



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E
AMBIENTE - DAFNAE

Corso di laurea in Tecnologie Forestali e Ambientali

***Effetti della diffusione di sostanze poli- e
perfluoroalchiliche (PFAS) in ambiente forestale:
bioaccumulo nelle piante e possibili implicazioni dalla
loro diffusione***

Relatore: Giancarlo Renella

Laureanda: Irene Renosto
Matricola n°: 1233903

ANNO ACCADEMICO: 2022 – 2023

INDICE

Riassunto	3
Abstract	4
1. Le sostanze perfluoroalchiliche (PFAS)	5
1.1 La struttura chimico-fisica delle PFAS	5
1.2 La produzione e le applicazioni industriali	7
2. Le PFAS nell'ambiente e l'aspetto legislativo	11
2.1 La diffusione ambientale	11
2.2 Il concetto di rischio ambientale e l'analisi di rischio	12
2.3 Le politiche ambientali nell'Unione Europea	14
2.4 L'evoluzione della normativa nazionale	16
2.5 Il caso di contaminazione da PFAS nel Veneto	19
3. Il suolo e le sue funzioni	21
3.1 L'accumulo di PFAS nel suolo	22
3.2 L'assorbimento di PFAS da parte delle piante	23
3.3 Il bioaccumulo e la biomagnificazione	29
4. I principi e le tecniche di biomonitoraggio	32
4.1 Gli apoidei e il loro ruolo	32
4.2 Le api: bioindicatori ambientali	34
4.3 L'evoluzione del biomonitoraggio	35
5. Dall'assorbimento delle PFAS nelle piante all'impatto sulle popolazioni di apoidei	37
5.1 L'effetto dell'esposizione della PFOS sulle api	37
6. Discussioni e conclusioni	46
Bibliografia e sitografia	50

RIASSUNTO

Il mio elaborato di tesi concerne il problema dell'inquinamento ambientale da sostanze poli- e perfluoroalchiliche, collettivamente raccolte sotto l'acronimo PFAS e le implicazioni della loro diffusione nell'ambiente forestale. Le PFAS sono molecole con bassa affinità sia per le fasi acquose sia idrofobiche; sono inquinanti molto persistenti nell'ambiente poiché il forte legame chimico tra carbonio e fluoro le rende non biodegradabili. Grazie alle loro caratteristiche chimiche, prodotte per oltre sessanta anni, tali sostanze hanno trovato vasta applicazione in tanti settori industriali, ma se disperse nell'ambiente, le PFAS sono trasportate nei corpi idrici e tendono ad accumularsi nel suolo a concentrazioni molto variabili a seconda delle molecole rilasciate e delle caratteristiche del contesto interessato dal fenomeno. Acque e suoli contaminati costituiscono le principali sorgenti secondarie di PFAS per le piante e gli animali e una volta assorbite tali sostanze entrano e si diffondono nella rete trofica, impattando tutti gli organismi viventi, incluso l'uomo. In Veneto, una vasta area compresa tra le provincie di Vicenza, Verona e Padova è stata inquinata da scarichi industriali incontrollati causando l'inquinamento di fiumi, suoli e vegetazione, con conseguenze rilevanti anche per la salute umana. Nella zona maggiormente colpita dall'inquinamento sono state attuate misure di protezione della salute umana attraverso il trattamento delle acque potabili e sono stati attuati screening del contenuto di PFAS nei prodotti agroalimentari. Invece nessuna misura di monitoraggio o di protezione è ad oggi prevista per gli ambienti boschivi o forestali. Nella mia tesi approfondisco e discuto dati di letteratura relativi ai meccanismi che portano all'accumulo di PFAS in suoli e piante forestali, ed illustro l'evoluzione dei sistemi di monitoraggio delle ripercussioni sulla biologia delle api e sulla contaminazione del miele, come esempio di potenziale impatto ecologico nell'ambiente forestale. Concludo sottolineando che la mia ricerca bibliografica mostra come gli studi di inquinamento e diffusione delle PFAS negli ambienti forestali, di assorbimento delle PFAS da parte di piante forestali e dei potenziali effetti sugli ecosistemi forestali siano ancora molto pochi e che nei pochi studi esistenti raramente coinvolgono specialisti del settore forestale. Queste figure professionali risultano essere necessarie poiché possiedono le competenze per inquadrare i possibili rischi ambientali e quindi per proporre le più adatte misure di protezione dell'ambiente forestale.

ABSTRACT

My thesis concerns the problem of environmental pollution by poly- and perfluoroalkyl substances, collectively collected under the acronym PFAS and the implications of their diffusion in the forest environment. PFAS are molecules with low affinity for both the aqueous and hydrophobic phases, they are very persistent pollutants in the environment since the strong chemical bond between carbon and fluorine makes them non-biodegradable. Thanks to their chemical characteristics, produced for over sixty years, these substances have found wide application in many industrial sectors, but if released into the environment, PFAS are transported into water bodies and tend to accumulate in the soil at very variable concentrations depending on the molecules released but also on the characteristics of the environment. Contaminated water and soils are the main secondary sources of PFAS for plants and animals and once absorbed these substances enter and spread into the food web, impacting all living organisms, including humans. In Veneto, a large area between the provinces of Vicenza, Verona and Padua has been polluted by uncontrolled industrial discharges causing pollution of rivers, soils and vegetation, with significant impacts also on human health. In the area most affected by pollution, measures to protect human health have been implemented through the treatment of drinking water and screening of PFAS content in agri-food products has been implemented. On the other hand, no monitoring or protection measures are currently envisaged for forest or forest environments. In my thesis I deepen and discuss literature data on the mechanisms leading to PFAS accumulation in forest soils and plants, and illustrate examples of impacts on bee biology and honey contamination as an example of potential ecological impact in the forest environment. I conclude by pointing out that my literature research shows that studies of pollution and spread of PFAS in forest environments, the absorption of PFAS by forest plants and the potential impacts on forest ecosystems are still very few and that in the few existing studies rarely involve specialists in the forestry sector. Necessary professional figures who possess the skills to frame the possible environmental risks and propose the most suitable measures to protect the forest environment.

1. LE SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS)

Le sostanze perfluoroalchiliche comunemente e collettivamente raccolte sotto l'acronimo PFAS, sono una famiglia formata da più di 6.000 composti di origine antropica, costituiti da una catena alchilica idrofobica di lunghezza variabile e da un gruppo idrofilico terminale.

1.1 LA STRUTTURA CHIMICO-FISICA DELLE PFAS

A livello molecolare, si tratta di acidi organici forti, in cui il gruppo carbossilico può essere libero oppure solfonato, composti da molti atomi di carbonio (C) che possono essere parzialmente o completamente legati ad atomi di fluoro (F) e che insieme possono avere catene carboniose di lunghezza variabile da 2 a 12 atomi. La catena idrofobica può avere struttura lineare o ramificata e quando essa è completamente fluorurata, ovvero quando tutti gli atomi d'idrogeno sono sostituiti da atomi di F si parla di composti perfluorurati (PFC) (EFSA 2011). In relazione al tipo di gruppo funzionale e della sua carica elettrica le PFAS presentano proprietà di tensioattivi cationici, anionici o neutri. Alcuni esempi di PFAS con caratteristiche anioniche largamente utilizzate sono l'acido perfluorooctansolfonico (PFOS) appartenente alla classe dei solfonati e l'acido perfluorooctanoico (PFOA) appartenente ai carbossilati (Figura 1A e 1B).

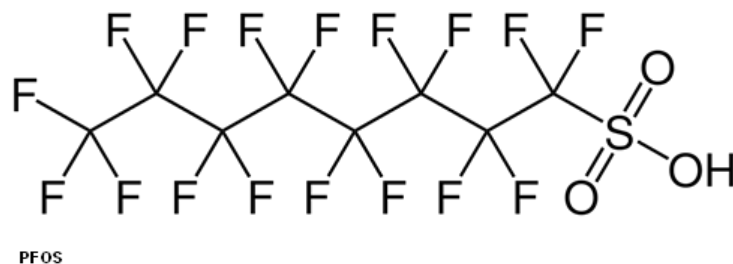


Figura 1A: rappresentazione della formula di struttura delle molecole di acido perfluorooctansolfonico (PFOS).

