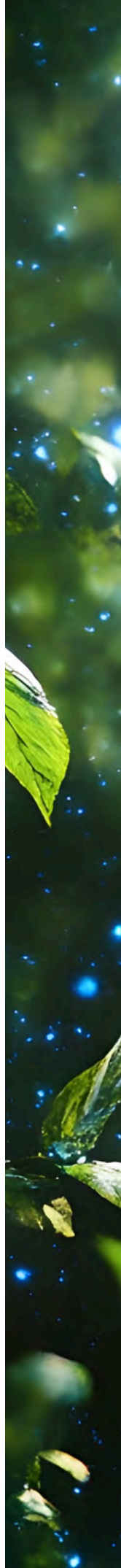


Premio
Tesi di Laurea
“Fabio Gilli”
EDIZIONE 2025

Abstract



Indice

■ Francesca Baldon

Messa a punto ed applicazione di metodi molecolari per la ricerca di marker genetici di antibiotico-resistenza nell'aria

■ Martina Cadin

L'importanza delle zone umide temporanee per la conservazione delle comunità di Odonati

■ Alessandro Gianotti

L'indice Flow-T per i macroinvertebrati: confronto tra corsi d'acqua alpini ed appenninici e scenari previsionali in risposta alla riduzione delle portate

■ Leonardo La Greca

Monitoraggio delle torbiere europee: analisi dei cambiamenti nel tempo attraverso resurvey

■ Anna Marino

Environmental impacts on benthic communities of alpine streams: from field studies to artificial flumes

■ Bianca Maria Mella

Impiego di *Phragmites australis* e microrganismi benefici del suolo nel fitorisanamento di acque contenenti arsenico

■ Davide Rotondo

Approcci integrati per la valutazione ecotossicologica delle sostanze per- e polifluoroalchiliche (PFAS)

■ Luigi Signore

Metodo molecolare per la quantificazione della lunghezza dei telomeri in *Tetrahymena thermophila*

■ Sofia Vaccarino Ruiz

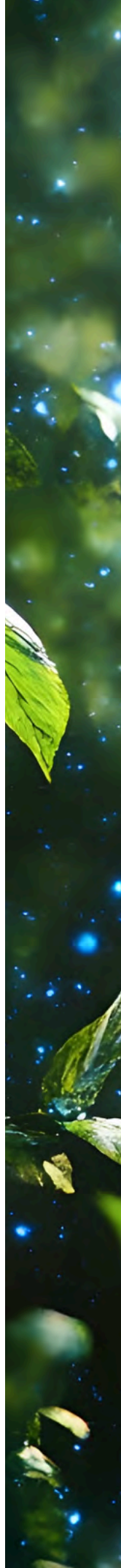
Urban green areas and road verges: a comparative study on pollinator communities and pollination in Uppsala

■ Beatrice Valentini

SustWine linking wine typicity, biodiversity, and environmental matrix

■ Francesco Zanetti

Studio della disponibilità di fiori per gli impollinatori lungo un gradiente altitudinale nel Parco Nazionale Gran Paradiso



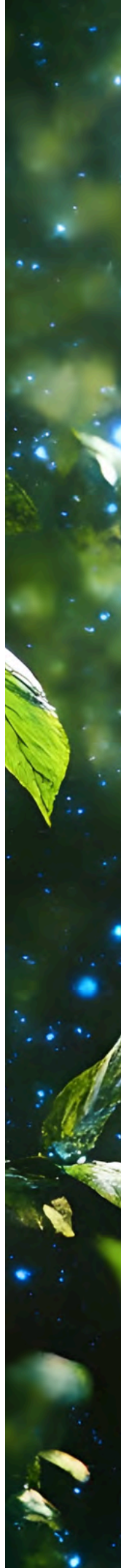
Francesca Baldon

Titolo tesi

**Messa a punto ed applicazione di
metodi molecolari per la ricerca di
marker genetici di antibiotico-
resistenza nell'aria**

UNITO

Biologia dell'ambiente

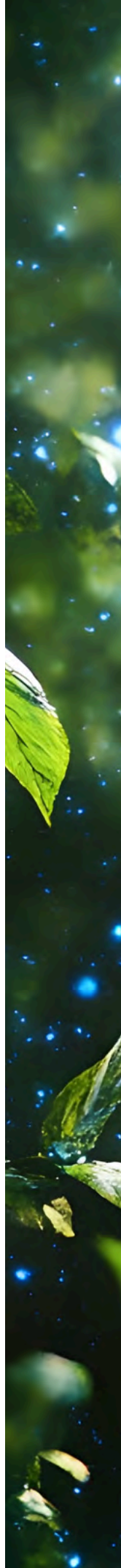


La resistenza agli antibiotici rappresenta una delle più gravi minacce per la salute pubblica ponendo una sfida crescente per i sistemi sanitari di tutto il mondo. Nonostante buona parte della resistenza agli antibiotici origini naturalmente, numerose ricerche hanno suggerito come specifiche attività antropiche siano in grado di aumentare la prevalenza della resistenza batterica e la sua diffusione in ambiente. Individuando le matrici ambientali come elementi importanti per la diffusione delle resistenze i principali enti di riferimento, nazionali ed internazionali, per la salvaguardia della Salute Pubblica hanno evidenziato la necessità di mettere in atto azioni di prevenzione secondo il principio “One Health”. La ricerca sulla resistenza agli antibiotici in ambiente si è concentrata principalmente sulla matrice suolo e sugli ambienti acquatici.

Tuttavia, studi recenti hanno evidenziato una presenza significativa di geni di resistenza agli antibiotici (ARG) nell'aria, evidenziando questa matrice come possibile serbatoio e veicolo per la diffusione di ARG attraverso fenomeni di trasporto atmosferico e adesione sulla superficie del materiale particolato (PM). Risulta quindi di particolare importanza approfondire il contributo alla diffusione della resistenza nell'aria per migliorare il quadro di valutazione della resistenza agli antibiotici negli ambienti antropizzati e proporre nuove strategie di prevenzione.

L'obiettivo dello studio è stato mettere a punto ed applicare un metodo molecolare per quantificare i geni di resistenza agli antibiotici in campioni di PM10 raccolti in specifici hot-spot di pressione selettiva di ARG. La prima fase dello studio ha quindi previsto l'ottimizzazione di una metodica di trattamento dei filtri di particolato, estrazione del DNA e successiva ddPCR, per quantificare la presenza di geni di resistenza. Il protocollo ottimizzato è stato poi impiegato per la ricerca di 6 ARG (tetA e tetW rappresentativi della resistenza alle tetracicline, sullI e sullII dei sulfamidici, blaTEM e blaCTX-M dei β -lattamici) ed un gene indicatore di mobilità genica (intI1) in campioni di PM10 raccolti in due campionamenti (estate/inverno) presso 4 hot-spot (ospedale, impianto di depurazione, sito urbano, allevamento).

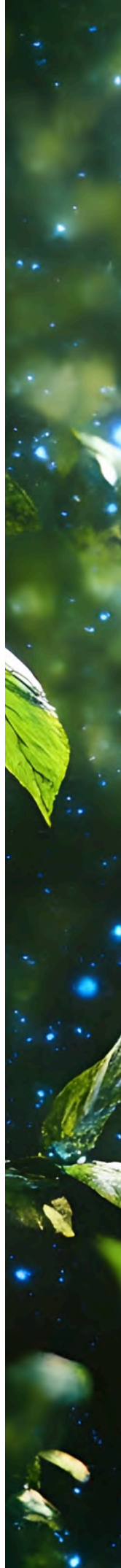
Il metodo ottimizzato per l'estrazione del particolato dai filtri campionati è risultato efficace per estrarre quantitativi adeguati di DNA su cui effettuare analisi molecolari per la quantificazione dei geni di resistenza. In tutti i campioni analizzati è stata rilevata la presenza di ARG, anche se le concentrazioni monitorate sono risultate inferiori rispetto ai valori osservati in bibliografia, tali discrepanze sono ascrivibili alle differenze nelle aree



geografiche in cui sono stati effettuati gli studi, caratterizzate da maggiori livelli di inquinamento atmosferico e diversi modelli di consumo di antibiotici. I risultati evidenziano una diffusa presenza di geni di resistenza nell'aria di tutti i siti analizzati, con una variabilità nella distribuzione e concentrazione dei singoli geni tra i diversi contesti ambientali considerati. Tra i siti analizzati l'allevamento zootecnico e l'impianto di depurazione delle acque reflue si sono distinti per i livelli più elevati di abbondanza e diversità di ARG. Diversamente, i siti urbano ed ospedaliero hanno mostrato le concentrazioni più basse, simili tra di loro. Le resistenze a tetracicline e sulfonamidi sono risultate le più abbondanti, seppur con qualche differenza in termini di presenza dei geni tra i vari siti. Sono state, inoltre, osservate differenze tra le concentrazioni dei geni nelle stagioni in tutti i siti eccetto l'ospedaliero, seppur non statisticamente significative. Le concentrazioni di geni rilevate non hanno mostrato correlazioni con il PM10 suggerendo che la quantità di particolato non possa essere impiegata come predittore affidabile della concentrazione di ARG, ma che è necessario approfondire la caratterizzazione qualitativa del PM.

Lo studio si inserisce nel crescente interesse globale per il monitoraggio dell'antibiotico resistenza e contribuisce alla comprensione del possibile ruolo della matrice aria nella sua diffusione e in quella dei geni ad essa associati, rispondendo, inoltre, alla criticità relativa alla carenza di studi sulla concentrazione degli ARG, necessaria per stimare i tassi di emissione ed esposizione. A questo proposito, il protocollo ottimizzato e l'impiego della tecnica digital droplet PCR ha rappresentato uno strumento altamente sensibile ed efficace per la quantificazione dei geni di resistenza, confermando il suo potenziale nell'ambito del monitoraggio ambientale dell'AMR.

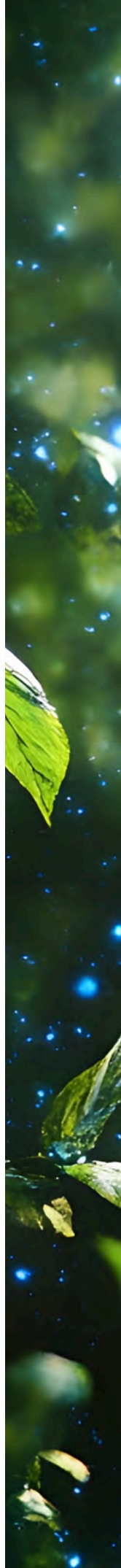
I risultati ottenuti nel monitoraggio confermano il ruolo dell'aria come possibile serbatoio di resistenze agli antibiotici, evidenziando la necessità di approfondire il ruolo di tutte le matrici ambientali nella diffusione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza per la salvaguardia della Salute Pubblica nell'ottica One-Health.



geografiche in cui sono stati effettuati gli studi, caratterizzate da maggiori livelli di inquinamento atmosferico e diversi modelli di consumo di antibiotici. I risultati evidenziano una diffusa presenza di geni di resistenza nell'aria di tutti i siti analizzati, con una variabilità nella distribuzione e concentrazione dei singoli geni tra i diversi contesti ambientali considerati. Tra i siti analizzati l'allevamento zootecnico e l'impianto di depurazione delle acque reflue si sono distinti per i livelli più elevati di abbondanza e diversità di ARG. Diversamente, i siti urbano ed ospedaliero hanno mostrato le concentrazioni più basse, simili tra di loro. Le resistenze a tetracicline e sulfonamidi sono risultate le più abbondanti, seppur con qualche differenza in termini di presenza dei geni tra i vari siti. Sono state, inoltre, osservate differenze tra le concentrazioni dei geni nelle stagioni in tutti i siti eccetto l'ospedaliero, seppur non statisticamente significative. Le concentrazioni di geni rilevate non hanno mostrato correlazioni con il PM10 suggerendo che la quantità di particolato non possa essere impiegata come predittore affidabile della concentrazione di ARG, ma che è necessario approfondire la caratterizzazione qualitativa del PM.

