo hanno dimostrato che l'atrazina è comunemente rilevata nelle acque superficiali del Brasile e nei corsi d'acqua del Nord America (de Andrade et al., 2019).

#### **1.4 Tossicodinamica ed effetti sulle specie selvatiche**

Negli anni passati sono stati condotti diversi studi sugli effetti dell'atrazina sulle specie selvatiche. Questo perché, come visto precedentemente l'atrazina è classificata come un interferente endocrino, causando quindi effetti avversi sulla salute degli organismi o della loro progenie. Una revisione della letteratura fornisce infatti ampie prove che l'atrazina a diverse concentrazioni, può influenzare lo sviluppo, il comportamento e la riproduzione di molte specie presenti nell'ambiente acquatico e non. Ad esempio, è stato verificato come l'atrazina riduca il metabolismo cellulare e influenzi la formazione di specie reattive dell'ossigeno alterando l'attività antiossidante in pesci, crostacei e larve di insetti. È noto, inoltre, che l'atrazina causi danni epatici, in quanto il fegato è l'organo principale per il metabolismo di questa sostanza nei mammiferi (Singh et al., 2017). Può inoltre indurre ermafroditismo anche a concentrazioni ridotte (Wang et al., 2019).

L'effetto maggiormente riscontrato riguarda la capacità dell'atrazina di indurre l'aromatasi causando una produzione inappropriata di estrogeni con conseguente demascolinizzazione delle gonadi maschili (Hayesa et al., 2011). In anfibi, rettili e mammiferi l'esposizione all'atrazina provoca un aumento della dimensione dei tubuli testicolari e la perdita di cellule del Sertoli e di cellule germinali. Sempre connesso a questo effetto di demascolinizzazione in pesci, anfibi, rettili e mammiferi è possibile riscontrare una riduzione significativa della secrezione di androgeni. Questi ormoni sono fondamentali per la differenziazione e lo sviluppo delle cellule germinali, dimostrando come siano possibili le modifiche subite dalle gonadi maschili.

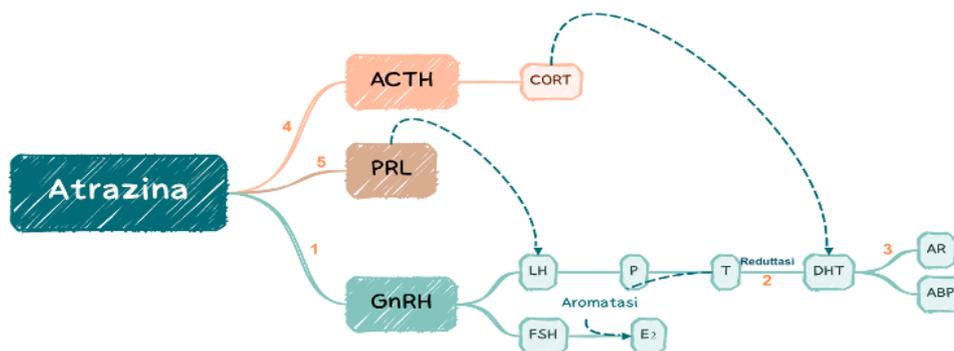
Già nel 2011 Hayes et al hanno individuato molteplici meccanismi per spiegare la ridotta sintesi di androgeni negli organismi esposti ad atrazina, i quali coinvolgono diversi ormoni o recettori. Come si può osservare dalla figura numero 5 i meccanismi possono essere:

1. Inibizione dei picchi degli ormoni ipofisari FSH e LH, inibendo la sintesi dell'ormone di rilascio delle gonadotropine GnRH indispensabile per la produzione di androgeni.
2. Inibizione dell'enzima  $5\alpha$  reduttasi causando una maggiore azione dell'aromatasi sul testosterone che verrà convertito in estradiolo
3. Inibizione delle interazioni tra diidrotestosterone e il recettore degli androgeni

4. Aumento secrezione dell'ormone adreno-corticotropo dell'ipofisi con conseguente aumento della concentrazione di progesterone. Quest'ultimo consuma GnRH, LH e FSH con conseguente riduzione della produzione di androgeni.
5. Riduzione della secrezione di prolattina indispensabile per l'espressione del recettore LH, compromettendo la normale produzione di testosterone.

Fig. 5: Meccanismi d'azione dell'atrazina sulle gonadi maschili. I numeri sui percorsi si riferiscono ai meccanismi elencati nel testo.

ABP = proteina legante gli androgeni, ACTH = ormone adrenocorticotropo, AR = recettore degli androgeni, CORT = cortisolo, DHT = diidrottestosterone, E2 = 17 $\alpha$  estradiolo, FSH = ormone follicolo stimolante, GnRH = ormone stimolante la gonadotropina, LH = ormone luteinizzante, P = progesterone, PRL = prolattina, e T = testosterone.



Tutti questi processi hanno come risultato finale un aumento del numero di femmine per le specie esposte. Questo cambiamento nel rapporto tra sessi causerà una modifica nel tasso di riproduzione della specie nell'ambiente.

Le vie di esposizione della fauna selvatica all'atrazina sono diverse in base all'habitat che occupano (Fig. 6). Per la fauna terrestre queste sono principalmente il consumo di cibo o acqua contaminati, mentre per quella acquatica il rischio è più elevato. Vista questa differente esposizione tratteremo l'effetto dell'atrazina sulle specie acquatiche nel capitolo successivo. Per quanto riguarda, invece, vertebrati e invertebrati non acquatici la letteratura è più ridotta ma non mancano gli studi per capire l'effetto dell'atrazina su di essi. Alcuni studiosi si sono ad

esempio concertati sull'effetto dell'atrazina sul lombrico della Nigeria e per quanto riportato da Singh et al. (2017) possiamo leggere come il composto risulta tossico per questi animali. Un altro gruppo di viventi fortemente esposti all'atrazina sono i roditori che per questo subiscono diversi danni, come ad esempio la riduzione della motilità e del numero di spermatozoi nei ratti maschi ma anche l'interruzione dell'omeostasi del calcio che induce immunotossicità (Singh et al., 2017).

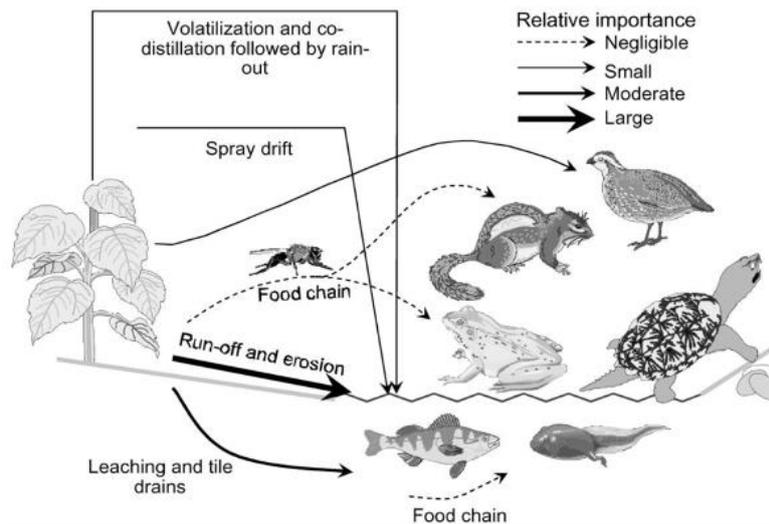


Fig. 6: Vie di esposizione della fauna selvatica all'atrazina. (da Solomon et al. 2008).