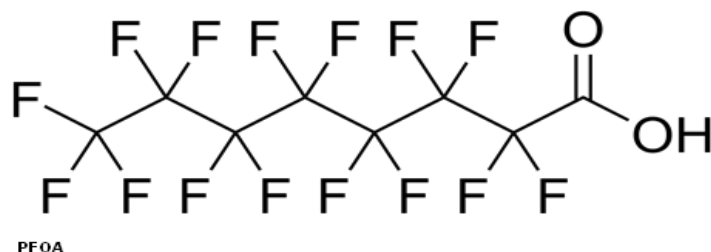


Figura 1B: rappresentazione della formula di struttura delle molecole di acido perfluorooctanoico (PFOA).

Il legame C-F nelle PFAS è molto forte perché di tipo covalente, ovvero i due elementi condividono una coppia di elettroni il che conferisce notevole stabilità termica, chimica e biologica a questi composti, se confrontato con le energie di legame tra C e altri elementi (Tabella 1).

Legame	C-N	C-Cl	C-C	C-O	C-H	C-F
Energia di legame [Kj/mol]	306	330	350	360	410	440

Tabella 1: confronto fra valori di energia di legame del C con altri elementi.

La forza del legame C-F, unitamente alle proprietà anfipatiche delle PFAS conferiscono a queste sostanze altre interessanti proprietà chimico-fisiche quali bassi punti di ebollizione e debole tensione superficiale. Queste proprietà rendono le PFAS sostanze chimiche estremamente resistenti al calore e alle variazioni di pH, e difficilmente solubili sia in acqua che nei lipidi. Inoltre, essendo inodori e incolori, queste sostanze sono state ampiamente utilizzate per la creazione di involucri protettivi di alimenti solidi e liquidi nell'industria alimentare.

Le sostanze perfluoroalchiliche sono costituite da una catena carboniosa di lunghezza variabile da C2 a C12 e, in funzione del numero di atomi di C, si classificano in due gruppi: a catena lunga e a catena corta. Le PFAS a catena lunga si riferiscono ad acidi perfluoroalchil-carbossilici con 6 o più atomi di C caratterizzati da una formula generale $C_nF_{2n}COOH$ (con $n \geq 6$), oppure ad acidi perfluoroalchil solfonici con 6 o più atomi di carbonio catalogati con formula generale $C_nF_{2n}SO_3H$ (con $n \geq 6$). Questa distinzione in base alla lunghezza dello scheletro carbonioso è importante poiché i due gruppi manifestano caratteristiche chimiche, fisiche e tossicologiche significativamente diverse. Le PFAS a catena lunga, quali ad esempio PFOS e PFOA, hanno dimostrato

di essere potenzialmente tossici, cancerogeni e bioaccumulabili, persistendo per lungo tempo nell'ambiente rispetto alle PFAS a catena corta, sebbene gli studi recenti non sempre confermano questi diversi comportamenti. Comunque, accertata la pericolosità, la loro produzione libera ad oggi è stata bandita o confinata in pochi siti di produzione a ciclo chiuso.

1.2 LA PRODUZIONE E LE APPLICAZIONI INDUSTRIALI

Le PFAS sono state sintetizzate a partire dagli anni '40 e da allora sono state utilizzate per una vasta gamma di applicazioni industriali e commerciali.

Esempi del loro utilizzo comprendono rivestimenti protettivi, tessili, pesticidi, strumenti medici, packaging alimentare, prodotti cosmetici e per la cura della persona, vernici, utensili, schiume ignifughe, detersivi e cere per pavimenti e molti altri.

Le applicazioni più note sono, probabilmente, il rivestimento antiaderente per il pentolame da cucina (Teflon®), la produzione di indumenti impermeabilizzati (per esempio il GoreTex®) e l'antimacchia per tessuti (Scotchgard® della 3M).

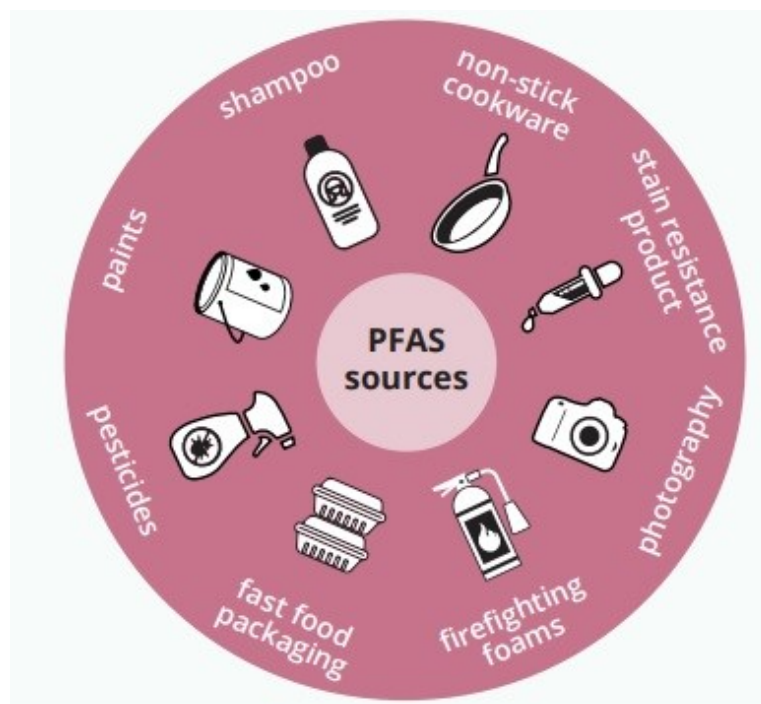


Figura 2: prodotti di uso personale e quotidiano che contengono PFAS.

Un altro settore che sfrutta PFAS, in particolare quelli non polimerici è quello dei pesticidi e biocidi. Possono essere usati con due scopi: o per regolare la crescita delle piante, usandoli quindi come sostanze attive come per esempio i sulfamidici e gli erbicidi, oppure come sostanze inerti (esaltatori) in pesticidi.

Le PFAS sono prodotte con due metodi: la fluorurazione elettrochimica e la telomerizzazione. Fin dalla sua introduzione all'inizio negli anni 50', la fluorurazione elettrochimica è stata largamente ed estesamente utilizzata, soprattutto per i bassi costi di produzione che comportava. La maggior parte (fino al 90%) della produzione di PFOA derivava dal processo di fluorurazione elettrochimica, mentre la restante quota è stata sintetizzata per telomerizzazione, ma solo a partire dal 1975 (Prevedouros et al., 2006). La messa a punto della telomerizzazione è stata determinante nel ridurre la produzione di PFOA e, di conseguenza, le emissioni globali di tali sostanze nell'ambiente. Queste sostanze sintetiche sono state prodotte in grande quantità e utilizzate in tutto il mondo e proprio questo impiego massiccio e ad ampio spettro, senza conoscerne tossicità e pericolosità ha fatto sì che oggi l'ambiente risenta dell'inquinamento dovuto allo smaltimento di scarti di produzione, agli scarichi industriali non controllati e allo smaltimento dei rifiuti urbani.

Ci sono stati casi emblematici di inquinamento di acque e falde acquifere in vaste aree industrializzate di Stati Uniti, Canada, Europa e Cina, ma anche in zone remote non antropizzate come Artide e Antartide, poiché la loro persistenza ambientale implica un loro trasporto, anche a grande distanza, mediato dai movimenti delle matrici ambientali e degli organismi viventi.

In Italia, sebbene sia plausibile che la contaminazione possa essere molto diffusa a causa della sua storia industriale, due cluster di contaminazione ufficialmente accertati sono stati identificati: uno in Piemonte e uno Veneto. Essendo composti persistenti, se rilasciati in maniera incontrollata nell'ambiente vanno a contaminare acque e suolo dove vi permangono per decenni. In linguaggio scientifico, si dice che le PFAS hanno un'emivita lunga. Per questo motivo a livello nazionale ed internazionale sono state introdotte normative sempre più restrittive per la loro produzione e utilizzo che descriverò più dettagliatamente di seguito.