Lo studio si inserisce nel crescente interesse globale per il monitoraggio dell'antibiotico resistenza e contribuisce alla comprensione del possibile ruolo della matrice aria nella sua diffusione e in quella dei geni ad essa associati, rispondendo, inoltre, alla criticità relativa alla carenza di studi sulla concentrazione degli ARG, necessaria per stimare i tassi di emissione ed esposizione. A questo proposito, il protocollo ottimizzato e l'impiego della tecnica digital droplet PCR ha rappresentato uno strumento altamente sensibile ed efficace per la quantificazione dei geni di resistenza, confermando il suo potenziale nell'ambito del monitoraggio ambientale dell'AMR.

I risultati ottenuti nel monitoraggio confermano il ruolo dell'aria come possibile serbatoio di resistenze agli antibiotici, evidenziando la necessità di approfondire il ruolo di tutte le matrici ambientali nella diffusione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza per la salvaguardia della Salute Pubblica nell'ottica One-Health.



Martina Cadin

Titolo tesi

**L'importanza delle zone umide
temporanee per la conservazione
delle comunità di Odonati**

UNITO

Scienze Naturali

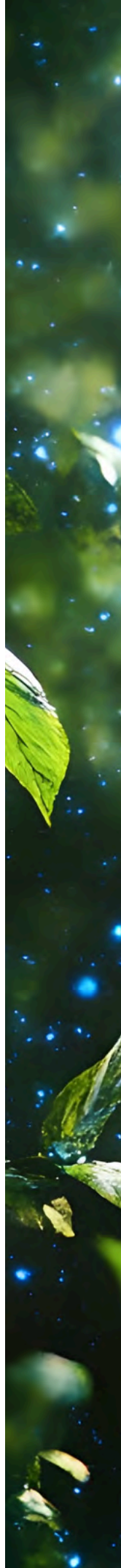


Le zone umide temporanee rappresentano ecosistemi caratterizzati da una elevata diversità biologica e da una forte variabilità spaziale e temporale. Nonostante la loro estensione spesso ridotta, questi habitat svolgono funzioni ecologiche cruciali, tra cui il supporto a popolazioni di invertebrati e vertebrati, la regolazione dei cicli idrici e il mantenimento della connettività ecologica nel paesaggio. La tesi si concentra sul confronto tra stagni naturali, ambienti ripristinati e risaie in Piemonte, con l'obiettivo di comprendere come differenti condizioni ambientali e pratiche di gestione influenzino la composizione delle comunità di Odonati, scelti come indicatori biologici per la loro sensibilità alle modificazioni dell'habitat e la capacità di riflettere lo stato di conservazione degli ecosistemi acquatici e delle aree circostanti.

Attraverso campagne di monitoraggio sistematico, sono state raccolte informazioni su abbondanza, ricchezza e diversità delle comunità, mettendo in evidenza pattern specifici legati al tipo di habitat. Gli stagni naturali presentano comunità più diversificate e strutturate, confermando il loro ruolo come serbatoi di biodiversità. Gli ambienti ripristinati e le risaie, pur mostrando comunità più semplificate e sensibili alle pressioni antropiche, evidenziano un potenziale significativo per la conservazione quando le pratiche gestionali rispettano le condizioni ecologiche fondamentali. Questi risultati sottolineano l'importanza di considerare non solo la presenza di habitat, ma anche la qualità ecologica e le interazioni tra fattori naturali e gestionali, evidenziando come interventi mirati possano favorire il mantenimento di comunità ricche e resilienti.

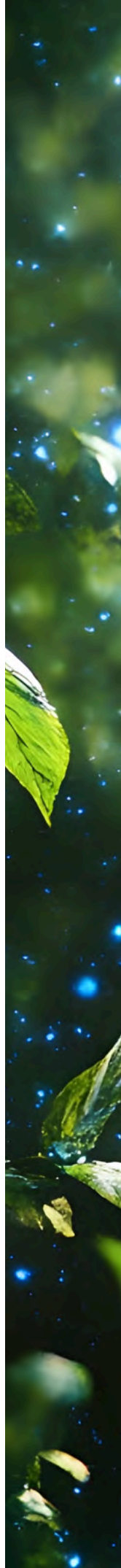
La ricerca offre anche spunti per strategie di gestione e progettazione degli interventi: il monitoraggio degli Odonati consente di identificare habitat prioritari, valutare l'efficacia dei ripristini e suggerire pratiche che promuovano la biodiversità. I dati raccolti suggeriscono inoltre che anche habitat di origine artificiale, se gestiti con attenzione, possono contribuire a mantenere funzionalità ecologiche e connettività tra popolazioni, aumentando la resilienza complessiva del paesaggio.

Inoltre, la tesi integra approcci quantitativi e osservazioni ecologiche, con una prospettiva applicativa che evidenzia il valore dei dati raccolti per decisioni informate in materia di conservazione e gestione degli ecosistemi. La combinazione di metodi rigorosi e indicazioni operative rende lo studio rilevante non solo per la comprensione della biodiversità locale, ma anche per



supportare azioni concrete volte al miglioramento dello stato ecologico delle zone umide temporanee, al rafforzamento della connettività ecologica e alla valorizzazione di habitat naturali e semi-naturali.

In sintesi, il lavoro offre un quadro dettagliato delle relazioni tra tipo di habitat, gestione e biodiversità, fornendo elementi di riflessione utili sia per la ricerca scientifica sia per interventi di conservazione e ripristino. La valutazione integrata delle comunità di Odonati e delle condizioni ambientali permette di evidenziare le interazioni tra fattori naturali e antropici, sottolineando come la qualità ecologica degli habitat possa essere preservata e potenziata attraverso strategie mirate e basate su evidenze scientifiche.



Alessandro Gianotti

Titolo tesi

**L'indice Flow-T per i
macroinvertebrati: confronto tra
corsi d'acqua alpini ed appenninici
e scenari previsionali in risposta
alla riduzione delle portate**

UNITO

Biologia dell'ambiente

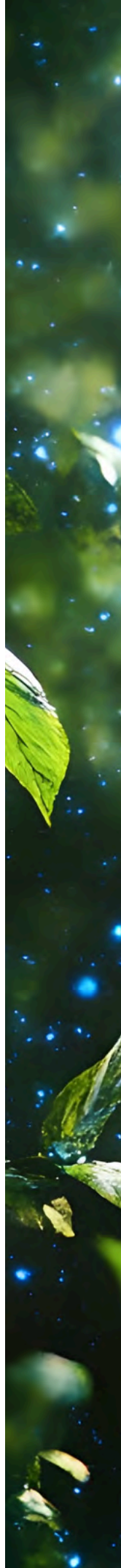


Gli ecosistemi fluviali rappresentano ambienti di notevole importanza ecologica, in quanto contengono una percentuale esigua del volume di acqua a livello globale, ma ospitano un'elevata biodiversità e forniscono numerosi servizi ecosistemici essenziali, come la fornitura di acqua potabile, cibo ed energia idroelettrica, la decomposizione dei reflui organici, la purificazione dell'acqua, il controllo delle alluvioni, e servizi culturali come un valore estetico, spirituale e ricreativo. Tuttavia, tali ecosistemi sono oggi tra i più minacciati a livello globale a causa di molteplici pressioni antropiche che ne alterano profondamente la struttura e il funzionamento.

Tra le principali cause di degrado si annoverano le alterazioni idrologiche e morfologiche dei corsi d'acqua, il sovrasfruttamento delle risorse idriche, la costruzione di opere di regolazione dei deflussi, l'inquinamento diffuso e puntuale, l'introduzione di specie aliene invasive e gli effetti sempre più evidenti dei cambiamenti climatici. L'insieme di questi fattori ha determinato una drastica riduzione della qualità degli habitat fluviali e una conseguente perdita di biodiversità, tanto che si stima che fino al 25% delle specie legate agli ambienti lotici sia oggi a rischio di estinzione. In questo contesto, risulta fondamentale disporre di strumenti efficaci per la valutazione dello stato ecologico dei corsi d'acqua e per l'analisi degli impatti derivanti dalle alterazioni idromorfologiche.

Tra i diversi approcci disponibili, il modello MesoHABSIM (Mesohabitat Simulation Model) rappresenta uno strumento avanzato per la caratterizzazione degli habitat fluviali a scala di mesohabitat, consentendo di quantificare la disponibilità e la distribuzione degli habitat in relazione alle condizioni idrauliche e morfologiche del corso d'acqua. Integrato a questo approccio, l'indice Flow-T costituisce una metrica biologica basata sulla risposta dei macroinvertebrati bentonici alle variazioni del regime di flusso, risultando particolarmente utile per valutare gli effetti delle alterazioni idrologiche sugli ecosistemi fluviali.

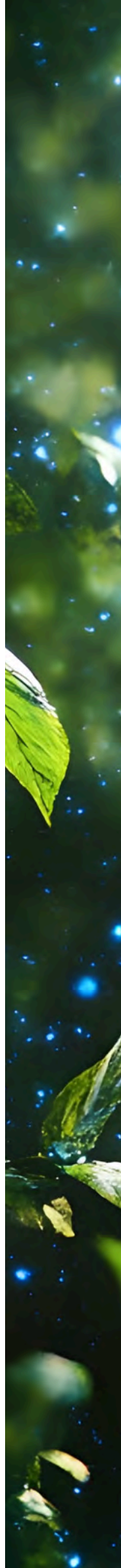
Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo principale l'applicazione dell'indice Flow-T all'interno del modello MesoHABSIM per analizzare la risposta delle comunità macrobentoniche alle variazioni idromorfologiche in sei corsi d'acqua italiani, tre appenninici (Tebbia, Taro ed Enza) e tre alpini (Sangone, Serio e Droanello).



In particolare, lo studio si è posto due obiettivi specifici: i) valutare la capacità dell'indice Flow-T di discriminare la struttura tassonomica delle comunità macrobentoniche nei diversi mesohabitat individuati tramite la metodologia MesoHABSIM; ii) analizzare la variazione dei valori di Flow-T in risposta a differenti scenari di riduzione delle portate estive, simulando riduzioni del 10%, del 30% e del 50% rispetto alle condizioni naturali.