Gli effetti dell'atrazina sono stati osservati anche come diminuzione degli enzimi epatici nei mammiferi adulti (Singh et al., 2017). Inoltre, sono stati osservati effetti anche sulla salute umana, come ad esempio la correlazione tra l'insorgenza del linfoma non-Hodgkin e l'esposizione al composto (Schroeder et al. 2001).

### 1.5 Effetti tossici dell'atrazina sulle specie marine

Vista l'elevata persistenza dell'atrazina in acqua, le specie acquatiche sono fortemente colpite dalla presenza di questo inquinante. Uno dei primi indicatori di possibile contaminazione è la diminuzione dell'ossigeno disciolto e del pH, correlata alla diminuzione della produzione primaria (Andreini, 2022). È stato inoltre osservato un aumento della concentrazione di calcio nei corpi idrici dopo l'esposizione. Ciò è dovuto alla riduzione della precipitazione di carbonato di calcio risultante dalla diminuzione del pH (Graymore et al., 2001). La comunità algale risulta essere quella maggiormente colpita dalla presenza di atrazina con riduzione della biomassa e dell'abbondanza della specie (Graymore et al., 2001). Si può inoltre osservare che le alghe

esposte ad atrazina presentano un rapporto C:N ridotto, in quanto l'inibizione della fotosintesi riduce la capacità di fissare il C con effetto sugli organismi che si cibano di queste alghe. Questo si può osservare nello studio condotto da Religia et al su *Daphnia magna* nel quale il numero di prole non vitale aumentava se alle madri venivano somministrate alghe esposte all'inquinante. Una risposta simile la possiamo osservare analizzando il fitoplancton che in presenza di atrazina ridurrà la crescita e il numero di specie presenti nel corso d'acqua (Graymore et al., 2001, Religia et al., 2019).

La riduzione o la perdita della comunità algale comportano effetti negativi sulla comunità di gasteropodi. Su questa classe animale sono stati condotti pochi lavori sugli effetti dell'atrazina; tuttavia, essendo molte specie dipendenti dalla comunità algale si potrebbe osservare una riduzione dell'abbondanza di alcune specie. Questo comporterebbe una modifica nella struttura della comunità di gasteropodi nelle acque inquinate (Graymore et al., 2001).

Anche per anfibi e crostacei la letteratura non è abbondante e si concentra principalmente sulle fasi giovanili. Così come per i gasteropodi, le specie di crostacei che si nutrono di alghe, la cui crescita è inibita dall'atrazina, possono essere influenzate negativamente dalla presenza dell'inquinante (Graymore et al., 2001). Per gli anfibi la fase più sensibile è quella giovanile che può avere una sopravvivenza ridotta o presentare mutazioni del DNA se nel corso d'acqua è presente l'atrazina (Graymore et al., 2001, Gonçalves et al., 2017). Diversi studi sugli anfibi hanno inoltre associato l'atrazina alla presenza di maschi "femminilizzati" in natura (Hayes et al., 2011).

I pesci, in presenza di atrazina possono subire modifiche fisiologiche e comportamentali anche a concentrazioni ridotte. In questo gruppo di vertebrati l'atrazina viene metabolizzata nei reni ed escreta dalle branchie. Quest'ultime possono subire dei danni, in quanto l'atrazina può denaturare l'epitelio dei filamenti branchiali, interrompendo la normale funzione di regolazione degli ioni (Graymore et al., 2001). Può inoltre provocare cambiamenti nei tessuti renali (Graymore et al., 2001). Anche i parametri ematologici come l'emoglobina, l'ematocrito e i globuli rossi sono significativamente ridotti dalla tossicità dell'atrazina nei pesci (Singh et al., 2017). Ad esempio, il pesce d'acqua dolce *Prochilodus lineatus* esposto all'atrazina ha mostrato danni genetici in diverse cellule, alterazioni morfologiche delle branchie e una ridotta attività degli enzimi antiossidanti (de Andrade et al., 2019).

### **1.6 Effetti tossici dell'atrazina sui rettili**

Tra gli animali l'ordine Chelonia può essere considerato quello maggiormente suscettibile alla presenza di atrazina. Tuttavia, la letteratura sulla ricerca sugli effetti nocivi dell'esposizione

all'atrazina sulle tartarughe è ridotta. Ricerche invece condotte su specie di acqua dolce dimostrano come l'atrazina abbia diversi effetti negativi su questi organismi. Il primo una riduzione del corretto funzionamento del sistema immunitario come dimostrato da Soltanian nel 2016. In questo studio infatti hanno verificato come in individui di *Trachemys scripta elegans* l'esposizione all'atrazina causi una diminuzione di leuciti e della fisiologica risposta fagocitaria e macrofagica, rendendo così i soggetti facilmente attaccabili da infezioni. Il secondo effetto studiato riguarda invece la capacità dell'atrazina di intervenire nello sviluppo dei testicoli e di influenzare così la riproduzione. Infatti, anche in questo ordine l'erbicida può agire demascolinizzando gli individui e impedendo così la normale riproduzione (Hayes et al.; 2011 da articolo prof). Questo effetto si può osservare già nella prime fasi dello sviluppo, se le uova sono state deposte in un substrato inquinato. Ad esempio, in uno studio condotto nel 2012 da Neuman Lee le uova di *Graptemys ouachitensis* e *G. pseudogeographica* sono state esposte ad atrazina durante il periodo di incubazione. In seguito alla schiusa alcuni individui mostravano anomali nei testicoli. Inoltre, le tartarughe derivanti dalle uova trattate con atrazina avevano inibito il comportamento di fuga dal nido e ridotta la sopravvivenza dopo la schiusa. In un altro studio condotto sull'influenza dell'esposizione al composto delle uova si può osservare come l'atrazina causi cambiamenti significativi nell'espressione genica ipotalamica in *Chelydra serpentina* (Russart et al.; 2016).

## 2. Cenni di biologia delle tartarughe

### 2.1 Sistematica ed evoluzione

Ampiamente distribuite in tutte le acque del mondo ad eccezione di quelle artiche e antartiche, le tartarughe marine viventi comprendono membri di due famiglie, Cheloniidae e Dermochelyidae (Figura 7). Alla prima appartengono *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys kempii*, *Lepidochelys olivacea* e *Natator depressus*, sei specie dotate di guscio duro. A quella dei Dermochelyidae, appartiene solo *Dermochelys coriacea* dotata di carapace costituito da piccole placche ossee disposte a mosaico, ricoperte da una pelle cuoiosa e liscia, spessa ma flessibile (Meylan, 2006). Delle 7 specie esistenti, sei sono classificate come in pericolo o in pericolo critico (WWF, 2006).