Nell'ultimo decennio la comunità scientifica si è focalizzata sullo studio del potenziale effetto tossico dei PFAS per l'uomo. A causa della struttura molecolare e della stabilità dei legami, hanno scoperto che queste molecole hanno un'elevata affinità per le proteine. Per questi motivi le PFAS, accumulandosi nella catena alimentare, si

possono poi ritrovare anche nel plasma umano. Diversi studi hanno dimostrato che una volta nell'organismo l'emivita delle PFAS è piuttosto lunga; principalmente si accumulano nel sangue e nel fegato, con effetti negativi sul sistema immunitario, endocrino e riproduttivo.

Sulla base della loro pericolosità, a partire dal 2000, sono state prodotte ed impiegate PFAS a catena corta, di 4 o 6 atomi di C, come sostituti di quelli a catena lunga. Tra queste l'acido perfluorobutanoico (PFBA), l'acido perfluoroesanoico (PFHxA), e l'acido perfluorobutan-sulfonico (PFBS). Nelle applicazioni industriali hanno proprietà simili a PFOS e PFOA, anche se meno efficienti. Quest'ultimi dovrebbero essere potenzialmente meno bioaccumulabili, ma sono comunque recalcitranti alla biodegradazione, però sono dotate di una mobilità maggiore nell'ambiente rispetto alle molecole a catena lunga, per la loro maggiore solubilità in acqua e minore affinità per le fasi solide del suolo.

Nel 2012 l'industria ha provato a sostituire i PFOS con molecole di nuova generazione prodotte con una tecnologia denominata 'GenX' (esa-fluoropropilene ossido-dimero acido). In breve tempo però quest'acido è stato rilevato in alte concentrazioni nelle acque profonde e superficiali, nei pressi degli impianti produttivi. Il livello registrato di GenX si è dimostrato superiore ai livelli precedentemente registrati di PFOA. Per questo non è risultato un valido sostituto.

Perseguendo l'eliminazione globale, un gran numero di PFAS emergenti, inclusi polifluoroalchil etere solfonati clorurati (Cl-PFAES) e p-perfluoro nonenoxybenzene sulfonate (PFNOBS), sono stati gradualmente introdotti per soddisfare la domanda del mercato. Ma anche di questi è stata dimostrata la presenza in varie matrici ambientali, organismi acquatici selvatici e esseri umani (Jin et al., 2020; Munoz et al., 2019).

Si stima che il totale degli stabilimenti che emettono potenzialmente PFAS sia dell'ordine di 100.000 solo in Europa, mentre a livello globale le emissioni di acidi perfluoroalchilcarbossilici (PFCA), precursori dei PFAS, nel 2000 ammontavano a circa 237 tonnellate, delle quali 200 sono rappresentate da PFOA (Prevedouros et al., 2006). Nei pressi delle industrie i livelli di inquinamento sono risultati i più allarmanti ma non bisogna trascurare anche le fonti indirette di rilascio di questi composti, che derivano per esempio dalla loro presenza sotto forma di residui dei prodotti che contengono PFOA (ottenuti mediante fluorazione elettrochimica), o in prodotti a base di fluorotelomeri come alcuni intermedi di produzione. Occorre tener presente anche che ogni processo di degradazione di queste molecole non necessariamente risolve il

problema della contaminazione ambientale e può rappresentare un'ulteriore fonte di dispersione.

L'utilizzo su ampia scala di queste sostanze, ha portato alla loro diffusione globale e a dimostrazione del fatto che questi contaminanti hanno un grande potenziale di bioaccumulo, esistono dati scientifici che riportano le concentrazioni di PFOS riscontrate sia nei predatori all'apice della catena alimentare (orso polare, foca, visone, aquila), sia nei livelli trofici più bassi anche in zone molto distanti dalle fonti legate alle attività umane. E proprio il fatto che siano state trovate tracce di PFAS finanche in Antartide ci fa pensare che questi inquinanti circolino nelle catene alimentari e nelle piante, fonte di nutrimento per molti animali.

2. LE PFAS NELL'AMBIENTE E L'ASPETTO LEGISLATIVO

2.1 LA DIFFUSIONE AMBIENTALE

Le PFAS presenti a livello ambientale derivano per lo più da procedimenti di fabbricazione, da operazioni di smaltimento, o dal rilascio da parte degli innumerevoli prodotti che li contengono.

I principali percorsi che fanno sono:

- 1) da scarichi degli impianti di produzione chimica;
- 2) da contaminazioni causate da schiuma filmogena acquosa, (AFFF);
- 3) da scarichi nel terreno durante lavori di dragaggio e movimento terra;
- 4) dalla lisciviazione di discarica di rifiuti solidi;
- 5) dal deflusso delle acque meteoriche e dei rifiuti urbani;
- 6) dall'emissioni in atmosfera dovute al trattamento termico di prodotti contenenti PFAS, ecc.

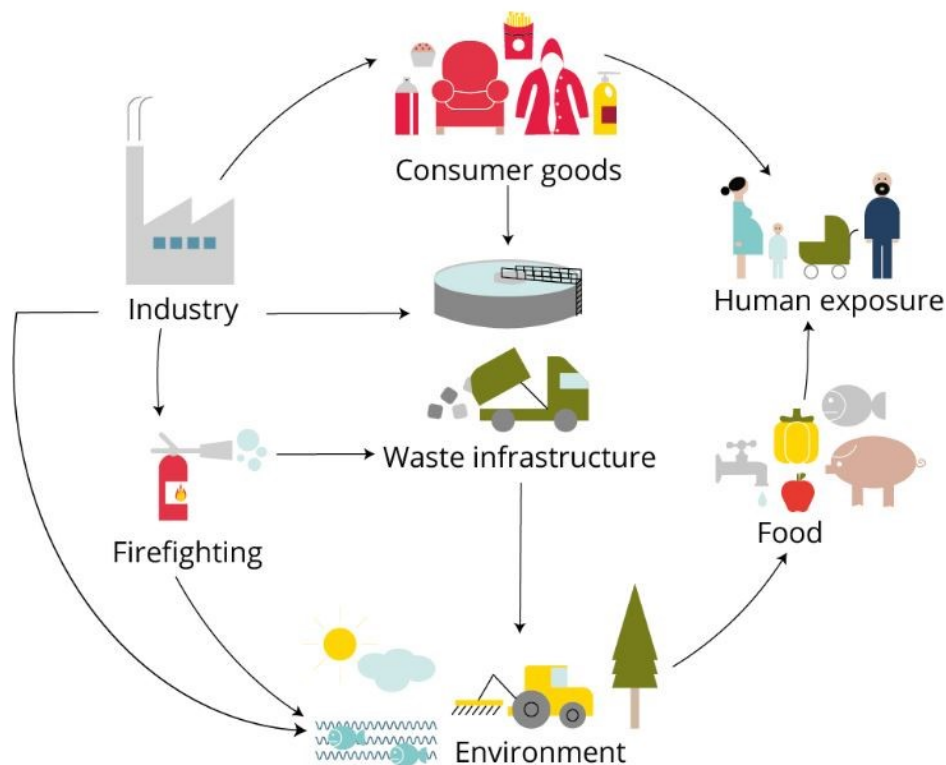


Figura 3: Principali vie di ingresso delle PFAS nell'ambiente e vie di esposizione umana.

Una recente meta-analisi di dati, pubblicati nella letteratura scientifica, dal 1999 al 2021 relativi alle 35 PFAS maggiormente utilizzate nell'industria e diffuse nell'ambiente ha mostrato che nelle acque sotterranee di 20 paesi del mondo le concentrazioni variano da ng/L a mg/L a seconda delle molecole, dell'ambiente e delle sorgenti di inquinamento considerati, con PFOA a concentrazioni <0.03 ng/L fino a 7 mg/L PFOS con concentrazioni tra 0.01 ng/L fino a 5 mg/L che si sono confermate le PFAS più diffuse (Johnson et al., 2022). Lo stesso studio ha altresì dimostrato che, dove fosse possibile il confronto, le concentrazioni delle PFAS rilevate nel suolo sono generalmente più alte rispetto a quelle presenti nelle acque. Questo è spiegabile col fatto che il suolo è costituito da fasi solide inorganiche ed organiche altamente reattive, che possono trattenerle con vari meccanismi chimici, che teoricamente dovrebbero favorire la stabilizzazione delle PFAS a catena lunga rispetto a quelle a catena corta. Mentre le acque potabili contaminate rappresentano la principale fonte di esposizione per l'uomo, la capacità di ritenzione rende il suolo una delle principali sorgenti secondarie per le piante e altri organismi viventi e la loro diffusione ubiquitaria può incidere significativamente sulla qualità e la disponibilità delle risorse idriche e alimentari di vaste aree del pianeta, oltre che destare preoccupazione per gli impatti sugli ecosistemi e sulla salute umana.