I campionamenti biologici sono stati effettuati nel periodo estivo del 2023 per i corsi d'acqua appenninici e tra il 2023 e il 2024 per quelli alpini. I risultati ottenuti evidenziano una chiara relazione tra i valori dell'indice Flow-T e la tipologia di mesohabitat, con valori più elevati associati a habitat caratterizzati da elevate velocità di corrente, come riffle e rapid, e valori inferiori in ambienti a bassa velocità della corrente, quali pool e backwater. Questa differenziazione risulta particolarmente marcata nei corsi d'acqua appenninici, mentre nei sistemi alpini emerge una maggiore eterogeneità nella risposta dell'indice, probabilmente legata a una maggiore complessità geomorfologica e a una differente dinamica idrologica di questi corsi d'acqua.

L'analisi degli scenari di alterazione idrologica ha dimostrato come la riduzione delle portate determini una riduzione dei valori di Flow-T ed un aumento della percentuale di giorni in cui l'indice assume valori inferiori rispetto alla media della situazione senza alterazioni. Questo studio ha dimostrato l'applicabilità dell'indice Flow-T all'interno del modello biologico costruito mediante la metodologia MesoHABSIM, e il suo potenziale per lo studio degli impatti, anche futuri, delle alterazioni idromorfologiche sulla struttura della comunità e sulla disponibilità di habitat per la comunità macrobentonica, fornendo nuove prospettive di applicazione in contesti fluviali più ampi.



Leonardo La Greca

Titolo tesi

**Monitoraggio delle torbiere
europee: analisi dei cambiamenti
nel tempo attraverso resurvey**

UNITO
Scienze Naturali



Il termine “torbiera” definisce zone umide provviste di uno strato di torba, ossia un deposito organico semi-decomposto che si accumula in condizioni di saturazione idrica. La loro classificazione è complessa e ne esistono categorizzazioni sulla base di diversi fattori, come l'idrologia, il pH e la disponibilità di nutrienti. Si possono ricondurre principalmente a due tipologie: bog (ombrotrofiche -approvvigionate da acqua meteorica-, povere di nutrienti e acide) e fen (minerotrofiche -approvvigionate da acque minerali-, più ricche di nutrienti). La vegetazione tipica degli ambienti di torbiera è altamente specializzata; tra le presenze più caratterizzanti distinguiamo sfagni (*Sphagnum* spp.) -che ricoprono un ruolo chiave nella formazione della torba- e piante carnivore (es. *Drosera* spp.).

Questa tesi si pone l'obiettivo di descrivere l'habitat di torbiera e le principali tecniche di monitoraggio, con un approfondimento sul metodo del resurvey e sull'utilizzo dei dati storici di vegetazione.

Il monitoraggio delle torbiere consiste nell'osservare e valutare il loro stato attuale, che costituisce una condizione di baseline (di controllo), o le tendenze di vari parametri ambientali. Le tecniche di monitoraggio includono sia osservazioni sul campo, come il rilevamento della vegetazione e il campionamento delle acque, sia metodi di telerilevamento, come l'uso di satelliti e droni. Tuttavia, per studiare i cambiamenti a lungo termine degli habitat di torbiera, le opzioni disponibili sono limitate. Le analisi paleobotaniche permettono di ricostruire le condizioni ecologiche risalenti a migliaia di anni fa, mentre per studiare i cambiamenti avvenuti nell'arco degli ultimi secoli o decenni si ricorre generalmente a due metodologie: lo studio di cronosequenze e il resurvey. Sebbene lo studio delle cronosequenze sia utile, è spesso meno impiegato a causa dei severi limiti che ne restringono l'affidabilità. Il resurvey, invece, consiste nel ripetere indagini ecologiche precedenti a distanza di tempo, confrontando i dati storici con quelli attuali per identificare tendenze e trasformazioni negli habitat di torbiera analizzati.

Attraverso la sintesi di tre casi studio, presi in considerazione per aver utilizzato il metodo del resurvey per monitorare i cambiamenti in alcune torbiere europee, vengono discussi i vantaggi e limiti dell'uso di dati storici di vegetazione al fine di monitorare i cambiamenti degli ecosistemi di torbiera



nel tempo e i problemi che gli studi hanno dovuto affrontare nella gestione dei dati in linea alle aspettative teoriche. In questi casi, vengono descritti i metodi utilizzati, i risultati ottenuti e le implicazioni delle ricerche. In conclusione, i risultati ottenuti da questi studi confermano l'aspettativa teorica secondo cui il resurvey, applicato a ricerche ecologiche precedenti, può produrre risultati significativi, consentendo di analizzare i cambiamenti che si verificano nell'arco di decenni e dando così la possibilità di prevedere l'evoluzione futura degli ecosistemi di torbiera.



Anna Marino

Titolo tesi

Environmental impacts on benthic communities of alpine streams: from field studies to artificial flumes

UNITO

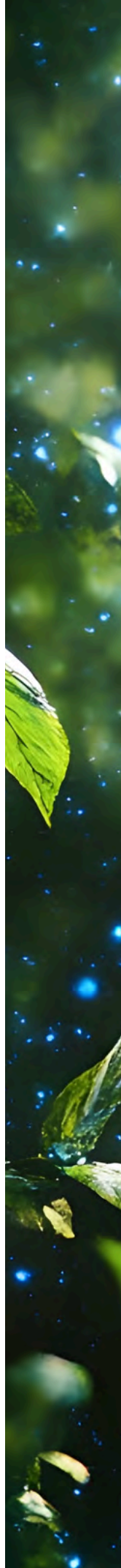
**Scienze Biologiche e
Biotecnologie Applicate**



I corsi d'acqua montani rappresentano ecosistemi di elevata naturalità ma, al contempo, tra i più vulnerabili agli impatti delle pressioni antropiche e agli effetti del cambiamento climatico. Essi svolgono funzioni ecosistemiche strategiche per i territori d'alta quota e pedemontani, fornendo servizi essenziali quali l'approvvigionamento di acqua potabile, il mantenimento di habitat di elevato valore conservazionistico, la regolazione idrologica e il contributo alla sicurezza idrogeologica. La loro tutela riveste quindi una rilevanza non solo ambientale, ma anche sociale ed economica, con ricadute dirette sulla qualità della vita delle comunità locali e sulla resilienza dei territori montani, collocandosi al centro delle politiche europee di conservazione della biodiversità, di adattamento al cambiamento climatico e di gestione sostenibile delle risorse idriche.

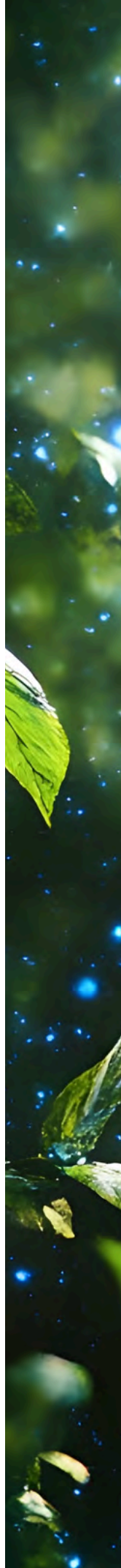
In questo contesto, la presente tesi di dottorato si propone di analizzare in modo integrato le risposte degli ecosistemi fluviali montani alle principali pressioni ambientali che agiscono simultaneamente su più scale spaziali e temporali, con specifico riferimento alle comunità bentoniche e, in particolare, ai macroinvertebrati bentonici, utilizzati come indicatori biologici descrittivi dello stato ecologico dei corsi d'acqua. In alcuni casi, l'analisi è estesa ad altri comparti biologici (diatomee bentoniche, fauna ittica) e a parametri chimici e microbiologici, al fine di ottenere una visione olistica ispirata al paradigma One Health, che considera congiuntamente le interazioni tra qualità ambientale, biodiversità, funzionamento degli ecosistemi fluviali e potenziali ricadute sulla salute degli ecosistemi e dell'uomo.

Per far fronte alla complessità intrinseca dei sistemi fluviali montani, caratterizzati da stress multipli che agiscono in modo sinergico, è stato quindi adottato un approccio multidisciplinare e multiscalare. Le analisi sono state condotte integrando differenti scale spaziali (dal bacino idrografico al singolo tratto fluviale, con particolare riferimento ai corsi d'acqua del Piemonte e del bacino del Po) e temporali (da studi stagionali e annuali fino a serie storiche pluriennali), combinando osservazioni in campo in corsi d'acqua naturali con sperimentazioni controllate in artificiali flumes (Laboratorio di ecoidraulica, ALPSTREAM). Il lavoro ha integrato indicatori chimici, microbiologici ed ecologici, combinato metriche tassonomiche tradizionali (es. indici di qualità



biologica) e nuovi indici funzionali orientati a descrivere i tratti ecologici e funzionali delle comunità, nonché applicato modelli statistici multivariati e bayesiani in grado di cogliere risposte complesse lungo gradienti ambientali multipli. Inoltre la raccolta dei dati ha integrato fonti eterogenee, comprendendo monitoraggi istituzionali, rilievi sperimentali e contributi non convenzionali (segnalazioni municipali e osservazioni di cittadini), opportunamente validati e inseriti in un quadro analitico rigoroso. La tesi è quindi strutturata come una raccolta di articoli scientifici, preceduti da un'ampia introduzione che inquadra gli impatti ambientali sugli ecosistemi fluviali montani nel contesto del cambiamento climatico. Le pressioni analizzate rientrano in due grandi categorie, fortemente interconnesse nei sistemi naturali: alterazioni della qualità delle acque e modificazioni idro-morfologiche. Tali pressioni sono articolate in quattro sezioni tematiche principali.

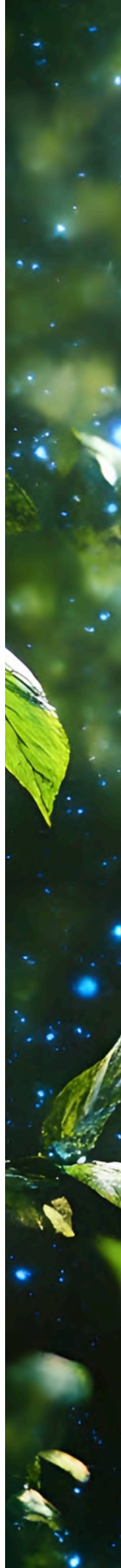
La prima sezione "Waste water treatment plants", analizza gli effetti degli effluenti dei depuratori (WWTP) sui corsi d'acqua montani, evidenziando come l'impatto non dipenda esclusivamente dalla presenza degli impianti, ma sia fortemente modulato dalla loro dimensione, dalla tecnologia di trattamento adottata e, soprattutto, dai carichi annuali complessivi di nutrienti (azoto e fosforo) immessi nel reticolo idrografico a scala di bacino. I risultati mostrano come limiti normativi basati prevalentemente su concentrazioni istantanee non siano sufficienti a rappresentare in modo adeguato le risposte ecologiche dei corpi idrici riceventi, poiché gli impatti biologici risultano strettamente legati ai carichi totali e alla capacità di diluizione dei sistemi fluviali, fortemente ridotta in condizioni di magra sempre più frequenti in relazione al cambiamento climatico. In particolare le comunità macrobentoniche nei tratti influenzati dagli scarichi mostrano quindi una riduzione degli indici di qualità biologica e una riorganizzazione funzionale con prevalenza di taxa tolleranti, multivoltini e adattati a substrati instabili e condizioni eutrofiche, a scapito delle specie più sensibili. L'integrazione di indicatori chimici, microbiologici (es. E. coli) e funzionali consente di cogliere pienamente la natura emergente di questa pressione, che assume anche una rilevanza potenziale per la salute umana. La sinergia tra l'impatto degli effluenti e la riduzione delle portate, ha messo in evidenza, oltre ad effetti diretti, anche effetti indiretti sulle comunità. Infatti uno specifico caso di studio vengono inoltre analizzate variazioni morfologiche in *Serratella ignita*, interpretate come risposta indiretta a modificazioni delle reti trofiche indotte dal degrado ambientale.