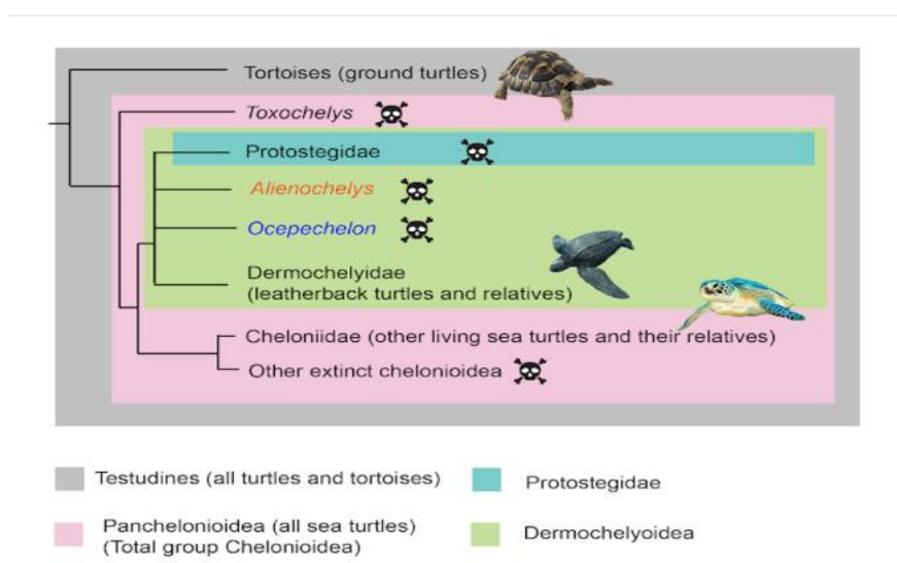


Figura 7: Relazioni di parentela delle tartarughe secondo de Lapparent de Broin et al., 2014

Nonostante la loro origine rimane spesso controversa, le tartarughe sono tra i rettili più antichi viventi sulla Terra in quanto compaiono per la prima volta nella documentazione fossile, circa 225 milioni di anni fa durante il Cretaceo. Le forme completamente marine apparvero però circa 150 milioni di anni fa (Bowen, 1993), quando i grandi rettili dominavano il pianeta.

Nel Mediterraneo, ad oggi, si trovano tre specie (IUCN):

- *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761) = Chiamata anche tartaruga liuto è tra le specie esistenti quella che raggiunge dimensioni maggiori arrivando a pesare fino a 500 kg. A differenziarla dalle altre specie è la presenza di un guscio coriaceo. Presentano un pannicolo adiposo molto sviluppato e questo fa sì che abbiano il più ampio range di

distribuzione, arrivando anche ad alte latitudini. Si riproducono ogni 2/4 anni prevalentemente in centro-sud America.

- *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) = Detta anche Tartaruga comune per la sua ampia distribuzione è una specie solitaria e migratrice. Si nutrono di prede dal guscio duro come cirripedi e molluschi e per questo presentano potenti muscoli della mascella (marine\_turtles). Frequentano aree calde e temperate con acque basse e tranquille. Hanno ciclo riproduttivo di 2/4 anni e nidificano in nord Africa, Grecia e in Calabria.
- *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) = Visto il colore verde del suo carapace è chiamata comunemente Tartaruga Verde. Gli individui di questa specie sono ampiamente distribuiti nelle acque tropicali e subtropicali di tutto il mondo. A differenza delle altre tartarughe marine i piccoli hanno un regime alimentare onnivoro mentre a partire dai 20-25 cm di grandezza si nutrono di fanerogame e alghe. Si riproducono ogni due anni.

Le altre specie esistenti sono:

- *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) = Tra le specie viventi sono tra le più piccole arrivando a pesare al massimo 60 kg. Si trovano in aree tropicali e subtropicali, frequentando acque basse e tranquille ma possono anche avere fase oceanica. Sono classificate come in pericolo critico essendo state cacciate per diverso tempo.
- *Lepidochelys kempii* (Garman, 1880) = È la specie più piccola con una dimensione media di 70 cm e un peso di 40 kg. Presentano un areale ristretto, frequentando aree con acque basse e fondale fangoso e sabbioso. Si riproducono ogni 1-3 anni e nidificando solo lungo un piccolo tratto del Golfo del Messico.
- *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) = Il loro nome deriva dalla conformazione della ranfoteca, in quanto la parte superiore e inferiore sono imbricate tra loro. Frequentano barriere coralline, aree rocciose, estuari e lagune, tropicali e subtropicali. È stata sfruttata per molto tempo e nonostante l'ampia distribuzione il numero di siti di nidificazione è ridotto.
- *Natator depressus* (Garman, 1880) = Presentano un dorso piatto e possono raggiungere un metro di lunghezza. Si trovano solo in acque torbide della zona settentrionale dell'Australia dove nidificano ogni due-tre anni.

Nonostante le differenze tra le sette specie oggi esistenti, ritroviamo alcune caratteristiche anatomiche comuni. Tra queste la presenza del carapace e del piastrone è quella che le distingue da tutte le altre specie animali esistenti. L'origine di questa struttura è stata studiata tramite l'analisi anatomica dei resti fossili di *Eunotosaurus africanus*, risalenti a circa 260 milioni di

anni fa che hanno permesso di chiarire le prime fasi di evoluzione del guscio della tartaruga, avendo esso un'origine completamente diversa da quella di tutti gli altri animali (Lyson, 2013). Carapace e piastrone, infatti, derivando dalla fusione di vertebre e costole e sono formate da una capsula ossea interna e da un rivestimento esterno composto da piastre cornee o pelle ispessita. Un'altra caratteristica propria delle tartarughe marine è la ghiandola del sale, che permette di eliminare l'accesso di sodio quando l'osmolarità del sangue aumenta in seguito all'ingestione di acqua (Poli, 2018).

## **2.2 Alimentazione**

Le tartarughe marine generalmente iniziano la vita come carnivori pelagici o onnivori ma da adulti mostrano un'ampia gamma di ecologie alimentari (Jones, 2012), motivo per il quale la forma della ranfoteca varia da specie a specie. *Chelonia mydas* possiede mascelle serratili e seghettate come adattamento ad una dieta vegetariana, *Eretmochelys imbricata* è fornita di mascella appuntita per catturare le prede nelle fessure mentre *Dermochelys coriacea* ha mascelle adatte per afferrare organismi a corpo molle. Nelle restanti tre specie le mascelle sono adattate per frantumare vista la dieta composta da organismi dotati di guscio duro.

Per poter sopperire alla problematica dell'alimentazione in acqua, gli individui utilizzano la suzione per catturare le loro prede abbassando lo ioido. Questo crea una pressione negativa all'interno della cavità buccofaringea che comporta l'ingresso del cibo (Jones, 2012). Le prede però vengono solo in parte risucchiate in quanto sono catturate da una rapida e simultanea espansione del collo e della testa, una tecnica definita ram feeding.