2.2 IL CONCETTO DI RISCHIO AMBIENTALE E L'ANALISI DI RISCHIO

Il rischio si può definire come la probabilità che un evento negativo si realizzi. Per rischio ambientale si intende la probabilità che un essere vivente subisca un danno in seguito all'esposizione ad agenti tossici. L'esposizione è il percorso che un elemento o una sostanza percorre tra il punto di emissione denominato sorgente del pericolo e i suoi potenziali bersagli. I bersagli possono essere sia organismi viventi che risorse naturali, entrambi possono subire un danno che quindi può essere biologico o ambientale. Un pericolo ambientale è una sorgente di possibile danno per l'ecosistema, ed è molto importante qui ricordare che le matrici ambientali contaminate quali acqua, atmosfera, suolo, piante e animali, rilasciano gli inquinanti in esse assumendo il ruolo di sorgenti secondarie nell'analisi di rischio.

Un rischio può essere evitato oppure può essere minimizzato attraverso azioni di controllo che derivano da processi di analisi e valutazione. L'analisi si compone di due fasi: valutazione del rischio e controllo del rischio, da queste derivano poi le azioni appropriate di risposta al rischio.

La valutazione del rischio ambientale è di tipo qualitativo e quantitativo e si compone delle seguenti fasi:

- 1) identificazione del pericolo attraverso la raccolta di dati e informazioni
- 2) analisi della risposta alla dose,
- 3) analisi dell'esposizione al rischio,
- 4) caratterizzazione del rischio.

Nel caso specifico delle PFAS, la fase di identificazione del pericolo consiste nella ricerca della relazione causale tra inquinanti e effetti negativi sulla salute umana, prima ancora che sull'ambiente. Ad esempio, a tale scopo, nel caso di inquinamento della regione Veneto sono stati incrociati i dati delle campagne di monitoraggio delle acque effettuate dall'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente (ARPAV) e i dati epidemiologici raccolti dall'azienda sanitaria locale (ULSS 8 Berica) di Vicenza, utilizzando principalmente l'approccio cluster di casi (*case cluster*). Approccio basato sull'osservazione di una frequenza anormale di effetti avversi sulla salute umana riscontrati nella popolazione residente nell'area contaminata ed epidemiologica con lo studio delle cause e della distribuzione di patologie nella popolazione umana in base a dati demografici e socio-psicografici.

Le informazioni sull'impatto ambientale delle PFAS nel cluster di contaminazione del Veneto sono invece ancora relativamente scarse. In merito sono stati redatti dei saggi eco-tossicologici dove vengono confrontati i dati biologici all'esposizione da PFAS di organismi di crescente complessità. Analogamente ai biosaggi, anche l'analisi dose-risposta (Figura 4) mira a definire la soglia di esposizione, cioè la dose massima per la quale non si riscontrano effetti avversi. Queste analisi ambientali ad oggi sono limitate ai laboratori degli Istituti di Ricerca e consistono nella valutazione dei danni derivanti dall'esposizione di specifici organismi viventi a dosi crescenti delle PFAS in diverse matrici.

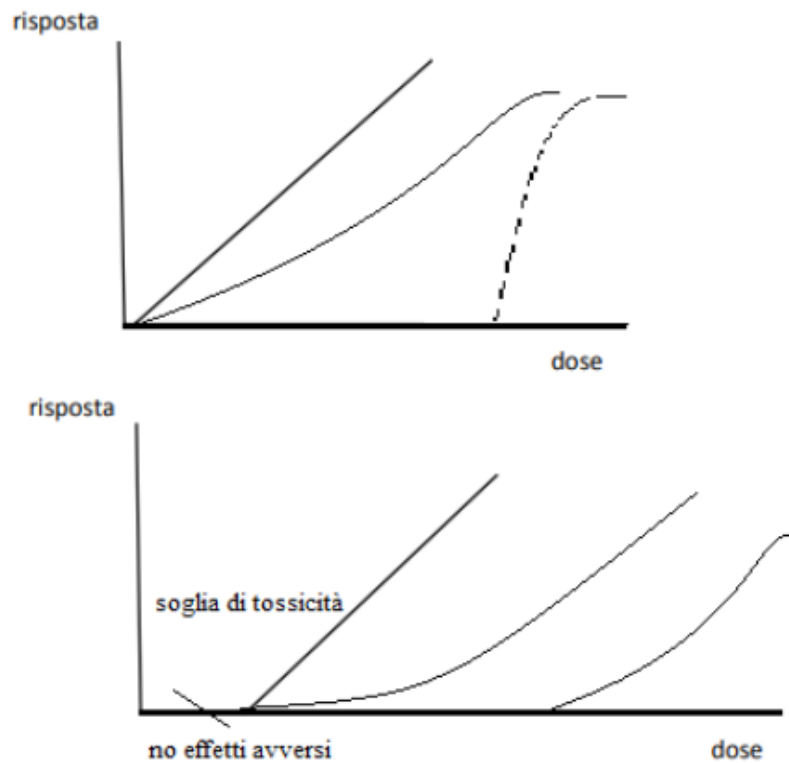


Figura 4: Tipi di curve dose-risposta degli organismi viventi agli inquinanti.

2.3 LE POLITICHE AMBIENTALI NELL'UNIONE EUROPEA

L'elemento normativo di riferimento al momento è il Regolamento UE 741/2020 del Parlamento e del Consiglio dell'Unione Europea (UE) approvato il 25 maggio 2020: *"Prescrizioni minime per il riutilizzo dell'acque reflue urbane in agricoltura"*. Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 5 giugno 2020. Il Regolamento si applicherà a decorrere dal 26 giugno 2023 e prevede la classificazione delle acque per diversi utilizzi secondo parametri chimici, e nel caso specifico delle PFAS; inoltre richiede la ricerca di inquinanti persistenti al loro interno prima di qualunque riutilizzo. Un altro provvedimento importante è la Raccomandazione UE 1431/2022 della Commissione Europea (CE) del 24 agosto 2022 relativa al monitoraggio delle sostanze perfluoroalchiliche negli alimenti, che in Italia ha comportato l'avvio di una campagna di monitoraggio nei prodotti agro-alimentari coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS). A livello europeo, invece le misure di gestione dei rischi legati alla diffusione ambientale delle PFAS hanno riguardato principalmente i danni alla salute umana.

Cronologicamente gli aggiornamenti principali della normativa ambientale europea che riguarda direttamente o indirettamente le PFAS nelle matrici ambientali sono le seguenti:

- nel 2006 la commercializzazione e l'uso dei PFOS sono stati limitati nell'UE, ai sensi della direttiva sulle sostanze pericolose (REACH);
- nel 2009, il PFOS è stato inserito nell'elenco degli inquinanti organici persistenti (POP) destinati all'eliminazione nell'ambito della convenzione di Stoccolma;
- nel 2019 è stato aggiunto il PFOA.