La seconda sezione, “Increase of Water Temperature”, è dedicata agli effetti dell’aumento della temperatura dell’acqua lotica sui cicli vitali e sulla fenologia di specie sensibili di Efemerotteri (es. *Serratella ignita*, *Ephoron virgo*). Attraverso il confronto tra popolazioni di corsi d’acqua caratterizzati da differenti regimi termici e l’analisi di serie temporali pluriennali, emerge come variazioni anche relativamente contenute delle temperature cumulative determinino differenze significative nei tassi di crescita ninfale, nella durata del ciclo vitale e nei tempi di emergenza. Le evidenze indicano una progressiva anticipazione degli sfarfallamenti in risposta al riscaldamento osservato negli ultimi decenni, con potenziali effetti di desincronizzazione ecologica rispetto alle risorse trofiche e alle interazioni biotiche. Nel complesso, i risultati suggeriscono che il riscaldamento globale non si traduce esclusivamente in spostamenti latitudinali o altitudinali delle specie, ma può modificare in modo sostanziale la struttura temporale dei cicli vitali e la fitness individuale, con implicazioni rilevanti per l’intero funzionamento delle reti ecologiche fluviali e la resilienza a lungo termine degli ecosistemi montani.

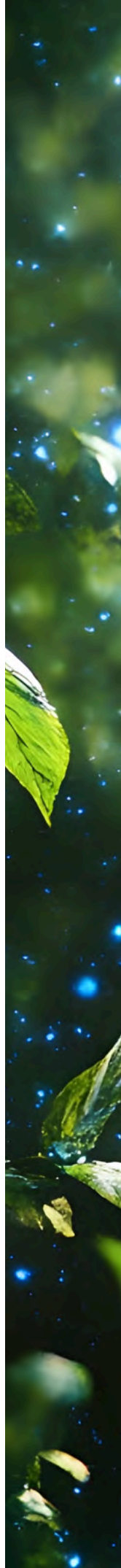
La terza sezione, “Connectivity Alterations”, analizza l’impatto delle dighe e degli impianti idroelettrici sulle comunità bentoniche, considerando congiuntamente le alterazioni del regime di portata e le modificazioni morfo-idrauliche. I risultati evidenziano come tali infrastrutture agiscano da veri e propri filtri ecologici, determinando una semplificazione degli habitat e una riorganizzazione funzionale delle comunità. A fronte di variazioni talora contenute nella ricchezza tassonomica complessiva, si osservano cambiamenti marcati nella composizione funzionale, con aumento di taxa adattati a substrati omogenei, modalità di attaccamento permanente e respirazione tegumentaria, e una riduzione di organismi legati a microhabitat dinamici e regimi di flusso naturali. L’applicazione di nuovi indici funzionali, calibrati sulle preferenze di microhabitat e sulla velocità di corrente (es. Flow-T), mette in evidenza i limiti delle metriche tradizionali nel rilevare gli effetti ecologici delle alterazioni idromorfologiche, sottolineando la necessità di integrare approcci funzionali nei programmi di monitoraggio e nella gestione dei deflussi ecologici in un’ottica di pianificazione energetica sostenibile.

La quarta sezione, “Extreme Hydrological Events”, è dedicata agli effetti degli eventi idrologici estremi, la cui frequenza e intensità risultano in aumento in relazione al cambiamento climatico. Le analisi condotte a seguito di piene



catastrofiche mostrano impatti immediati sulle comunità macrobentoniche in termini di riduzione dell'abbondanza e semplificazione delle guild trofiche, nonché effetti a medio termine legati ai processi di ricolonizzazione e alla selezione di taxa maggiormente resilienti. In presenza di dighe, pur in un contesto generale di riduzione della diversità, si osservano talora effetti mitiganti sugli impatti delle piene più intense, con implicazioni rilevanti per la gestione integrata dei bacini. Parallelamente, gli esperimenti in fiumi artificiali hanno consentito di isolare l'effetto della siccità improvvisa e del disseccamento dell'alveo, evidenziando una marcata eterogeneità nella capacità di sopravvivenza dei diversi gruppi funzionali e tassonomici. L'applicazione dell'OMI index ha permesso di categorizzare la comunità in nicchie basate su gradienti di tolleranza ecologica e specializzazione, contribuendo alla comprensione dei meccanismi di resistenza e resilienza delle comunità lotiche in condizioni di stress idrico estremo. Nel complesso, le evidenze emerse dimostrano che gli impatti ambientali sui corsi d'acqua montani derivano dall'azione combinata di pressioni locali e globali che operano sinergicamente su più scale spaziali e temporali. L'integrazione di approcci multidisciplinari, l'uso congiunto di metriche strutturali e funzionali e l'adozione di disegni di studio multiscalarari si confermano strumenti indispensabili per una valutazione più realistica dello stato ecologico dei sistemi fluviali.

In conclusione i risultati del presente lavoro di tesi di dottorato forniscono indicazioni operative rilevanti per il miglioramento dei programmi di monitoraggio, per la revisione critica degli attuali criteri normativi (in particolare per quanto riguarda la valutazione dei carichi di nutrienti e dei deflussi ecologici) e per l'elaborazione di strategie di gestione adattativa capaci di tenere conto degli effetti cumulativi delle pressioni antropiche in uno scenario di rapido cambiamento climatico. In appendice sono inclusi ulteriori lavori scientifici sviluppati nel corso del dottorato che, pur non direttamente centrati sul tema principale, hanno contribuito al consolidamento delle competenze metodologiche nell'ambito dell'ecologia fluviale.



Bianca Maria Mella

Titolo tesi

**Impiego di *Phragmites australis* e
microrganismi benefici del suolo
nel fitorisanamento di acque
contenenti arsenico**

UPO

Scienze Biologiche

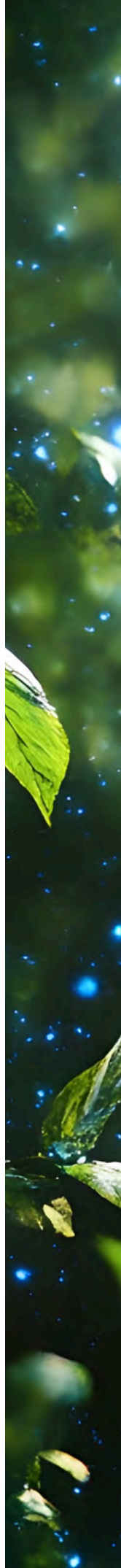


A causa della crescente industrializzazione e urbanizzazione, suoli e acque sono sempre più contaminati da inquinanti organici ed inorganici che impattano su ecosistemi e organismi. Metalli pesanti e metallodi sono tra i contaminanti inorganici più pericolosi, perché sono persistenti e possono entrare nella catena alimentare. Sappiamo che le piante possono essere utilizzate in tecniche di fitorisanamento applicabili a diverse matrici, tra cui anche quelle acquose. Queste tecniche costituiscono un'alternativa ecologicamente sostenibile ai tradizionali metodi chimico-fisici, i quali presentano svantaggi: possono causare ulteriore inquinamento, impattare sull'ambiente e hanno costi molto elevati. È perciò necessario risanare le matrici ambientali attraverso metodi alternativi come biorisanamento e fitorisanamento.

Lo scopo di questo lavoro di tesi, svolto nell'ambito del progetto del PNRR NODES – Nord Ovest Digitale E Sostenibile, è stato valutare l'efficacia di *Phragmites australis*, una macrofita erbacea della famiglia delle Poaceae, nel fitorimedio dell'arsenico da matrici acquose. Dalla letteratura è noto che questa pianta è in grado di rimuovere metalli pesanti e metallodi, come l'arsenico. Inoltre, per potenziare l'efficacia di rimozione dei contaminanti, le piante possono sfruttare la simbiosi con microrganismi benefici del suolo, tra cui spiccano i funghi micorrizici arbuscolari (AMF) e i batteri promotori della crescita delle piante (PGPB).

Piante di *Phragmites* sono state pre-inoculate o meno con microrganismi benefici per valutare la loro influenza sul fitorisanamento dell'arsenico. Alcune sono state micorrizzate con un mix di AMF (M), altre batterizzate col batterio *Pseudomonas protegens* ceppo Pf7 (B) e altre co-inoculate con funghi e batteri (MB), mentre piante non inoculate sono state tenute come controllo (C).

Accertata la presenza del fungo nelle radici, è stato allestito l'esperimento (durato circa 60 giorni) in un mesocosmo in scala ridotta utilizzando le acque contenenti arsenico alla concentrazione di $22 \mu\text{g/L}$, valore superiore al limite legale di $10 \mu\text{g/L}$ stabilito dalla Direttiva europea 2020/2184 in linea con le raccomandazioni dell'OMS per la concentrazione di arsenico nelle acque ad uso potabile. Sono stati allestiti tre batch di acqua contenente arsenico, ognuno della durata di circa 20 giorni. Per ogni batch, sono state analizzate



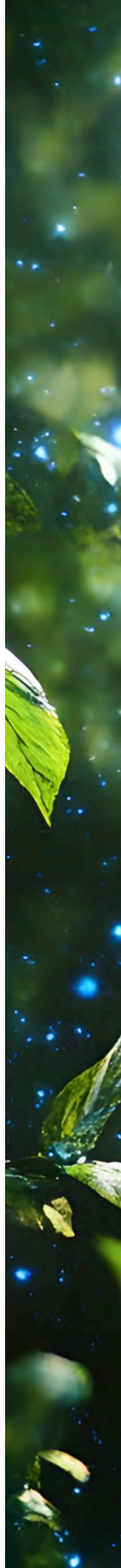
le acque sia al tempo zero che al termine dei 20 giorni e sono stati misurati il volume iniziale e finale, così da ottenere non solo un bilancio di concentrazione, ma anche di massa. A fine esperimento sono stati valutati: la concentrazione di arsenico nelle acque in entrata e in uscita e i parametri di crescita morfometrici (altezza del fusto) e ponderali (pesi freschi e secchi delle porzioni epigea ed ipogea) delle piante utilizzate. Inoltre è stato valutato il grado di colonizzazione fungina nell'apparato radicale, prima dell'allestimento del mesocosmo e al termine dell'esperimento.