La successiva ingestione viene poi favorita dalla presenza di numerose papille cheratinizzate orientate in modo da impedire il reflusso del cibo. Come in tutti i rettili, lo stomaco è formato da una struttura tubulare nella quale sboccano le ghiandole deputate alla secrezione di enzimi indispensabili per la digestione. Nello stomaco delle tartarughe marine, è stata rilevata la presenza di gastroliti, pietre di varia grandezza utili per la frammentazione dei tessuti duri (Poli, 2018).

## **2.3 Riproduzione**

In tutte le specie i sessi sono separati con un discreto dimorfismo sessuale tra gli individui (Cordero, 2018). Generalmente, questo si manifesta con differenze morfologiche ed anatomiche riguardanti la forma del piastrone e della coda e la posizione della cloaca. Solitamente i maschi presentano una coda lunga e robusta, un piastrone concavo e un unico organo copulatore nella

parte posteriore della cloaca. Le femmine invece hanno il piastrone piatto, la coda corta e la cloaca vicino al margine del piastrone. Nelle tartarughe il sesso degli individui viene determinato dalla temperatura di incubazione alla quale le uova si trovano durante il primo trimestre. In tutte le specie studiate, la temperatura pivot che influenza il sesso dei nascituri è compresa tra 26 e 31°C (Wei, 2021). Temperature inferiori produrranno covate con molti più maschi, mentre temperature elevate produrranno covate a prevalenza femminile (Lawson, 2019).

Il ciclo riproduttivo delle tartarughe marine è particolare e si articola in diversi habitat. Quando le uova si schiudono, dopo un periodo di incubazione di circa 1,5 o 2 mesi, i piccoli si dirigono verso l'acqua. Inizia quindi la così detta fase giovanile oceanica sulla quale si sa poco vista la difficoltà di monitorare individui così piccoli. Una volta raggiunta la maturità sessuale si spostano nelle aree di alimentazione, dove iniziano la loro fase adulta e la vita riproduttiva. Quando arriva la stagione della riproduzione, tipicamente all'inizio della primavera, nelle femmine si verifica il picco di estrogeni che induce la migrazione verso i luoghi di nidificazione e la definitiva maturazione dei follicoli ovarici. Durante questa stagione le femmine accettano il corteggiamento di diversi maschi, e quindi la prole di una singola femmina può provenire da maschi diversi (Jensenet, 2006). Dopo l'accoppiamento le femmine possono conservare nell'ovidutto superiori spermatozoi vitali, anche per lunghi periodi (Del Campo, 2019). Dopo circa due settimane dall'accoppiamento nelle femmine aumentano i livelli dell'ormone LH che induce un massiccio rilascio di progesterone utile durante l'ovodeposizione. Questa fase avviene nella stessa spiaggia in cui l'individuo femmina è nato e per questo le tartarughe sono definite fillopatriche. Questa capacità di tornare nella spiaggia natale è stata documentata tramite lo studio del DNA nucleare e mitocondriale, con alcune specie più fillopatriche di altre (Bowen, 2007). Questo è possibile tramite la capacità degli individui di memorizzare la composizione chimica della spiaggia, il campo magnetico e la direzione delle onde (Plotkin, 2007). Una volta deposte le uova, le buche vengono ricoperte attentamente e la femmina riprende la sua normale attività.

### 3. Scopo della tesi

Il lavoro svolto in questa tesi si pone l'obiettivo di ricercare la presenza di atrazina nel flusso circolatorio delle tartarughe marine comuni *Caretta Caretta*, spiaggiate sulle coste nord-occidentale dell'Adriatico. Abbiamo scelto questa sostanza vista la sua elevata persistenza nell'acqua e visto il danno che potrebbe causare agli organismi essendo classificata come interferente endocrino (UE-Strategy [EC, 1999], [EC, 2000]). Inoltre, l'atrazina risulta essere un composto ancora nuovo negli studi di tossicologia dei chelonidi e per questo degno di ulteriori indagini. Ricordiamo per giunta che in Europa l'atrazina non è più utilizzata da diversi anni; pertanto, il possibile ritrovamento dopo oltre 20 anni dovrebbe farci riflettere.

Fra tutte le possibili specie di organismi abbiamo scelto le tartarughe *Caretta Caretta* in quanto, come detto precedentemente, l'ordine Chelonia è fortemente esposto al composto. Infatti, già gli embrioni in via di sviluppo, vista la struttura dell'uovo, possono incorporare la molecola se vengono deposte in terreni contaminati (Neuman Lee, 2012). Inoltre, in accordo con lo studio di Douros et al. del 2015 le tartarughe possono essere considerate specie sentinelle per il rilevamento degli erbicidi agricoli all'interno degli ecosistemi a causa della loro durata di vita, della fedeltà al sito e della tolleranza alla maggior parte dei contaminanti ambientali.

Il seguente studio risulta utile per verificare lo stato di salute del bacino del mar Mediterraneo e della popolazione di *Caretta caretta* che lo abita, visto che esiste solo uno studio sulla presenza o meno di questa sostanza nel sangue delle tartarughe marine in Italia (Andreini, 2022). Per questo con i dati raccolti implementeremo i pochi dati presenti per permettere, successivamente di valutare la possibile esposizione degli esemplari che si trovano nella costa romagnola.

## 4. Materiali e metodi

### 4.1 Campionamento

Lo studio è stato effettuato su campioni di siero donati dalla Fondazione Cetacea di Riccione. I campioni sono stati prelevati dalla vena giugulare dell'animale, etichettati e conservati nel congelatore fino alle analisi di laboratorio.

Dei campioni donati da Fondazione cetacea, alcuni sono stati eliminati dalle analisi in quanto doppi, analizzando alla fine 88 campioni prelevati tra il 2018 e il 2022 (Tab 1).

<b>Tabella 1</b> Elenco dei campioni di siero di tartaruga analizzati		
<b>Nome</b>	<b>Mese</b>	<b>Anno</b>
Nina	Mag	2018
Nina	Mag	2018
Elia	Lug	2019
Licia	Dic	2019
Alessia	Giu	2019
Pietro	Giu	2019
Anna	Ago	2019
Franca	Nov	2019
Priscilla	Febb	2019
Golia	Sett	2019
Mary	Giu	2019
Peggy	Apr	2019
Tartaricone	Giu	2019
Beppe	Mar	2019
Loris	Giu	2019
Faustina	Ago	2019
Babi	Mar	2019
Giulia II	Ago	2019
Martina	Nov	2019
Golia	Sett	2019
Simone	Nov	2019
Lucas Tobia	Dic	2019
Ginevra	Mag	2019
Vlad	Ago	2019
Lucio	Sett	2020
Gioacchino	Ott	2020
Teodora	Dic	2020
Spartaco	Ott	2020
Mafalda	Febb	2020