Vaste campagne di monitoraggio condotte in Germania sull'esposizione della popolazione a PFOS e PFOA nel periodo tra il 1982 e il 2019 hanno mostrato che i livelli di queste sostanze nel sangue sono diminuiti rispettivamente del 90% e del 70% a seguito delle restrizioni inserite (Gockener et al., 2020, Schröter-Kermani et al., 2013). Lo stesso studio ha però confermato la presenza di PFOA e PFOS in tutti gli individui analizzati a concentrazioni spesso più alte dei valori limite raccomandati per la protezione della salute. Questo dato conferma che le PFAS hanno un'emivita lunga. La strategia di gestione dei rischi europea prevede di evitare tutti gli usi non essenziali delle PFAS, in linea con il programma "Zero pollution" nell'ambito del Green Deal della UE. La UE ha anche fissato dei limiti per le PFAS ai sensi della direttiva del 2020 sulle acque potabili e nella CE del 24 agosto 2022, relativa al monitoraggio delle sostanze perfluoroalchiliche negli alimenti, ha proposto di includerle negli elenchi degli inquinanti idrici da controllare periodicamente, sia a riguardo delle acque superficiali sia delle acque sotterranee, ai sensi della Water Framework Directive, la Direttiva quadro 2000/60/CE sulla protezione delle acque che impegna gli Stati membri dell'UE a raggiungere un buono stato qualitativo e quantitativo di tutti i corpi idrici. Questa raccomandazione segue la valutazione dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) del 2020 che estende le sostanze da monitorare anche a molte altre sostanze poli e perfluoroalchiliche come ad esempio PFNA (acido perfluorononanoico) e PFHxS (acido perfluoroesanesolfonico).

Il monitoraggio dovrebbe comprendere le seguenti categorie di prodotti: frutta, ortaggi, radici e tuberi amilacei, alghe marine, cereali, ma anche frutta a guscio, funghi selvatici e semi oleosi. Le concentrazioni limite stabilite sono le seguenti: 0.010 µg/kg per PFOS e PFOA, 0.005 µg/kg per PFNA e 0.015 µg/kg per PFHxS, mentre limiti più alti di 1.5 µg/kg per PFOS sono previsti per i funghi selvatici.

Un criterio innovativo adottato di recente dalla Commissione Europea è il cosiddetto “*Segnale chimico*”: consente di valutare in che modo le miscele chimiche influiscono sulla salute umana. Il fondamento scientifico è che l’esposizione combinata di più sostanze chimiche può avere impatti sulla salute, anche se le singole sostanze nelle miscele sono a concentrazioni inferiori rispetto ai limiti fissati dalle attuali normative; questo è dovuto agli effetti additivi e/o sinergici di più sostanze insieme (Kortenkamp, 2008). Dati recenti pubblicati dall’Agenzia Europea per la Protezione dell’Ambiente (EEA) hanno dimostrato che l’esposizione simultanea a diverse sostanze può avere impatti sulla salute e tra le sei sostanze che hanno contribuito ad oltre il 95% del rischio totale, PFOS e PFOA erano sempre presenti (Socianu et al., 2022).

La valutazione dell’impatto delle miscele delle PFAS, anziché di singole molecole delle PFAS è stato uno dei criteri che è stato seguito nelle sperimentazioni sulle piante dal prof. Masi come verrà poi approfondito nel capitolo 3.2 rafforzando il concetto della politica “*Zero pollution*” della UE.

Infine, è opportuno sottolineare che sebbene siano disponibili metodologie per analizzare le miscele, quest’operazione viene fatta di rado e solamente nei settori legislativi che riguardano i rischi per la salute umana discostandosi dai criteri fondanti della strategia sulla sostenibilità economica e ambientale dell’UE che raccomanda l’applicazione di questi criteri a tutte componenti dell’ambiente.

2.4 L’EVOLUZIONE DELLA NORMATIVA NAZIONALE

Il punto di riferimento normativo è vecchio e risale al D.L. 152/2006 del 3 aprile 2006 riguarda l’ambiente dove vi sono presenti delle procedure per la valutazione ambientale strategica (VAS), per la valutazione dell’impatto ambientale (VIA) e per l’autorizzazione integrata ambientale (AIA). In seguito l’iter di colmare questo vuoto legislativo passa attraverso la nota prot. 1520 del 28 marzo 2013 con cui il CNR-IRSA ha trasmesso la relazione sulla «*Valutazione del rischio ambientale e sanitario associato alla contaminazione da sostanze perfluoro-alchiliche (PFAS)*», che ha evidenziato una situazione di contaminazione da sostanze perfluoro-alchiliche nei corpi idrici superficiali e nelle acque potabili della provincia di Vicenza. Si apre uno

spiraglio sulla normativa quadro ambientale italiana in considerazione degli esiti dello studio del CNR-IRSA.

Un ulteriore passo avanti è stato fatto in seguito alla scoperta di vaste aree inquinate da PFAS in diverse regioni d'Italia che ha portato all'emanazione del Decreto Ministeriale (DM) 6 luglio 2016 (recepimento della direttiva 2014/80/UE della Commissione del 20 giugno 2014 che modifica l'allegato II della direttiva 2006/118/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio sulla protezione delle acque sotterranee dall'inquinamento e dal deterioramento (16A05182), pubblicato nella Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.165 del 16-07-2016). Questo DM reca il titolo: "*Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici*". Con esso sono stati fissati i limiti di alcune PFAS per le acque sotterranee, con i seguenti limiti (ng/l) di riferimento: PFPeA (3000), PFHxA (1000), PFBS (3000), PFOA, (500) e PFOS (30).

L'introduzione di valori di Concentrazioni Soglia di Contaminazione (CSC) ha comportato l'avvio di una campagna di monitoraggio della concentrazione delle PFAS nelle acque superficiali e profonde, e nelle acque potabili. È stata consigliata l'adozione di misure di trattamento delle acque potabili per l'abbattimento di queste sostanze, e di prevenzione e controllo della filiera delle acque destinate al consumo idropotabile. In molti comuni nelle aree maggiormente contaminate si è proceduto a scopo cautelativo ad una depurazione supplementare con filtri a carboni attivi delle acque di rete di distribuzione. Ad oggi il trattamento delle acque potabili basato sull'utilizzo di filtri a carboni attivi, avviene soltanto nella Regione del Veneto e, per le acque di scarico, nella Regione Piemonte.

Ancora più recente è un importante provvedimento legislativo che dovrebbe regolare i livelli di concentrazione delle PFAS nell'ambiente: il Disegno di Legge (DDL) atto al Senato n. 2392 "*Misure urgenti per la riduzione dell'inquinamento da sostanze poli e perfluoroalchiliche (PFAS) e per il miglioramento della qualità delle acque destinate al consumo umano*" posto in corso di esame in commissione, relatrice parlamentare Vilma Moronese. Questo provvedimento ha iniziato la discussione al Senato nel giugno 2022 e mira a colmare l'attuale vuoto normativo sulle Concentrazioni Soglia di Contaminazione (CSC) delle PFAS nelle matrici ambientali. Esso mira ad integrare il T.U. (testo unico) ambientale (D.Lgs 152/2006), stabilendo sia limiti di concentrazione di PFAS nelle acque di scarico, sia le CSC protettive della salute umana nelle acque. È fondamentale sottolineare, in relazione al paragrafo precedente, che la normativa di riferimento per l'inquinamento in aree agricole D.M. 46/2019 del Ministero

dell'Ambiente e della tutela del Territorio e del Mare, che integra il D.L. 152/2006, che disciplina gli interventi di messa in sicurezza, bonifica e ripristino ambientale delle aree destinate alla produzione agro-alimentare basandosi proprio sulla valutazione del rischio ambientale e sanitario. Questo potrebbe trovare applicazione anche in alcune aree boschive e forestali inquinate, governate al fine di produrre prodotti alimentari. Perciò il D.M. 46/2019 prende atto dell'importanza di preservare il suolo anche in aree inquinate introducendo l'utilizzo di metodi quali il biorimediao e il fitorimediao, affiancando queste biotecnologie di trattamento a quelli tradizionali di bonifica quali il soil washing, il desorbimento termico e lo scavo e smaltimento in discarica che rimuovevano la matrice contaminata ma a costi elevatissimi e distruggendo il suolo.



Figura 5: Distribuzione delle aree di indagine di PFOA operata dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) per il Sistema Informativo Nazionale per la Tutela delle Acque Italiane (SINTAI).

2.5 IL CASO DELLA CONTAMINAZIONE DA PFAS NEL VENETO

In Italia le principali industrie produttrici di PFAS sono state la Solvay Solexis, situata a Spinetta Marengo (Alessandria) e la Miteni a Trissino (Vicenza). Per quanto concerne le analisi condotte nella pianura veneta, a partire dalla provincia di Vicenza dove aveva sede la MITENI SPA, a quelle limitrofe, hanno riscontrato che le acque, le falde acquifere e il suolo come corpo naturale hanno dei livelli di PFAS in ng/L molto elevati.