I risultati mostrano che il trattamento MB è stato il migliore nel promuovere l'altezza della pianta e l'aumento di biomassa, indicando che la co-inoculazione con AMF e Pf7 ha promosso lo sviluppo vegetale.

Analizzando la concentrazione residua di arsenico al termine di ogni batch, va sottolineato che sia le piante di *Phragmites* non trattate, sia quelle inoculate con microrganismi benefici, hanno portato la concentrazione finale di arsenico al di sotto del limite legale di 10 µg/L. Rispetto al contenuto residuo e alle percentuali di rimozione dell'arsenico, si sono osservate variazioni significative tra i diversi trattamenti nel corso del tempo. Nei primi due batch, le piante co-inoculate sono state le meno efficienti rispetto ai controlli, mentre nel terzo batch le piante micorrizzate hanno raggiunto la percentuale di rimozione più elevata, pari circa al 98%. Va evidenziato che tutti i trattamenti, inclusi i controlli, hanno superato costantemente il 90% di rimozione dell'arsenico (eccetto il trattamento MB nel primo batch, con un'efficienza dell'88%).

È stato altresì evidente un progressivo miglioramento dell'efficienza di rimozione dell'arsenico nel corso del tempo per tutti i trattamenti. Questi risultati indicano che *Phragmites* possiede una notevole capacità intrinseca nella rimozione dell'arsenico grazie all'elevato tasso di crescita e all'apparato radicale profondo. Inoltre, la simbiosi con microrganismi benefici, in particolare con i funghi, ha potenziato sia la crescita vegetale sia l'efficienza di rimozione dell'arsenico, con dinamiche temporali che sottolineano l'importanza di selezionare specifiche combinazioni di microrganismi e di piante microrganismi per ottimizzare il fitorisanamento.

Per definire se *Phragmites* sia in grado di fitoestrarre o fitostabilizzare l'arsenico, sono in corso le analisi sull'accumulo del metalloide nei diversi organi vegetali. Sono ancora in corso anche le analisi relative al grado di colonizzazione fungina a fine esperimento.



Davide Rotondo

Titolo tesi

**Approcci integrati per la
valutazione ecotossicologica
delle sostanze per- e
polifluoroalchiliche (PFAS)**

UPO

Chimica e biologia

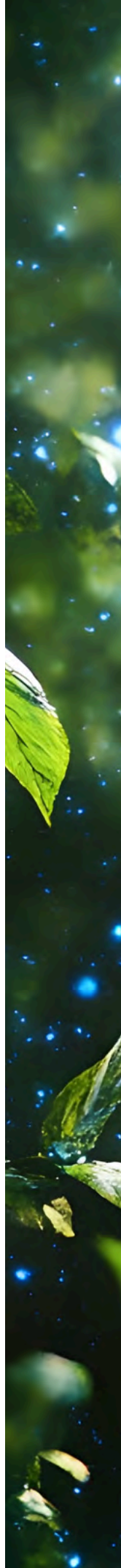


Le sostanze per- e polifluoroalchiliche (PFAS) rappresentano una classe di contaminanti emergenti di primaria rilevanza ambientale e tossicologica, caratterizzata da un'eccezionale stabilità chimica che ne determina la persistenza recalcitrante negli ecosistemi e la conseguente esposizione cronica per gli organismi e l'uomo. La presente tesi, integrata nelle attività di ricerca del progetto europeo Horizon 2020 SCENARIOS, adotta l'approccio olistico One Health per investigare le dinamiche di tossicità dei PFAS attraverso un'analisi integrata che connette la salute ambientale a quella umana. Il razionale scientifico del lavoro si articola su un percorso logico sequenziale che muove dall'osservazione degli effetti in modelli ecologici fino alla caratterizzazione dei meccanismi d'azione molecolari in modelli umani. Nella prima fase dello studio, focalizzata sul comparto suolo, è stato impiegato l'anellide *Eisenia fetida* come modello sentinella per valutare l'impatto ecotossicologico di PFAS storici (PFOA) e di nuova generazione (HFPO-DA, PFMOPrA, PFMOBA) in scenari di esposizione realistici.

Le indagini biochimiche, condotte mediante metabolomica basata sulla spettrometria di massa (LC-MS), hanno evidenziato una significativa alterazione del profilo neurotrasmettitoriale, con una marcata riduzione del tono inibitorio mediato dal GABA e un contestuale incremento dell'acetilcolina. Tale squilibrio neurochimico ha trovato un riscontro fenomenologico diretto nelle analisi comportamentali, che hanno registrato una compromissione della capacità locomotoria e un incremento dello stato di immobilità.

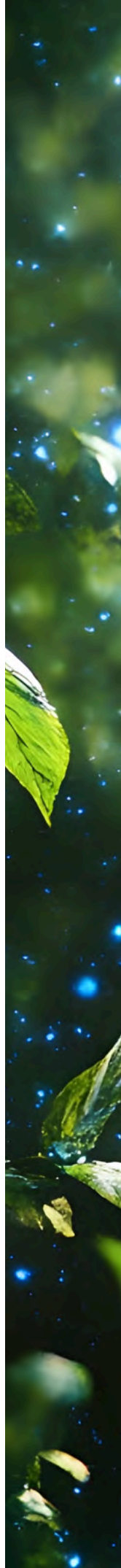
Questi dati non solo dimostrano l'interferenza dei PFAS sui circuiti neuromuscolari degli invertebrati, ma prefigurano potenziali effetti a cascata sulla funzionalità degli ecosistemi terrestri.

Sulla base di tali evidenze, la ricerca ha traslato l'indagine verso modelli cellulari umani per verificare la rilevanza clinica e meccanicistica degli effetti osservati. Studi di neurotossicità condotti su cellule di neuroblastoma differenziate (linea S1) hanno rivelato che i PFAS agiscono come modulatori negativi dei recettori GABA-A. Attraverso tecniche elettrofisiologiche, è stata dimostrata una riduzione reversibile e dose-dipendente delle correnti ioniche evocate dal GABA, suggerendo che l'interazione con la trasmissione sinaptica inibitoria rappresenta un evento molecolare chiave (Key Event) nella tossicità di questa classe di composti.



L'impiego di tecniche di molecular docking ha ulteriormente validato tale ipotesi, mappando i siti di legame allosterico sui recettori e confermando la conservazione del bersaglio molecolare tra diverse specie. Il percorso valutativo è stato poi esteso alla caratterizzazione dell'immunotossicità, analizzando la risposta di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) umane. L'esposizione al PFOS ha indotto una significativa deregolazione della risposta infiammatoria stimolata da agenti patogeni (LPS e PHA), evidenziata dalla riduzione della secrezione di citochine pro-infiammatorie (IL-6, TNF- α) e anti-infiammatorie (IL-10). L'analisi proteomica ha permesso di identificare la compromissione di pathway molecolari critici, tra cui la via di segnalazione di NF- κ B e l'attivazione di segnali pro-apoptotici, delineando un quadro di immunosoppressione che potrebbe tradursi in una maggiore suscettibilità dell'ospite alle patologie infettive. L'integrazione di questi dati multidisciplinari ha permesso di strutturare un approccio basato sugli Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) e sulle New Approach Methodologies (NAMs). Tale metodologia rappresenta l'avanguardia della tossicologia moderna e trasforma radicalmente il modo di normare le sostanze chimiche: il passaggio dai test in vivo basati su endpoint apicali (come la mortalità) a test in vitro e in silico focalizzati sui meccanismi molecolari consente una valutazione del rischio più rapida, accurata e conforme al principio delle 3R. Le evidenze emerse indicano che i PFAS di nuova generazione, spesso introdotti come alternative più sicure, mostrano in realtà una tossicità meccanicistica sovrapponibile ai composti legacy, suggerendo la necessità di una regolamentazione di classe più restrittiva. In conclusione, il lavoro fornisce una solida base scientifica per l'implementazione di linee guida strategiche per la gestione dei PFAS a livello europeo, sottolineando come la protezione della salute umana non possa prescindere dalla salvaguardia dell'integrità degli ecosistemi.

La tesi contribuisce attivamente alla formulazione di politiche normative nel quadro del regolamento REACH, promuovendo un modello di valutazione che integri biologia molecolare, ecologia e tossicologia clinica per garantire la resilienza ambientale in un mondo caratterizzato da una pervasiva contaminazione chimica.



Luigi Signore

Titolo tesi

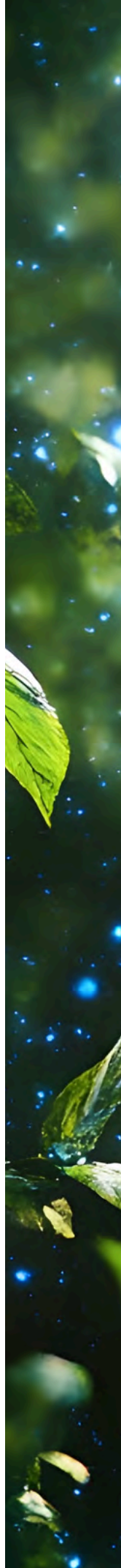
**Metodo molecolare per la
quantificazione della lunghezza
dei telomeri in *Tetrahymena
thermophila***

**UPO
Biologia**



La costante esposizione a contaminanti ambientali di diversa natura e pericolosità rende necessario lo sviluppo di tecniche in grado di identificare a più livelli, da quello molecolare a quello di popolazione e di ecosistema, i possibili effetti deleteri di queste sostanze, siano queste di natura organica o inorganica. Tra i biomarker di elevata rilevanza per la vita di un organismo eucariota si hanno i telomeri, soggetti chiave nella regolazione della stabilità cromosomica e del ciclo cellulare, la cui alterazione in lunghezza, tendenzialmente un accorciamento anomalo, porta a gravi ripercussioni sul sistema cellula, inducendone complicazioni fisiologiche e di conseguenza una maggiore probabilità di portarla a morte. La rilevanza del meccanismo di elongazione dei telomeri delle cellule eucariota viene enfatizzata dal fatto che il loro ruolo non è solo correlato al destino cellulare e all'invecchiamento di un organismo, ma anche alla regolazione della risposta cellulare allo stress. È altresì necessario che, per evitare l'avvio di processi di riparazione del DNA a livello telomerico, almeno un centinaio di nucleotidi ripetitivi vengano disposti in tale regione cromosomica in quanto, in caso opposto, la maggiore presenza col tempo di telomeri non opportunamente protetti o caratterizzati da una lunghezza esigua, porta a senescenza cellulare per riparazione DNA o anche all'avvio del processo apoptotico.