<b>Enrietta</b>	Ott	2020
<b>Sofia</b>	Dic	2020
<b>Mohana</b>	Nov	2020
<b>Vittorio</b>	Dic	2020
<b>Giustina</b>	Gen	2020
<b>Loco</b>	Nov	2020
<b>Jasmine</b>	Nov	2020
<b>Lana</b>	Nov	2020
<b>Selvaggia</b>	Gen	2020
<b>Reziah</b>	Gen	2020
<b>Mateus</b>	Gen	2020
<b>Cassandra</b>	Apr	2020
<b>Vanessa</b>	Apr	2020
<b>Elisabetta</b>	Apr	2020
<b>Giuseppe</b>	Ago	2020
<b>Daiano</b>	Gen	2020
<b>Gilda</b>	Nov	2020
<b>Alessia</b>	Dic	2021
<b>Sandrina</b>	Dic	2021
<b>Coco</b>	Sett	2021
<b>Lucia</b>	Dic	2021
<b>Fortunata</b>	Sett	2021
<b>Rosa</b>	Ott	2021
<b>Annalisa</b>	Nov	2021
<b>Luana</b>	Sett	2021
<b>Emily</b>	Ott	2021
<b>Mila</b>	Ott	2021
<b>Nicola</b>	Ott	2021
<b>Robi</b>	Ott	2021
<b>Irene</b>	Ott	2021
<b>Adria</b>	Mar	2021
<b>Stefano</b>	Sett	2021
<b>Lauram</b>	Ott	2021
<b>Francilina</b>	Ott	2021
<b>Stefano</b>	Ott	2021
<b>Alfredo</b>	Nov	2021
<b>Valentino</b>	Ott	2021
<b>Michella</b>	Mar	2021
<b>Lucia</b>	Lug	2022
<b>Luna Rossa</b>	Ott	2022
<b>Paolo</b>	Apr	2022
<b>Pino Pino</b>	Lug	2022
<b>Reef</b>	Gen	2022

<b>Cohiba</b>	Giu	2022
<b>Laura</b>	Ott	2022
<b>Enzo</b>	Apr	2022
<b>Gianni</b>	Mar	2022
<b>Orso</b>	Mar	2022
<b>Rosa</b>	Mar	2022
<b>Irene</b>	Mag	2022
<b>Brunella</b>	Gen	2022
<b>Pina</b>	Lug	2022
<b>Pino Pino</b>	Lug	2022
<b>Laura</b>	Lug	2022
<b>Viva</b>	Giu	2022
<b>Tarti</b>	Apr	2022
<b>Laura</b>	Giu	2022
<b>Camilla</b>	Apr	2022
<b>Mordicchia</b>	Mar	2022

#### 4.2 Metodica analitica

I campioni di siero sono stati testati per l'atrazina utilizzando il metodo ELISA, un metodo cromatografico antigene-anticorpo (ABNOVA, [www.abnova.com](http://www.abnova.com)). Questa metodologia si basa sulla competizione tra l'atrazina da esaminare e il coniugato atrazina-fosfatasi alcalina. Il campione contenente l'atrazina e il coniugato atrazina-fosfatasi alcalina, vengono infatti aggiunti ai pozzetti della microtitolazione e competono per il legame con un numero limitato di siti anticorpali. Dopo l'incubazione, ogni pozzetto viene risciacquato per rimuovere i componenti non legati. L'attività enzimatica legata viene quindi misurata mediante l'aggiunta di un substrato cromogenico e l'utilizzo di uno spettrofotometro. L'intensità del colore sviluppato è infatti inversamente proporzionale alla concentrazione di atrazina nel campione. La concentrazione è poi calcolata sulla base di una curva standard. Il volume di sangue utilizzato e posto in ciascun pozzetto era di 50  $\mu$ L.

#### 4.3 Elaborazione statistica

I dati sulla concentrazione di atrazina ottenuti tramite il saggio ELISA sono stati analizzati statisticamente utilizzando il software STATISTICA 14.1.0.8 (TIBCO Software Inc., USA).

Ai dati ottenuti dalle nostre analisi abbiamo aggiunto ulteriori valori di concentrazione di atrazina presente del siero di tartaruga marina ottenuti da un'analisi condotta su individui prelevati nel 2021 nel Mar Adriatico (Andreini, 2022).

La prima analisi è stata condotta per vedere se erano presenti differenze significative nella concentrazione (ng/mL) di atrazina tra gli anni. La seconda analisi invece è stata condotta per vedere se erano presenti differenze tra i mesi.

In entrambi i casi le analisi statistiche utilizzate per verificare la presenza di tali differenze è il test di Kruskal-Wallis. Abbiamo scelto di utilizzare questo test e non l'ANOVA in quanto i dati non sono distribuiti normalmente e anche le possibili trasformazioni non ci permettono di ottenere l'omogeneità delle varianze.

## 5. Risultati e discussione

I risultati ottenuti dalle nostre analisi sono riportati nella tabella numero 2, mentre nella tabella numero 3 troviamo i valori ottenuti della precedente analisi. In entrambe le analisi abbiamo trovato un'evidente positività dei soggetti all'atrazina. Questo dovrebbe destare preoccupazione.

<b>Tabella 2 Concentrazioni di atrazina (ng/ml) nei campioni di plasma delle tartarughe</b>	
<b>Nome</b>	<b>Conc. Atrazina ng/ml</b>
Nina	93,6
Nina	209,0
Elia	54,9
Licia	91,90
Alessia	0,00
Pietro	65,90
Anna	89,4
Franca	57,2
Priscilla	43,2
Golia	122,4
Mary	150,6
Peggy	18,2
Tartaricone	44,3
Beppe	28,1
Loris	188,3
Faustina	40,1
Babi	12,6
Giulia II	229,2
Martina	69,5
Golia	152,9
Simone	15,9
Lucas Tobia	16,8
Ginevra	21,5
Vlad	22,2
Lucio	42,5
Gioacchino	12,9
Teodora	152,9
Spartaco	22,6
Mafalda	164,8
Enrietta	36,8
Sofia	24,4
Mohana	34,2
Vittorio	282,9
Giustina	37,3
Loco	15,7
Jasmine	48,5

<b>Lana</b>	17,4
<b>Selvaggia</b>	87,2
<b>Reziah</b>	209,9
<b>Mateus</b>	74,3
<b>Cassandra</b>	34,70
<b>Vanessa</b>	8,0
<b>Elisabetta</b>	102,6
<b>Giuseppe</b>	30,8
<b>Daiano</b>	0,0
<b>Gilda</b>	99,7
<b>Alessia</b>	27,3
<b>Sandrina</b>	41,0
<b>Coco</b>	36,8
<b>Lucia</b>	30,1
<b>Fortunata</b>	37,0
<b>Rosa</b>	18,1
<b>Annalisa</b>	129,3
<b>Luana</b>	17,5
<b>Emily</b>	56,0
<b>Mila</b>	215,4
<b>Nicola</b>	0,0
<b>Robi</b>	2,80
<b>Irene</b>	205,5
<b>Adria</b>	69,7
<b>Stefano</b>	22,1
<b>Lauram</b>	16,8
<b>Francilina</b>	15,7
<b>Stefano</b>	28,3
<b>Alfredo</b>	55,8
<b>Valentino</b>	46,8
<b>Michella</b>	26,1
<b>Lucia</b>	63,6
<b>Luna Rossa</b>	130,7
<b>Paolo</b>	55,5
<b>Pino Pino</b>	48,9
<b>Reef</b>	12,0
<b>Cohiba</b>	41,9
<b>Laura</b>	20,4
<b>Enzo</b>	20,4
<b>Gianni</b>	13,3
<b>Orso</b>	20,6
<b>Rosa</b>	14,0
<b>Irene</b>	111,6
<b>Brunella</b>	155,1
<b>Pina</b>	75,0
<b>Pino Pino</b>	78,2
<b>Laura</b>	24,3
<b>Viva</b>	6,8
<b>Tarti</b>	150,6
<b>Laura</b>	29,0