Figura 6: Immagine dello stabilimento chimico MITENI di Trissino (Vi), sorgente primaria responsabile dell'inquinamento da PFAS di una vasta area del Veneto.

Questa notizia ha allertato la Regione Veneto che ha introdotto a partire dal 2013 delle limitazioni via via più severe sull'utilizzo di questi inquinanti. Prima 500 ng/L per la somma dei PFAS presenti, poi a 30 ng/L per la somma di PFOS e PFOA e 300 ng/L per la somma di tutti gli altri. La presenza di PFAS nei corpi idrici superficiali e sotterranei e negli scarichi di acque reflue dei territori delle provincie di Vicenza, Padova e Treviso è stata rivelata dal monitoraggio istituzionale di ARPAV sulla qualità delle acque. Si tratta del più grave inquinamento delle acque della storia italiana che coinvolge oltre 350 mila persone, con gravi problemi di carattere sanitario e socio-economico.

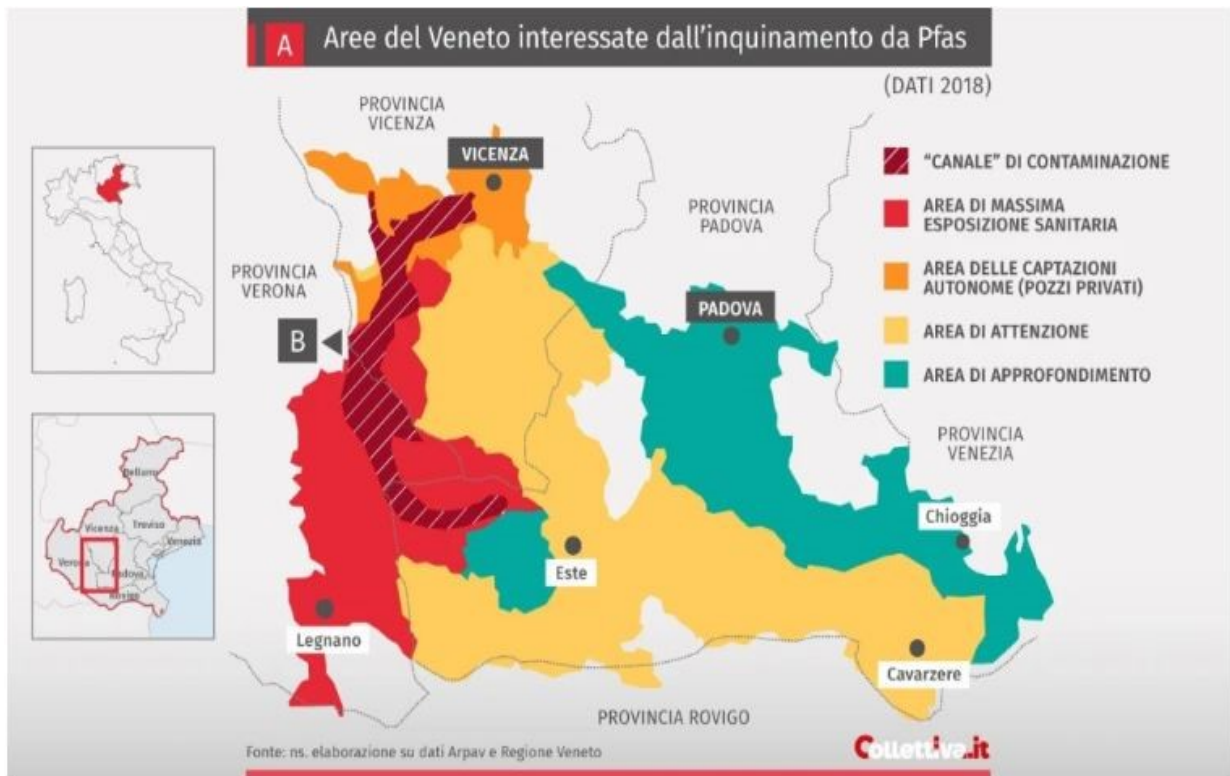


Figura 7: Mappa delle aree del Veneto interessate dall'inquinamento da PFAS (dati 2018).

3. IL SUOLO E LE SUE FUNZIONI

Il suolo è una matrice ambientale complessa frutto dell'alterazione delle rocce sotto l'azione dei fattori pedogenetici che furono sintetizzati da Jenne nella sua equazione della formazione del suolo:

$$S = f(Cl, O, R, P, T)$$

in cui si esplicita che la formazione del suolo è funzione del clima (Cl), dell'attività degli organismi viventi (O), della geomorfologia (R), della roccia madre (P) e del tempo (T). Il suolo è un corpo naturale in continua evoluzione, costituito da fasi solide, liquide e gassose, che svolge dei servizi essenziali alla vita quali lo stoccaggio del carbonio e l'adsorbimento e la biodegradazione degli inquinanti organici, oltre a fungere da base fisica degli ecosistemi terrestri su cui sono ancorate e da cui traggono i nutrienti le fitocenosi. I processi che portano alla formazione del suolo hanno origine con la degradazione della roccia affiorante. I dieci elementi principali che lo compongono sono: O, Si, Fe, Al, Ca, K, Na, Mg, Ti e P; essi rappresentano il 99% della crosta terrestre. I restanti elementi della tavola periodica, sono chiamati elementi in traccia e la loro concentrazione è tipicamente, anche se non sempre, più bassa.

La determinazione di anomalie nelle concentrazioni dei metalli pesanti nel suolo è fondamentale per individuare la presenza di contaminazione. Questa deriva dalle attività umane e porta all'inquinamento del suolo attraverso il deposito di particelle inquinanti emesse dalla combustione di materiali contenenti metalli. La mobilità dei metalli pesanti è un parametro fondamentale per fare un'analisi ambientale e monitorare questi elementi che entrano nell'ecosistema come fonte di inquinamento e bioaccumulo. I fattori che regolano la mobilità di questi elementi sono intrinseci all'elemento stesso; cioè dipendono dalle loro proprietà chimico-fisiche, ma soprattutto dal potenziale ionico, ovvero il rapporto tra la carica e il raggio ionico. Altri fattori di regolazione della mobilità sono i parametri ambientali misurati in pH ed Eh. Il pH definisce l'acidità o alcalinità dell'ambiente, ed è alla base di processi quali, dissoluzione, idrolisi, complessazione organica e/o inorganica, mentre l'Eh ne identifica le condizioni redox.

Il suolo garantisce all'umanità beni e servizi indispensabili per la sopravvivenza degli ecosistemi; quindi va in ogni modo protetto e correttamente gestito (Carta Mondiale del Suolo, FAO, 2015).

Il suolo è una risorsa naturale preziosa sul piano ecologico ed economico, limitata e non rinnovabile. Insieme all'acqua e all'aria è una delle matrici naturali fondamentali per la vita sulla terra.

3.1 L'ACCUMULO DI PFAS NEL SUOLO

Le PFAS rientrano nella categoria ambientale dei *Persistent Organic Pollutants* (POP) che possono muoversi nella soluzione circolante del suolo o essere adsorbiti sulle fasi solide del suolo, grazie a forti interazioni idrofobiche. Tra le PFAS, le tipologie PFCA i PFSA e gli acidi perfluoroottilsulfamidici acetici (FOSAA) hanno mostrato la tendenza ad adsorbire maggiormente nei suoli con alto contenuto di C organico, basso valore di pH e alte concentrazioni di Ca^{2+} (Higgins e Luthy, 2006). Uno studio condotto da Ahrens (2009) ha dimostrato che PFOS, PFOSA, perfluoroundecanoato (PFUnDA), N-etilperfluoroottanesulfonamidoacido (N-EtFOSAA), perfluorononanoato (PFNA) e perfluorododecanoato (PFDoDA) avevano una maggiore concentrazione nei suoli con tessitura franco-sabbiosa quando il contenuto di sostanza organica (OM) era elevato. Questo fenomeno è spiegato dalla tendenza delle PFAS ad adsorbire maggiormente sulle superfici idrofobiche della sostanza organica (Forest e Rayne, 2009). Lo studio di Ahrens ha anche mostrato che con la diminuzione del pH aumentava la concentrazione di PFOS, PFNA e PFDoDA adsorbiti a causa dell'effetto che l'acidificazione ha sulla sostanza organica.