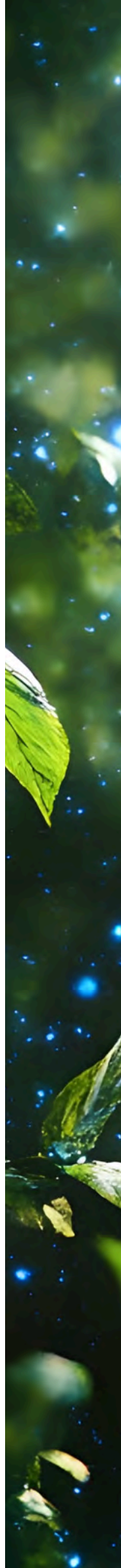
Tra i fattori regolanti la lunghezza telomerica si ha l'enzima, Telomerasi, una DNA polimerasi incaricata dell'estensione dell'estremità 3' del cromosoma eucariotico, tramite sintesi sequenziale di ripetizioni nucleotidiche. Oltre ad agire sul telomero, l'enzima vede l'associazione transitoria o costitutiva ad esso da parte di altre proteine, le quali partecipano nel processo di elongazione telomerica. L'enzima si costituisce essenzialmente da due componenti, una trascrittasi inversa telomerica (TERT) e una componente RNA telomerico (TER/TERC) agente da modello per l'estensione del telomero durante la fase di aggiunta delle ripetizioni nucleotidiche a livello di estremità cromosomica, componenti senza le quali si avrebbe accorciamento dei telomeri ed instabilità genomica. Oltre a tale enzima, nei mammiferi come nel ciliato *Tetrahymena thermophila* impiegato per la ricerca, il mantenimento dei telomeri è garantito da un vero e proprio interattoma, consistente in un insieme di interazioni di protezione del telomero, tra diverse proteine e il telomero stesso, portando al capping di questo. Al centro di queste interazioni si ha un complesso di sei proteine anche denominato telosoma o complesso Shelterin.



È chiaro che l'esposizione delle cellule a stressor di vario tipo, biotici e non, porta a ripercussioni proporzionate al tempo e all'intensità di questa. Tra i soggetti inquinanti destanti un crescente interesse in ambito tossicologico ed ambientale vi sono le sostanze fluorurate, presentanti lungo la catena di carbonio costituente un numero variabile di atomi di fluoro. Essendo un legame dal carattere molto forte e stabile, con un'energia di dissociazione pari a 544 KJ/mol, l'interazione che si instaura tra l'atomo di carbonio e quello di fluoro rende la molecola altamente resistente a diverse condizioni ambientali, il che si traduce in caratteristiche quali spiccata termoresistenza. A questi caratteri di resistenza si aggiunga la spiccata idrofobicità che, in presenza di gruppi funzionali come il solfonato e il carbossile può essere accostata da una idrosolubilità, il che rende le molecole fluorurate in grado di interagire con diverse matrici ambientali e biologiche, con tempi di permanenza di fatto illimitati, ragione per cui vengono denominati anche "Inquinanti eterni".

Dal punto di vista di rilevanza ecologica, la famiglia dei PFAS può essere suddivisa in due classi principali: PFAS polimerici e non polimerici, rispetto ai quali si tende a focalizzarsi maggiormente sui secondi per via di diversi aspetti, come il fatto che sono i più rilevati a livello di tessuti umani e nelle diverse matrici ambientali. In aggiunta, i PFAS polimerici sono generalmente considerati a rischio immediato minore per la salute umana e l'ecologia rispetto ad alcuni PFAS non polimerici, in quanto possono ancora scindersi nelle componenti monomeriche. Il fatto che le sostanze fluorurate si identifichino nella maggior parte dei casi a livello ematico ed epatico mette in risalto la loro affinità nei confronti delle strutture proteiche, aspetto riscontrato anche dal fatto che oltre il 90% dei PFAS totali presenti nell'organismo appare legato all'Albumina Sierica Umana (HSA) ovvero la proteina più abbondante nel nostro corpo. Per quanto concerne la proteinofilia dei composti fluorurati si è osservato come i composti a catena lunga mostravano un grado di affinità di 1-2 volte maggiore rispetto quella data dai composti a catena corta.

Impiegate in quasi tutti i settori industriali, le sostanze fluorurate sono riscontrabili in diversi prodotti quotidiani e di ampio consumo civile, come ad esempio negli imballaggi alimentari, nei mobili e nelle pentole, come in numerose vie di produzione di attrezzatura militare. Tra gli impieghi meno recenti si ritrovano l'ambito tessile e la produzione schiume antincendio.



L'utilizzo di tali molecole altamente resistenti avviene anche sotto forma di tensioattivi o polimeri, sempre utilizzati in industria e commercio. Proprio in relazione a tale utilizzo massivo delle sostanze fluorurate che ne è conseguito un facile rintracciamento a livello ambientale, in organismi vegetali e animali.

L'organismo impiegato per condurre il progetto, il ciliato *Tetrahymena thermophila*, si è prestato a tale tipologia di ricerca in quanto già oggetto in passato di analisi in questo ambito. Questo organismo unicellulare rappresenta infatti tutt'ora un importante modello eucariota utile nella ricerca sperimentale. Tra le diverse ricerche nelle quali l'organismo è stato di rilevante importanza ritroviamo la scoperta dell'enzima telomerasi e sul suo meccanismo di azione, ricerche sui cigli, la scoperta della proteina Dineina, l'analisi genetico-citologica della Tubulina e delle modifiche post traduzionali di questa molecola proteica, a cui si aggiungono le scoperte di diversi principi biologici di base. Sono numerose le caratteristiche che rendono *Tetrahymena thermophila* un'ideale soggetto per scopi di ricerca in differenti ambiti, partendo dalla sua capacità di esprimere un elevato numero di ciglia, la cui motilità viene anche studiata per osservare eventuali stati stressogeni, e un breve tempo di replicazione, per il quale sono sufficienti tre ore a temperatura di circa 30° C, a cui si aggiungono l'elevata concentrazione cellulare raggiungibile in coltura, fino a 10⁶ cellule/ml, e la facile modifica genetica tramite ricombinazione del DNA. Le strutture ciliari di cui si dota la cellula ad esempio, che donano motilità all'organismo, sono facilmente sostituibili e rigenerabili.

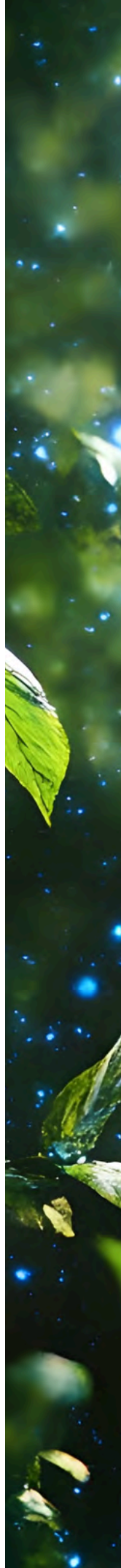
L'attività sperimentale, condotta all'interno del gruppo di ricerca di ecologia molecolare dell'Università del Piemonte Orientale, si è posta l'obiettivo di mettere a punto un metodo molecolare che possa permettere l'analisi delle eventuali alterazioni a livello di lunghezza telomerica relativa nell'organismo ciliato *Tetrahymena thermophila*, a seguito dell'esposizione a concentrazioni crescenti di cadmio, metallo pesante altamente studiato in più ambiti di ricerca per via della sua tossicità intrinseca, tipica dei metalli pesanti a cui questo elemento appartiene.



Una volta effettuata la convalida del metodo, si è andati a valutare eventuali ripercussioni al medesimo livello molecolare, attraverso l'esposizione dei soggetti a quattro singoli congeneri di molecole fluorurate più comunemente riscontrate nelle matrici ambientali e a livello di bioaccumulo nei tessuti animali ed umani, a catena lunga, acido perfluorooottanoico (PFOA) e acido perfluorooottansolfonico (PFOS), e a catena corta, acido perfluorobutanoico (PFBA) e acido perfluorobutansolfonico (PFBS), questo anche per avere riscontro con la bibliografia riguardo tali sostanze, come il potenziale danno che queste possono indurre nei confronti della cellula, aspetto quest'ultimo spesso correlato con l'allungamento della catena carboniosa costituente, oltre che al gruppo funzionale presentante.

Si è potuto osservare come al di sopra delle concentrazioni identificate come NOEC ($458 \mu\text{M}$) le sostanze fluorurate prese in considerazione, portano ad alterazioni metaboliche più marcate e talvolta queste venivano totalmente inibite in quanto i soggetti venivano a perire per l'elevata concentrazione di esposizione al contaminante. Tale alterazione delle attività metaboliche non è necessariamente associata ad una loro diminuzione; infatti spesso negli esperimenti condotti si è osservato un aumento di queste, suggerendo una reazione cellulare nell'ottica di contrasto dell'inquinante, aspetto che tuttavia non è sinonimo di corretto stato fisiologico della cellula. Da tale aumento dell'attività metabolica deriva anche un incremento delle possibilità di genesi di specie reattive dell'ossigeno, che a loro volta inducono ripercussioni negative sul sistema cellula.

L'esposizione ai PFAS per l'analisi delle alterazioni della lunghezza relativa dei telomeri è dunque stata effettuata a una concentrazione identificativa della not observed effect concentration (NOEC), precedentemente ottenuta attraverso specifici saggi di attività metabolica basati sul saggio colorimetrico dell'Alamar Blue, quindi tramite messa a punto di test in piastre a pozzetti a livello dei quali venivano collocati volumi noti di sospensione dell'organismo esposto a concentrazioni note dei singoli congeneri di molecole fluorurate. Per ogni congenere testato si sono preparate due piastre, in ognuna delle quali ogni condizione è rappresentata da 6 replicati, ogni pozzetto dei quali conteneva un volume di $100 \mu\text{l}$ di campione-condizione. Tutti i pozzetti perimetrali sono stati riempiti con $150 \mu\text{l}$ di acqua milliQ, atta a evitare l'evaporazione dei campioni presenti nel resto dei pozzetti. Le piastre sono state collocate in termostato ad una temperatura di $29,5^{\circ}\text{C}$. La piastra è



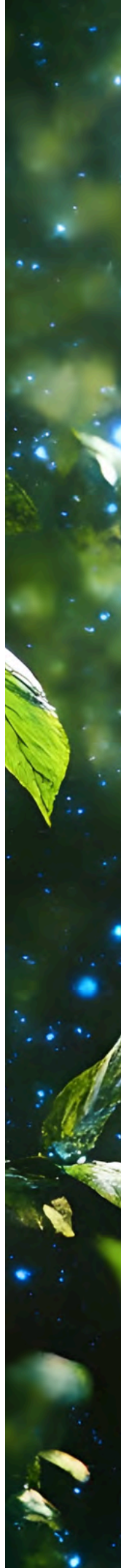
stata prima collocata, e mantenuta per l'intero arco di tempo di esposizione in incubatore, all'interno di una cameretta di plastica nella quale si sono posti fogli di carta imbevuti di acqua milliQ, in modo tale da ovviare al problema dell'evaporazione dei liquidi durante le ore di esposizione alla temperatura impostata.