<b>Camilla</b>	21,0
<b>Mordicchia</b>	65,7

<b>Tabella 3 Concentrazioni di atrazina (ng/ml) nei campioni di plasma delle tartarughe</b>	
<b>Animale</b>	<b>Atrazina ng/ml siero</b>
<b>Antonio</b>	36,4
<b>Nasnada</b>	35,2
<b>Flaminia</b>	24,9
<b>Fortuna</b>	32,5
<b>Valentino</b>	35,2
<b>Virgilia</b>	33,0
<b>Magica</b>	31,4
<b>Matteo</b>	38,7
<b>Margherito</b>	37,3
<b>Fazio</b>	38,4
<b>Carolina</b>	26,0
<b>Mirka</b>	29,0
<b>Mario</b>	36,7
<b>Beatrice</b>	35,7
<b>Zanna</b>	32,9
<b>Marco</b>	33,0
<b>Michela</b>	38,9
<b>Ilenia</b>	17,2
<b>Jenny</b>	20,6
<b>Alberto</b>	31,9
<b>Lucia</b>	38,4
<b>Francesca</b>	18,3
<b>Malo</b>	33,1
<b>Milva</b>	34,7
<b>Julio</b>	18,9

Le analisi statistiche effettuate sui dati raccolti si ponevano l'obiettivo di vedere se erano presenti differenze significative tra gli anni e i mesi di raccolta dei campioni. I dati ottenuti analizzando la differenza tra gli anni sono riportati nella tabella numero 4, mentre quelli dei mesi nella tabella numero 5. In entrambi i casi non abbiamo riscontrato differenze significative tra i gruppi. Anche dai grafici sottostanti (grafico 1 e 2), si può osservare come non sia possibile identificare una correlazione tra la concentrazione sierica di atrazina che abbiamo rilevata e l'anno/mese di prelievo. È possibile notare, però, come in alcuni mesi dell'anno, soprattutto quelli invernali, la concentrazione sierica di atrazina risulti essere più elevata. Questo in accordo con i periodi di utilizzo dei diserbanti in agricoltura. Infatti, nelle colture di cereali nelle quali atrazina è maggiormente utilizzata il diserbo avviene nel periodo da febbraio a maggio. In particolare, i trattamenti erbicidi pre e post emergenza vengono effettuati generalmente a

febbraio, mese nel quale il valore di concentrazione di atrazina risulta essere più elevato. La grande variabilità di concentrazione però riscontrata tra gli individui, anche all'interno dello stesso mese, fa sì che dall'analisi statistica non risultino differenze significative.

La mancanza di differenze significative di concentrazione per anno dovrebbe destare particolare attenzione. Ricordiamo infatti, che l'uso di atrazina in Europa è vietato da più di 20 anni, e questo ci fa capire l'elevata persistenza del composto. Osservando il grafico numero 1, è possibile notare come il 2018 risulti essere l'anno in cui la concentrazione di atrazina trovata è maggiore, ma come per il caso dei mesi la grande variabilità all'interno degli anni fa sì che statisticamente non ci siano differenze.

**Tabella n. 4: Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Conc. ng/ml**

Independent (grouping) variable: Anno

Kruskal-Wallis test:  $H(4, N= 113) = 7,171312$   $p = ,1271$

Depend. Conc. ng/ml	Code	Valid N	Sum of Ranks	Mean Rank
2018	2018	2	203,00	101,50
2019	2019	22	1413,00	64,23
2020	2020	22	1337,50	60,80
2021	2021	46	2299,00	49,50
2022	2022	21	1188,50	56,60

**Tabella n. 5: Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Conc. ng/ml**

Independent (grouping) variable: Mese

Kruskal-Wallis test:  $H(11, N= 113) = 12,39129$   $p = ,3350$

Depend. Conc. ng/ml	Code	Valid N	Sum of Ranks	Mean Rank
Sett	1	7	445,00	63,57
Ott	2	15	695,50	46,36
Dice	3	8	509,50	63,69
Febb	4	2	179,00	89,50
Nov	5	10	614,50	61,45
Gen	6	10	615,50	61,55
Apr	7	17	771,50	45,38
Ago	8	6	397,50	66,25
Mag	9	5	397,50	79,40
Lug	10	9	601,00	66,78

Mar	11	14	622,50	44,46
Giu	12	10	592,50	59,25

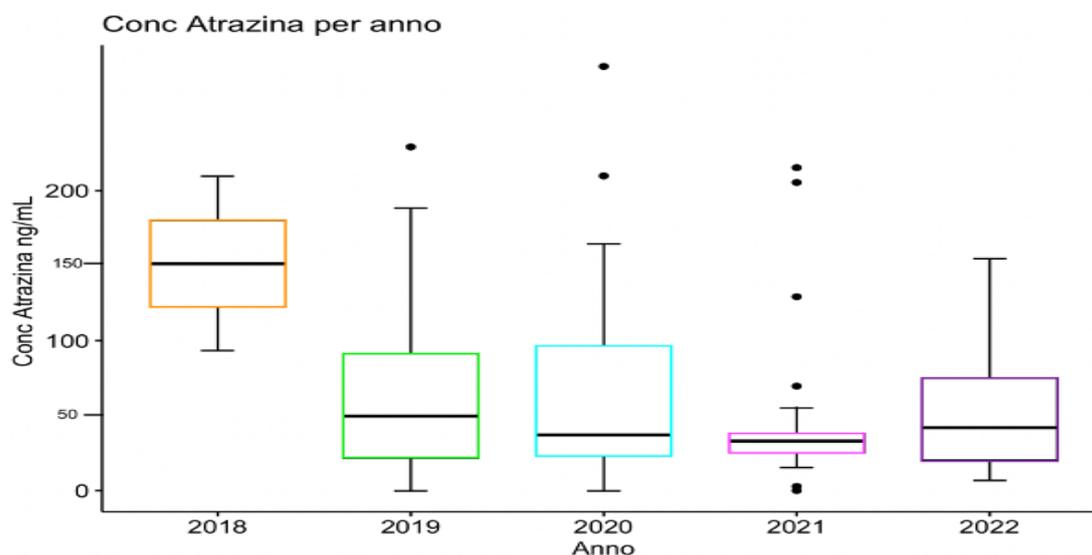


Grafico 1: Rappresentazione grafica dei dati di concentrazione sierica dell'atrazina per anno