Sebbene in generale maggiore è il contenuto di sostanza organica del suolo, maggiore è l'immobilizzazione delle PFAS al suo interno, questa interazione non è irreversibile e le PFAS possono rilasciate ed accumulate nel corpo dagli organismi decompositori come i lombrichi e gli insetti. Questi possono bioaccumulare PFAS diffondendoli a loro volta nelle catene trofiche di cui fanno parte. Per questo motivo occorre prevedere il destino ambientale e valutare i rischi nell'ecosistema terrestre. In particolare è importante tenere in considerazione l'effetto dei contaminanti organici anche sugli ecosistemi forestali, tema ad oggi poco approfondito. Si tratta di ambienti che, per

molto tempo sono stati considerati, quasi per definizione, incontaminati per la mancanza di attività produttive al loro interno. Purtroppo però, gli studi e le analisi ambientali, anche nella regione Veneto, dimostrano che si tratta di una convinzione errata, dato che gli inquinanti persistenti sono anche altamente mobili. È stato stimato che il PFOS nell'ambiente ha un'emivita di 41 anni ed il PFOA di 8, per cui la loro presenza nell'ambiente continuerà ad essere di grande interesse per la protezione della salute pubblica anche negli anni futuri (D'Hollander et al., 2010). Il primo passo per i ricercatori è conoscere l'entità della contaminazione attraverso le analisi del rischio; successivamente spetta il difficile compito di capire come bloccare il circolo incontrollato delle PFAS negli ecosistemi. Ad oggi l'unica tecnologia che si conosce per trattenere le PFAS è il filtraggio delle acque con centrali a carboni attivi, ma per quanto concerne la bonifica del suolo possiamo muoverci solo nel campo delle ipotesi.

3.2 L'ASSORBIMENTO DI PFAS DA PARTE DELLE PIANTE

Aspetto centrale della mia tesi di laurea è l'assorbimento di PFAS da parte delle piante. Tale assorbimento è legato al loro movimento nella soluzione circolante e negli strati superficiali del suolo, dove gli apparati radicali delle piante li assorbono. I fattori che influiscono sull'assorbimento e la ripartizione di PFAS nelle piante sono:

- la specie vegetale e la sua attività,
- la lunghezza della catena carboniosa e il gruppo funzionale ad essa associato,
- il contenuto di carbonio organico,
- la sostanza organica,
- la capacità di scambio cationico (CEC),
- la temperatura.

Riguardo l'ultimo punto, più elevata è la temperatura maggiore è l'assorbimento e la traslocazione.

Per i motivi legati alla salute pubblica che ho esposto in precedenza, molti studi hanno riguardato, e ancor di più riguarderanno, le piante coltivate orticole ed erbacee in seguito all'entrata in vigore dal 1° gennaio 2023 del regolamento UE 2388 /2022 sulle concentrazioni massime di PFAS nei prodotti alimentari. Al contrario, le conoscenze sull'assorbimento e l'accumulo di PFAS da parte delle piante forestali è ancora poco

studiato. Il gruppo di ricerca di chimica agraria del Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e Ambiente (DAFNAE) dell'Università degli Studi di Padova coordinato dal Prof. Masi ha condotto ricerche sull'assorbimento di PFAS da parte di varie piante agrarie e forestali, che hanno dimostrato diversa capacità di assorbire, traslocare e concentrare a diversi livelli le PFAS. Tra le piante di maggior interesse per gli ambienti forestali studi sono stati condotti su diverse specie di salice. In un esperimento in idroponica è stato valutato il potenziale di giovani talee radicate di tre specie di salice, (*S. eleagnos* L., *S. purpurea* L. e *S. triandra* L.) di accumulare undici PFAS carbossilici e i loro effetti sulla crescita e sulla capacità fotosintetica delle piante in esame. I risultati hanno dimostrato che il tasso di crescita delle piante di salice esposte alle PFAS era influenzata negativamente soltanto per il *S. triandra*. I tassi di assorbimento di CO₂ e della conduttività stomatica erano incrementati mentre la fluorescenza della clorofilla non era alterata dall'esposizione alle PFAS in tutte le specie studiate. Dal punto di vista dell'assorbimento, le molecole maggiormente assorbite dalle tre specie di salice erano quelle a catena corta, che erano anche quelle maggiormente traslocate, mentre le PFAS a catena più lunga erano maggiormente associate alle radici delle piante.

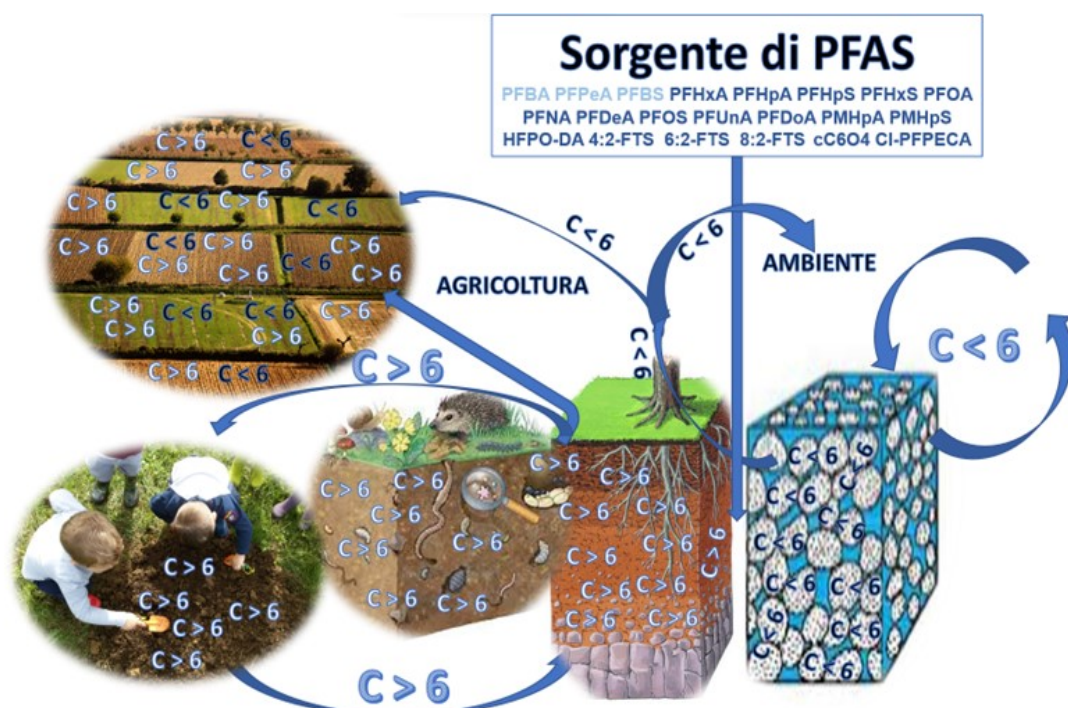


Figura 8: Possibile dinamica nel sistema suolo/acqua/pianta di PFAS aventi catena di diversa lunghezza.

Uno studio successivo condotto sempre dal gruppo di ricerca coordinato dal Prof. Masi ha studiato il potenziale di accumulo in talee di salice (*Salix triandra* L.) radicate in un suolo non contaminato, irrigate con una miscela di undici PFA.