Le sperimentazioni effettuate con il ciliato *Tetrahymena thermophila* hanno richiesto un'accurata ricerca bibliografica, che ha condotto alle pubblicazioni di Cawthon (Cawthon et al., 2009) e Joglekar (Joglekar et al., 2020), consistenti nella messa a punto di una tecnica molecolare per l'analisi della lunghezza relativa dei telomeri di cellule umane, lunghezza (T) confrontata con quella di un gene a singola copia (S) attraverso due reazioni di qPCR, utilizzando specifici primer per i due target di interesse. I risultati della reazione di amplificazione forniscono la lunghezza relativa media del telomero sotto forma di rapporto T/S.

Essendo il nostro un organismo ciliato, si è reso necessario il riadattamento di questa tecnica per poterla applicare nel caso in analisi, partendo dalla messa a punto di nuove sequenze di primer specifiche per *Tetrahymena*, in quanto presentante terminazioni telomeriche diverse da quelle dei mammiferi.

Da questi esiti si deduce come l'esposizione ad una specifica tipologia di PFAS possa impattare in modo differente sulla lunghezza telomerica, sia esso un effetto negativo accompagnato da accorciamento telomerico, che un effetto apparentemente "positivo" dato da una presunta elongazione del telomero. Dalla graficazione soprastante si osserva infatti come i PFAS in analisi esprimano effetti contrastanti. Sebbene ad esempio il PFOS si sia mostrato come l'unica molecola che effettivamente può essere associata ad una, non molto marcata, fase di accorciamento telomerico, è anche vero che tutti gli altri PFAS, in particolar modo il PFOA, sembrano portare ad un allungamento. Questo aspetto porta a sottolineare che tutte e quattro le specie fluorurate, prese singolarmente, sono effettivamente capaci di indurre un'alterazione della lunghezza telomerica.

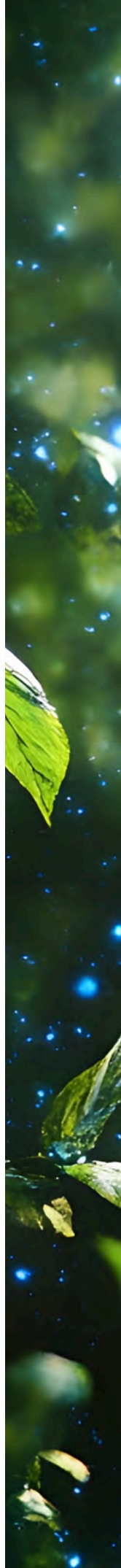
Per validare e confermare le osservazioni sperimentali condotte in questo elaborato finale sono stati utilizzati differenti test di statistica inferenziale. In primo luogo, è stato condotto un test per valutare la distribuzione normale



dei dati raccolti utilizzando test di Shapiro-Wilk, se p-value risultava <0.05 questi possedevano una distribuzione anormale e sono stati trattati con test non parametrici; viceversa, se p-value risultava >0.05 questi possedevano una distribuzione normale e sono stati trattati con test parametrici. Per il confronto di ipotesi è stato utilizzato il test di ANOVA, comune test parametrico, quando i dati erano distribuiti normalmente e il test di Kruskal-Wallis quando i dati non rispettavano una distribuzione normale. Successivamente è stato condotto il post hoc test di Dunn per confrontare ogni condizione contro la condizione di controllo.

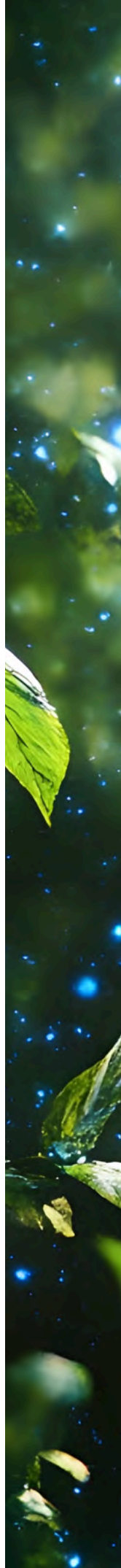
Dagli esiti ottenuti dalle esposizioni a 24 ore a composti fluorurati non è stato osservato un assoluto processo di accorciamento telomerico associato al crescere delle concentrazioni di esposizione, aspetto che porta a ipotizzare che non sia univoco il collegamento di proporzionalità diretta tra esposizione e diminuzione della lunghezza dei telomeri. L'andamento mostrato dagli organismi presi in analisi non è apparso infatti come una relazione dose-risposta, ma sotto forma di ormesi. Sebbene in diversi esperimenti si sia notato che il PFOS (8C) sia la molecola che più impatta sulla lunghezza telomerica, è altrettanto vero che non sempre i telomeri sono risultati accorciati a seguito dell'esposizione a queste sostanze, suggerendo la necessità di ulteriori indagini ed una maggiorata esposizione temporale, oltre quindi le 24 ore previste. In contrasto con la conoscenza bibliografica odierna appare anche l'effetto non dipendente dalla lunghezza della catena carboniosa principale costituente il PFAS. Si è osservato infatti come il PFOA, congenere con gruppo carbossilico ed una catena carboniosa di 8 atomi di carbonio e la controparte solfonata, il PFOS (C8), non sia stato sempre il PFAS dal maggior impatto sulla normale fisiologia dei soggetti esposti.

In relazione a ciò, è stato riscontrato come alcune specie di composti fluorurati, come nel caso del PFOA, siano in grado di portare a livello della cellula ad un presunto allungamento telomerico. Una distinzione di effetto molecolare come questa suggerisce che, anche a disparità di concentrazione di esposizione, l'effetto che tali sostanze possono indurre nella cellula è correlato maggiormente alla tipologia di molecola rispetto alla sua concentrazione.



Da questi esiti di ricerca deriva anche la necessaria amplificazione del tempo di esposizione dei campioni, anche alle concentrazioni inferiori alla NOEC identificata in queste sperimentazioni, in quanto è assodato, e visto anche nei saggi di attività metabolica condotti, che tali sostanze non inducono la morte di un organismo a seguito di esposizioni acute, se non raggiungendo concentrazioni letali nell'ordine del "mM", ma ne inducono alterazioni metaboliche quando l'esposizione viene a cronicizzare e impattare anche sulla progenie cellulare, alterazioni capaci con il tempo di portare a ripercussioni nel sistema cellula tali da amplificare l'effetto di danni o squilibri di norma risolvibili dai meccanismi di riparazione di cui la cellula è dotata.

Il fatto che, a concentrazioni sub letali, non sia stato sempre apprezzato un effetto negativo sulla lunghezza telomerica delle cellule non deve tuttavia essere interpretato come assenza di ripercussioni sul soggetto esposto o come un beneficio, in quanto è altresì vero che non solo l'accorciamento dei telomeri può rappresentare un pericolo per la cellula, ma anche il loro eventuale anomalo allungamento può portare con sé a ripercussioni sulla fisiologia cellulare. Le anomalie riscontrate portano in risalto l'importanza di proseguire le ricerche nei confronti di queste molecole, ormai diffuse in tutto il globo e altamente resistenti alla biodegradazione, dunque persistenti in ambiente e facilmente bioaccumulabili nei sistemi viventi.



Sofia Vaccarino Ruiz

Titolo tesi

**Urban green areas and road
verges: a comparative study on
pollinator communities and
pollination in Uppsala**

UNITO

Scienze Naturali

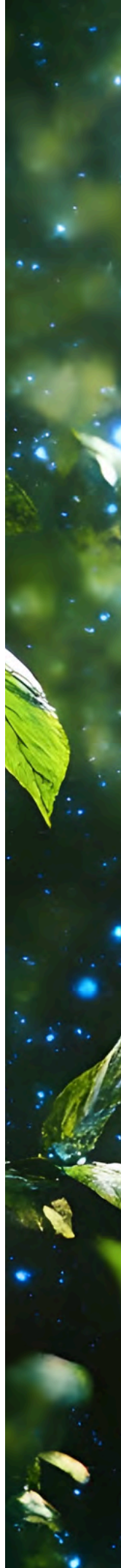


Gli impollinatori includono una grande varietà di organismi, dagli insetti (principalmente imenotteri, lepidotteri e ditteri) ai vertebrati. Essi forniscono servizi ecosistemici essenziali per la riproduzione delle piante e per la sicurezza alimentare. Circa il 75% delle principali colture mondiali dipende dall'impollinazione animale. L'urbanizzazione causa perdita e frammentazione degli habitat, inquinamento e introduzione di specie aliene, tutti fattori che influiscono negativamente sugli impollinatori. Tuttavia, i parchi urbani possono ospitare comunità di impollinatori. I bordi stradali (road verges) rappresentano un altro importante habitat urbano, spesso sottovalutato, in grado di sostenere la biodiversità e fornire servizi ecosistemici se gestito in modo appropriato.

Questo lavoro ha analizzato la comunità di impollinatori a Uppsala (Svezia), concentrandosi su Apoidea (Imenotteri) e sirfidi (Ditteri), nonché sul successo riproduttivo di *Trifolium repens* in relazione alle comunità di impollinatori osservate. Sono stati confrontati due tipi di habitat: aree verdi urbane (GA) e bordi stradali (RV). Sono state effettuate cinque ripetizioni di campionamento tra maggio e agosto 2024 in dodici siti, ciascuno comprendente due GA e due RV (per un totale di 48 località, 24 RV e 24 GA). Gli impollinatori sono stati raccolti mediante trappole a vaschetta colorate (gialle, bianche e blu) dipinte con vernice riflettente ai raggi UV per simulare i fiori. Le infiorescenze di *T. repens* sono state raccolte entro 150 m dalle trappole. Il successo riproduttivo per ciascuna infiorescenza è stato quantificato come la frazione di baccelli per infiorescenza rispetto al numero totale di fiori.

Le analisi sono state condotte mediante modelli lineari generalizzati a effetti misti (GLMM), con distribuzione di Poisson per gli impollinatori e distribuzione gamma con link inverso per il successo di impollinazione. I sirfidi non hanno mostrato differenze significative in abbondanza o ricchezza di specie tra RV e GA; tuttavia, sia la loro abbondanza sia la loro ricchezza sono risultate positivamente associate al successo riproduttivo di *T. repens*.

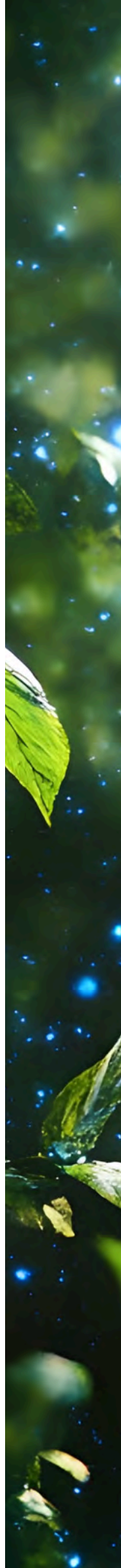
Al contrario, gli Apoidea sono risultati significativamente più abbondanti nelle GA rispetto alle RV, ma né l'abbondanza né la ricchezza si sono tradotte in un maggiore successo riproduttivo di *T. repens*. Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa tra i due habitat (RV vs. GA) nel successo di impollinazione.