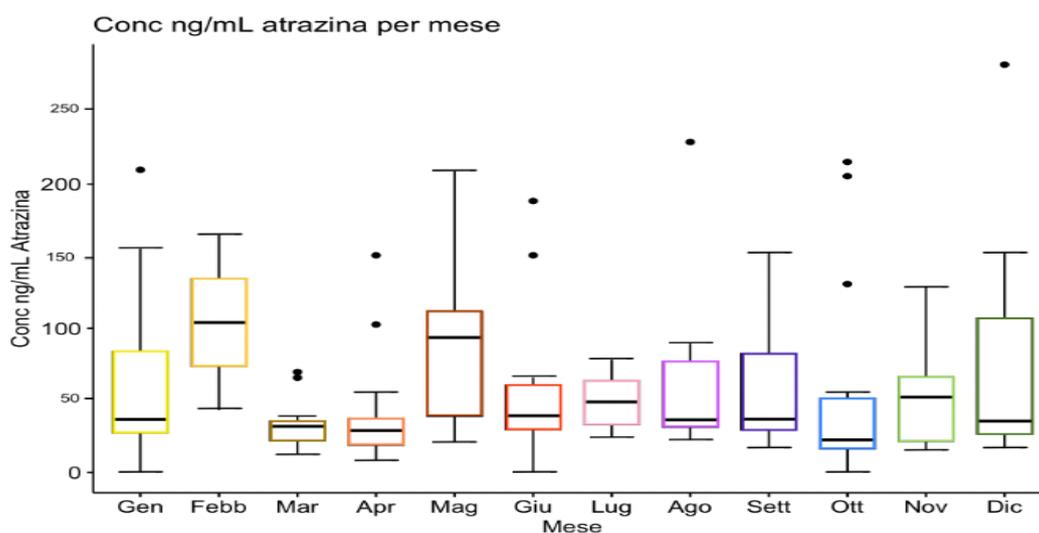


Grafico 2: Rappresentazione grafica dei dati di concentrazione sierica dell'atrazina per mese

Come detto, nei capitoli precedenti, la letteratura sulla presenza di atrazina nel flusso circolatorio delle tartarughe *Caretta Caretta* è inesistente, per questo possiamo solamente confrontare i nostri risultati con quelli ottenuti dalle analisi su un'altra specie di tartarughe, *Lepidochelys kempii*, nel Golfo del Messico in uno studio del 2020 (Montes et al.; 2020). In questo studio veniva ricercata la presenza di diversi composti inquinanti in 79 campioni di sangue tra il 2015 e il 2016. I valori risultanti dall'analisi sono per il 2015: Mediana 2,40 ng/mL, Min. 2,40 ng/mL e Max. 65,35 ng/mL e per il 2016: Mediana 39,26 ng/mL, Min. 11,42 ng/mL

e Max. 83,71 ng/mL. Nel nostro studio, invece i valori trovati sono Mediana 35,7 ng/mL, Min 0,00 ng/mL e Max. 282,9 ng/mL. Dai valori si può notare come la concentrazione di atrazina trovate nel sangue delle tartarughe dai noi analizzate risulti essere molto simile alle concentrazioni medie riscontrate nel 2016 nelle tartarughe *Lepidochelys kempii* del Messico. Va sempre ricordato che in questa zona l'uso di atrazina è ancora consentito a differenza dell'Italia. Quindi quella riscontrata da noi è la coda di una contaminazione storica, mentre in Messico la contaminazione è ancora in atto.

Come giustamente sottolineato da Andreini nello studio del 2021 è importante notare come a differenza degli individui analizzati in Messico, il plasma da noi prelevato viene da individui con una salute non ottimale. Quindi è ragionevole pensare che parte dell'atrazina trovata nel flusso circolatorio possa essere stata rilasciata dagli organi di stoccaggio in risposta alla mobilizzazione delle riserve energetiche lipidiche in situazione di salute non ottimale.

È inoltre da notare come tutti gli studi citati fino ad adesso non mostrano un'esposizione naturale all'atrazina, ma i soggetti analizzati venivano esposti in laboratorio a diverse concentrazioni della sostanza per capirne gli effetti. In natura però l'atrazina non è l'unico contaminante presente nelle acque, anzi in essa è possibile trovare diversi inquinanti. Basti pensare che dall'analisi del sangue di tartarughe *Caretta Caretta* proveniente dall'Italia e dalle Isole Canarie, è stata riscontrata la presenza di PCB, OCP e IPA oltre che di metalli tossici e metalloidi (Bucchia et al., 2015). Questo ci fa pensare che i soggetti analizzati nel seguente studio, oltre ad avere elevate concentrazioni di atrazina nel plasma, potrebbero essere stati esposti ad altri inquinanti. Andrebbe per questo studiato l'effetto di possibili miscele di contaminanti sugli organismi di *Caretta Caretta*.

Avendo riscontrato la presenza di atrazina in questa specie, ci si può aspettare che si trovi anche in individui appartenenti a specie diverse di tartarughe nonché nelle altre classi di organismi che si trovano a vivere in questo ambiente. Viste le premesse fatte sull'effetto dell'atrazina sugli organismi viventi i dati ottenuti dovrebbero destare preoccupazione e farci riflettere. Bisogna infatti ricordare che l'atrazina ha un'elevata persistenza e quindi bisognerebbe trovare un metodo per eliminare l'atrazina già presente nei corpi idrici. Per fare questo, sono state proposte diverse metodologie chimiche e biologiche, tra le quali la più efficiente risultano essere i processi di ossidazione avanzata. Questi si basano sulla produzione del radicale ossidrilico, OH, che reagendo con l'inquinante lo mineralizzano in CO<sub>2</sub> (Balci, 2009). Il processo è stato testato per la depurazione di acque reflue contenente atrazina ed è stato ottenuto un'elevato tasso di

mineralizzazione (Balci, 2009). Un altro approccio che si può provare ad utilizzare è la biodegradazione, considerata una metodologia ecologica ed economica (Ruomeng, 2023).

Anche l'utilizzo delle celle a combustione microbiologica (MFC), contenenti carbone attivo e sabbia di quarzo, per la bonifica del suolo potrebbero ridurre significativamente l'impatto dell'atrazina sui corpi idrici, evitando infatti che la sostanza li raggiunga (Wang, 2023).

Un comportamento diverso dovrebbe, invece, essere attuato nei paesi che ancora utilizzano questa sostanza, per evitare che colpisca organismi non bersaglio. Una soluzione efficace sarebbe l'utilizzo delle nanotecnologie, che potrebbero evitare la contaminazione ambientale utilizzando la micro/nano incapsulazione. Incapsulando il composto, infatti, il principio attivo verrebbe rilasciato in maniera controllata, rimanendo all'interno del sito bersaglio (de Albuquerque, 2020). Sono stati condotti diversi studi per capire se l'atrazina nanoincapsulata fosse meno dannosa per l'ambiente e in tutti i casi questa metodologia è risultata essere un'alternativa più rispettosa dell'ambiente piuttosto che l'erbicida libero (de Albuquerque, 2020).