Gli Apoidea necessitano di siti di nidificazione idonei e di una disponibilità stabile di fiori; nei bordi stradali, sfalci frequenti, uso di erbicidi, contaminanti (metalli, sale) e traffico compromettono tali fattori, rendendo le RV meno favorevoli rispetto alle GA. I sirfidi sono più flessibili perché sono generalisti floreali e non dipendono da un nido fisso; la loro elevata mobilità consente di sfruttare patch di risorse frammentate, riducendo le differenze tra RV e GA. Nei bordi stradali, gli Apoidea mostrano una minore costanza floreale e un maggiore trasferimento di polline eterospecifico, in parte a causa della scarsità o dell'asincronia della fioritura; di conseguenza, un numero maggiore di api non implica necessariamente un successo riproduttivo più elevato. Al contrario, l'elevata mobilità e il foraggiamento generalista dei sirfidi favoriscono il trasferimento di polline conspecifico anche tra patch isolate.

Migliorare le condizioni delle comunità di impollinatori in contesti urbani è essenziale, poiché è probabile che in futuro si verifichino ulteriori riduzioni dei loro habitat. Per migliorarne le condizioni ecologiche, è inoltre necessario studiare gli ambienti urbani che, fino a tempi recenti, sono stati considerati meno rilevanti per la conservazione degli impollinatori.

Per quanto riguarda le funzioni dei bordi stradali, sebbene sembrano ambienti più impegnativi per gli impollinatori, in particolare per gli Apoidea, potrebbero svolgere un ruolo cruciale come habitat di supporto all'interno della rete urbana di impollinazione.



Beatrice Valentini

Titolo tesi

**SustWine linking wine typicity,
biodiversity, and environmental
matrix**

**UNITO
Biologia**

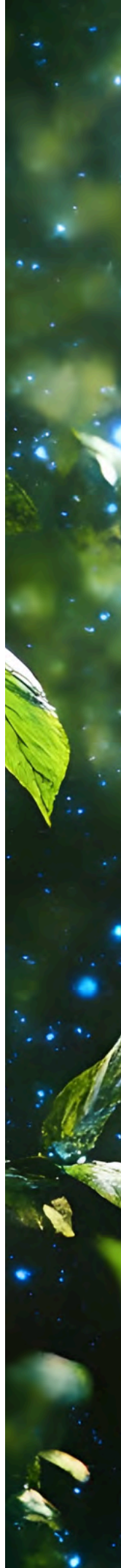


Questo lavoro di dottorato esplora le complesse interazioni tra ecosistemi vitivinicoli, biodiversità microbica e fattori ambientali, con l'obiettivo di comprendere come tali interazioni influenzino la qualità del vino e la tipicità legata al terroir. Tradizionalmente, il concetto di terroir si riferisce alle caratteristiche fisiche e geografiche di un vigneto, come suolo, topografia, clima e microclima, che contribuiscono a determinare le proprietà organolettiche del vino. Tuttavia, ricerche recenti hanno evidenziato l'importanza dei fattori biologici, in particolare delle comunità microbiche presenti sulle uve e nei vigneti, come elementi fondamentali del terroir stesso, capaci di influenzare fermentazione, aroma, gusto e complessità del prodotto finale.

La tesi ha indagato il ruolo della biodiversità microbica e degli insetti vettori nel determinare la composizione e la dinamica dei lieviti nei vigneti, integrando approcci ecologici, molecolari, e chimico-analitici. Il primo obiettivo è stato verificare l'influenza della vicinanza ad aree boscate sulla diversità microbica dei vigneti. Vespe sociali e altri insetti sono stati catturati in sei vigneti appaiati per distanza dal bosco, e i lieviti isolati dai loro apparati digerenti sono stati identificati mediante tecniche di PCR-RFLP e sequenziamento Sanger. I risultati hanno mostrato che gli insetti provenienti da vigneti prossimi ai boschi ospitavano comunità di lieviti più abbondanti e diversificate, dimostrando il ruolo cruciale dei mosaici vigneto-bosco nel sostenere la biodiversità microbica e, di conseguenza, nel mantenere la tipicità dei vini.

Successivamente, lo studio è stato ampliato a 51 vigneti, considerando variabili ambientali come caratteristiche del suolo, varietà di uva, gestione agronomica e copertura vegetale. Sei vigneti rappresentativi sono stati selezionati per indagini approfondite sulla biodiversità degli artropodi e sul microbiota ad essi associato. Complessivamente, sono stati isolati 170 ceppi di lieviti appartenenti a 18 specie, evidenziando associazioni specifiche tra ordini di insetti e specie di lieviti. Questi dati confermano che gli insetti non agiscono solo come vettori passivi, ma facilitano scambi genetici e processi di ibridazione all'interno delle popolazioni microbiche, contribuendo alla distribuzione e adattabilità dei lieviti nei vigneti.

Per migliorare la precisione nell'identificazione dei lieviti, sono stati ottimizzati



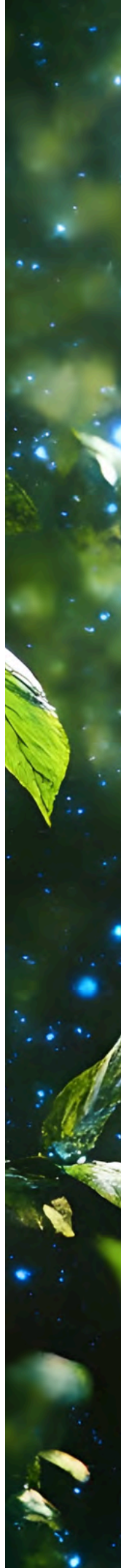
protocolli molecolari e sviluppata la banca dati Fld – Fungal Identifier, uno strumento innovativo capace di identificare oltre 1.400 specie di lieviti.

Fld rappresenta un collegamento tra approcci tradizionali di culturomica e metodologie genomiche moderne, offrendo uno strumento di facile accesso ed economico per il monitoraggio dei microrganismi nei vigneti, fondamentale per la gestione sostenibile della viticoltura.

Lo studio ha inoltre indagato l'influenza delle pratiche di gestione agronomica sulla biodiversità microbica e artropodica. È emerso che i vigneti gestiti con pratiche biologiche supportano una maggiore diversità di insetti rispetto a quelli convenzionali, nei quali l'uso intensivo di prodotti fitosanitari riduce significativamente la biodiversità. Tuttavia, la composizione delle comunità di lieviti sembra essere determinata più dai fattori ambientali globali, come caratteristiche del suolo e copertura vegetale, che dalle pratiche di gestione diretta. Specifiche associazioni tra specie di lieviti e taxa di artropodi suggeriscono interazioni mutualistiche che contribuiscono alla salute complessiva del vigneto e alla stabilità ecologica.

Infine, la ricerca ha valutato l'impatto della diversità microbica sulla qualità del vino, mostrando come le comunità microbiche influenzino le dinamiche di fermentazione e il profilo volatile dei vini. È stata confermata l'esistenza di "impronte microbiche" legate al terroir, con fermentazioni spontanee che mantengono distinti profili microbici e organolettici in base alla provenienza del vigneto. Questi risultati sottolineano l'importanza di preservare la biodiversità microbica come fattore chiave nella definizione del terroir e della tipicità del vino.

In sintesi, questo lavoro integra concetti di ecologia, genomica, microbiologia e enologia per fornire una visione completa degli ecosistemi vitivinicoli, evidenziando come la conservazione della biodiversità e la gestione sostenibile dei vigneti possano migliorare la qualità del vino, la resilienza dei lieviti e la tipicità territoriale. Le evidenze emerse forniscono strumenti pratici per la viticoltura di precisione, suggerendo strategie di conservazione del mosaico vigneto-bosco e di gestione dei microrganismi, essenziali per affrontare le sfide poste dai cambiamenti climatici e promuovere una produzione vinicola ecologica, innovativa e distintiva.



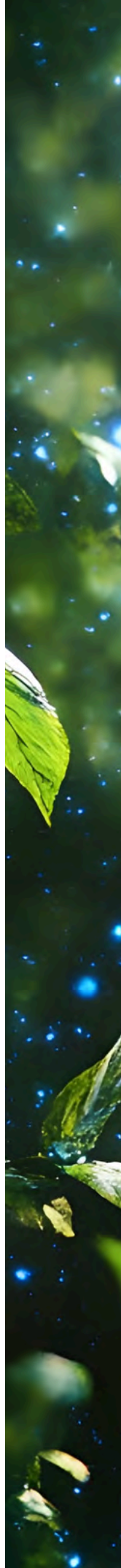
Francesco Zanetti

Titolo tesi

**Studio della disponibilità di fiori
per gli impollinatori lungo un
gradiente altitudinale nel
Parco Nazionale Gran Paradiso**

UNITO

Scienze dei Sistemi Naturali



I fiori sono una risorsa fondamentale a sostegno degli impollinatori. La disponibilità stagionale di fioriture influisce sulla comunità di insetti pronubi, allo stesso modo l'altitudine fa variare la diversità vegetale e le disponibilità nutrizionali per gli impollinatori. L'obiettivo è comprendere quale influenza ha il gradiente altitudinale sulla disponibilità di fiori impollinati da insetti nell'arco della stagione.

Sito: Nelle Alpi Graie orientali, in particolare le valli Orco e Soana, il gradiente altitudinale è di circa 900m (da 1300 a 2200 msl) di dislivello.

Metodi: Nel 2023 e 2024, a cadenza di 15 giorni da fine giugno a inizio settembre, sono stati svolti rilievi fitosociologici della sola copertura fiorita distinta per specie, in 3 stazioni per vallata. In parallelo sono stati rilevati gli insetti pronubi. Sono state quindi elaborate le relazioni nel tempo tra gli indici di alfa biodiversità, poi inseriti in modelli per meglio comprendere l'andamento stagionale paragonando le tre fasce altitudinali. Infine è stata studiata la beta diversità lungo il gradiente altitudinale, estrapolando le specie indicatrici per ogni stazione.

Risultati e discussione: L'alfa e beta diversità variano al variare della quota e al progredire della stagione in modo significativo ma diverso nelle 2 vallate, questa differenza può essere spiegata dalla diversa geomorfologia del territorio e dagli eventi di disturbo (principalmente pascolamento) che hanno interessato entrambe le vallate ma con cadenza e intensità diversa.

Conclusione: l'analisi della risorsa florale potrebbe proseguire prendendo in esame le differenze tra le due annate, principalmente differenze meteorologiche. Definendo com'è ripartita la risorsa florale tra le forme biologiche vegetali. Inoltre sarebbe opportuno studiare una selezione di tratti floreali al fine di categorizzare le specie rilevate. L'obiettivo interdisciplinare conseguente consisterebbe nell'abbinare questo studio al monitoraggio svolto in concomitanza degli insetti impollinatori. Questo per poter evidenziare relazioni preferenziali piante-impollinatori e la modularità di questi assortimenti di specie da cui estrapolare delle eventuali specie chiave, cruciali per meglio definire un piano di gestione e conservazione dell'ecosistema.