## **6. Conclusioni**

Dai dati ottenuti nel nostro studio è possibile concludere come l'atrazina sia presente nel flusso circolatorio delle tartarughe marine *Caretta Caretta* che occupano il mar Mediterraneo. Infatti, nonostante in Europa l'utilizzo sia vietato dal 1990, sappiamo che in molti paesi è ancora ampiamente utilizzata e visite le lunghe tratte migratorie che compie questa specie può trovarsi ad occupare acqua ancora soggette a sversamento di atrazina.

La nostra ricerca risulta essere ancora uno studio preliminare, vista la scarsità di dati sulla presenza di atrazina nel flusso circolatorio degli animali del Mediterraneo e per questo la ricerca andrebbe implementata, magari studiando anche il movimento degli animali per capire in quale zona avviene la contaminazione. Si potrebbe, ad esempio pensare ad un censimento periodico sulla presenza negli organismi acquatici di atrazina, oltre che di altre sostanze inquinanti non più utilizzate, per valutarne l'andamento nel tempo. Studi di questo tipo andrebbero poi inseriti nei programmi di conservazione dell'ambiente in quanto la presenza di sostanze inquinanti di questo tipo portano ad una degradazione della matrice ambientale oltre che della fauna presente.

# Bibliografia

- Andreini, R. 2022. Non conventional species as monitor of environmental pollution. Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna.
- Bowen BW, Nelson WS, Avise, JC 1993. A molecular phylogeny for marine turtles: trait mapping, rate assessment, and conservation relevance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(12): 5574-5577.
- Bucchia M, Camacho M, Santos MRD 2015. Plasma levels of pollutants are much higher in loggerhead turtle populations from the Adriatic Sea than in those from open waters (Eastern Atlantic Ocean). *Science of The Total Environment*, 523, 161–169.
- Capel PD, Larson SJ 2001. Effect of scale on the behavior of atrazine in surface waters. *Environmental Science & Technology* 35:648–657
- Cordero GA 2018. Is the Pelvis Sexually Dimorphic in Turtles?. *The Anatomical Record* 301(8):1382-1389
- De Albuquerque FP, de Oliveira JL, Moschini-Carlos V, Fraceto LF 2020. An overview of the potential impacts of atrazine in Aquatic Environments: Perspectives for tailored solutions based on nanotechnology. *Science of The Total Environment* 700:134868
- Douros DL, Gaines KF, Novak JM 2015. Atrazine and glyphosate dynamics in a lotic ecosystem: The common snapping turtle as a sentinel species. *Environmental Monitoring and Assessment*
- Fanti F, 2014, *Biologia, Microbiologia e biotecnologie: microrganismi, ambiente e salute*, Zanichelli editore, Bologna
- Gonçalves MW, Marins de Campos CB, Batista VG et al. 2017. Genotoxic and mutagenic effects of Atrazine Atanor 50 SC on *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (Anura: Hylidae) developmental larval stages. *Chemosphere* 182:730–737
- Graymore M, Stagnitti F, Allinson G 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ. Int.* 26:483–495
- Hayes TB, Anderson LL, Beasley VR et al. 2011. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127:64–73
- IUCN 2012. *Marine Mammals and Sea Turtles of the Mediterranean and Black Seas*. Gland, Switzerland and Malaga, Spain IUCN

- Jones MEH, Werneburg I, Curtis N, et al. 2012. The Head and Neck Anatomy of Sea Turtles (Cryptodira: Chelonioidea) and Skull Shape in Testudines. *PLoS ONE* 7(11): e47852.
- Lyson TR, Bever GS, Scheyer TM, et al 2013. Evolutionary origin of the Turtle Shell. *Current Biology* 23:1113–1119.
- Martín-del-Campo R, García-Gasca, A 2019. Sea turtles: ancient creatures, mysteries, adaptations, and threatens. *Research in Marine Sciences* 4(3): 556-562.
- Nava Montes AD, Espinosa Reyes G, Flores Ramírez R et al. 2020. Persistent organic pollutants in Kemp's ridley sea turtle *Lepidochelys Kempii* in Playa rancho Nuevo Sanctuary, Tamaulipas, Mexico. *Science of The Total Environment*, 739: 140176.
- Neuman-Lee LA, Janzen FJ 2011. Atrazine exposure impacts behavior and survivorship of neonatal turtles. *Herpetologica* 67:23–31
- Nödler K, Licha T, Voutsas D 2013. Twenty years later—atrazine concentrations in selected coastal waters of the Mediterranean and the Baltic Sea. *Marine pollution bulletin*, 70(1-2), 112-118
- Paris P, Pace E, Maschio G et al. 2020. Rapporto nazionale pesticidi nelle acque – dati 2017-2018. ISPRA, rapporti 334/2020
- Pace E, Maschio G, Capolupo M et al. 2022. Rapporto nazionale pesticidi nelle acque – dati 2019-2020. ISPRA, rapporti 371/2022
- Paris P, Esposito D, Maschio G et al. 2017. Sostenibilità ambientale dell'uso dei pesticidi –il bacino del fiume Po. ISPRA, rapporti 256/2017
- Peterson D, Shoup D, Thompson C et al. 2013. Herbicide mode of action, cooperative extension service. Kansas: Kansas State Univ.
- Religia P, Kato Y, Fukushima EO et al. 2019. Atrazine exposed phytoplankton causes the production of non-viable offspring on *Daphnia magna* *Marine Environmental Research* 145:177–183
- Ruomeng B, Meihao O, Siru Z et al. 2023. Degradation strategies of pesticide residue: From Chemicals to Synthetic Biology. *Synthetic and Systems Biotechnology* 8:302–313
- Singh S, Kumar V, Chauhan A et al 2017. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. *Environmental Chemistry Letters* 16:211–237
- Soltanian S 2016. Effect of atrazine on immunocompetence of red-eared slider turtle (*trachemys scripta*). *Journal of Immunotoxicology* 13:804–809

- Supe Tulcan RX, Ouyang W, Gu X, et al 2021. Typical herbicide residues, trophic transfer, bioconcentration, and health risk of marine organisms. *Environ. Int.* 152:106500
- Wang F, Yang Q, Zhao W-J et al. 2019. Effects of short-time exposure to atrazine on MIRNA expression profiles in the gonad of common carp (*cyprinus carpio*). *BMC Genomics* 20:587
- Wang H, Long X, Cao X et al. 2023. Stimulation of atrazine degradation by activated carbon and cathodic effect in soil microbial fuel cell. *Chemosphere* 320: 138087.
- Wei Y, Song B, Yuan S 2021. Dynamics of a ratio-dependent population model for green sea turtle with age structure. *Journal of Theoretical Biology* 516:110614.
- WWF 2006. Species fact sheet: Marine Turtles