Le talee hanno accumulato concentrazioni di PFAS comprese tra 12 (PFBA e PFPeA), 3 (PFBS, PFHxA, PFHpA PFOA) e 1 (PFOS, PFNA, PFDA) ng g⁻¹, con un elevato tasso di traslocazione a livello fogliare per le molecole con la catena più corta (PFBA e PFPeA), mentre le molecole a catena lunga restavano associate alla radice. Sebbene l'accumulo fogliare di PFAS aveva effetti negativi sul tasso di fotosintesi e conduttanza stomatica, e aumentava la vulnerabilità all'embolia nei vasi xilematici (Battisti et al., 2022), il salice ha anche dimostrato un'elevata tolleranza all'esposizione. Il *Salix triandra* è stata ritenuta una specie con elevato potenziale per la fitodepurazione, grazie alla sua elevata evapotraspirazione. Gli esperimenti si sono concentrati sull'analizzare le concentrazioni in radici, foglie e germogli, poi hanno cercato eventuali correlazioni tra presenza di PFAS ed efficienza fotosintetica ed hanno dimostrato che i PFCA (carbossilati) si sono accumulati più nelle foglie e in misura maggiore rispetto ai PFSA (solfonati). Il gruppo di ricerca che ha realizzato questo studio ha trovato uno scarso panorama di dati simili con cui confrontare i risultati.

Durante la mia ricerca, consultando diversi *database* non ho trovato studi che dimostrassero il comportamento delle PFAS nelle piante arboree forestali. La ricerca in letteratura scientifica da me condotta ha mostrato come essa si è concentrata sulle piante erbacee di uso agroalimentare quali mais, pomodoro, frumento e varie piante orticole, questo per l'impatto diretto che hanno sulla salute umana oltre che per l'importanza economica delle colture. Gli studi condotti sui suoli agrari di aree inquinate da PFAS riportano variazioni nell'accumulo di PFAS nelle piante in base alla specie e al tipo di molecola, oltre che della gestione del suolo. Nelle coltivazioni agricole dove vengono messe a dimora le piante coltivate, il suolo è sottoposto ad interventi tecnici importanti come l'uso di concimi e pesticidi che è stato dimostrato aumentare l'assorbimento delle PFAS da parte delle piante, anche perché tali mezzi tecnici ne contengono essi stessi. Inoltre le piante agricole sono selezionate per avere rapidi accrescimenti e massima produttività e come tali sono caratterizzate da un'elevata vigoria; anche le specie vegetali originate da innesti è stato provato che possono assorbire e traslocare maggiori concentrazioni di PFAS.

Nella valutazione dell'assorbimento da parte delle piante forestali sono assenti input antropici da concimi o pesticidi, inoltre le piante, per quanto possibile, a seconda del tipo di governo, sono originate da seme; queste caratteristiche conferiscono loro più resistenza ai contaminanti ambientali. Preso atto delle differenze tra l'ambiente agricolo e quello forestale, lo studio condotto presso il DAFNAE permette di affermare che, indipendentemente dalle specie vegetali e dal sito esiste una somiglianza nella tendenza ad accumulare queste sostanze dai medesimi organi della pianta.

Ciò che resta davvero ignoto al momento è il meccanismo d'ingresso delle PFAS nelle cellule radicali, infatti per le loro caratteristiche chimico-fisiche non sono noti meccanismi di membrana che possano efficacemente assorbire tali molecole. Per questo motivo, il gruppo di ricerca coordinato dal Prof. Masi ha condotto studi di proteomica per chiarire la risposta fisiologica delle radici di piante di mais esposte a 11 PFAS (Figura 9). Le piante hanno mostrato una diminuzione significativa del tasso di crescita, del peso fresco delle foglie e delle radici e l'alterazione dei parametri fotosintetici nelle piante trattate con PFAS. Nelle foglie è stata rilevata una concentrazione più elevata di PFAS con $C < 8$, mentre PFAS con catena $C \geq 8$ era associata alle radici (Ebinezzer et al., 2022).

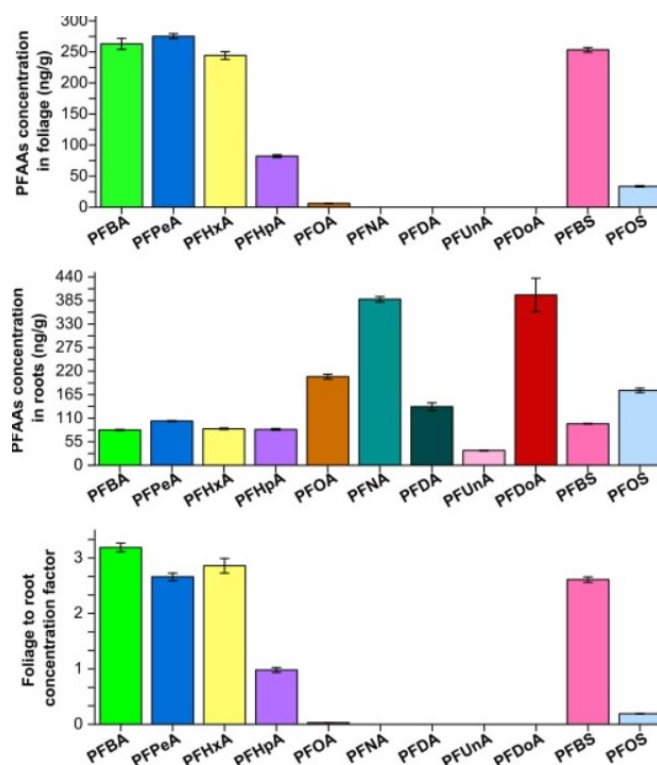


Figura 9: concentrazioni di PFAS in radici e foglie di *S. triandra* e fattore di traslocazione foglie/radici riportato da Ebinezzer et al. (2022).

L'analisi proteomica delle piante condotta nello stesso studio ha evidenziato l'alterazione nell'espressione di 75 proteine, principalmente coinvolte in processi metabolici e biosintetici di traduzione e riorganizzazione citoscheletrica. L'analisi trascrittomica mediante *real time* PCR ha confermato l'alterazione dell'espressione proteica. I risultati sono stati ulteriormente suffragati dall'analisi degli amminoacidi e degli acidi grassi, fornendo così un primo riscontro dello stato metabolico alterato delle piante esposte sotto il profilo proteomico, lasciando ipotizzare che alcuni trasportatori cellulari di aminoacidi potrebbero essere responsabili dell'assorbimento delle PFAS a catena corta. Questi risultati preliminari dovranno essere confermati da futuri studi, e a mio avviso sarebbe auspicabile che simili studi fossero svolti anche sulle piante forestali delle aree maggiormente contaminate del Veneto. Un grande limite alla realizzazione di studi con tecniche di trascrittomica e proteomica sulle piante forestali è l'attuale scarsa annotazione dei genomi e dei proteomi nei database bioinformatici, condizione essenziale per l'individuazione della specifica risposta genica all'esposizione dei contaminanti.

L'assorbimento delle PFAS da parte delle piante può essere descritto tramite l'utilizzo di due fattori:

- il fattore di bioaccumulo (BAF), che consiste nel rapporto tra la PFAS nelle piante e la PFAS nel suolo;
- il fattore di traslocazione (TF) che invece consiste nel rapporto tra la PFAS nei germogli e la PFAS nelle radici (Evangelou e Robinson, 2022).

L'assorbimento delle PFAS dipende molto dalla lunghezza della catena; quelle a catena corta mostrano un maggiore TF e quindi una maggiore trasferibilità dalle radici alle porzioni apicali della pianta, mentre le PFAS a catena lunga difficilmente vengono trasportate verso le parti aeree, ma tendono ad essere bloccate dalla banda del Caspary, accumulandosi nelle radici. Anche la traspirazione è molto importante, vi è infatti una correlazione diretta tra la velocità di traspirazione e l'assorbimento. Inoltre le PFAS per essere assorbite e trasportate dalle piante devono poter oltrepassare delle barriere selettive di membrana, avranno un maggiore BAF per i compartimenti vegetativi rispetto agli organi riproduttivi o di riserva. Un altro fattore importante per l'assorbimento è la composizione delle piante, specialmente per quanto riguarda il contenuto in proteine.

Gli studi sulle piante di salice allevate in idroponica e in serra (Sharma et al., 2020; Ebinezer et al., 2022) hanno mostrato che il fattore di traslocazione foglie-radice è

elevato soprattutto per le PFAA con a catena corta ($C \leq 7$) che appaiono attivamente traslocati nelle foglie (Figura10), con valori medi di rimozione di PFAS a livello di intera pianta dell'ordine del 10% sul totale.

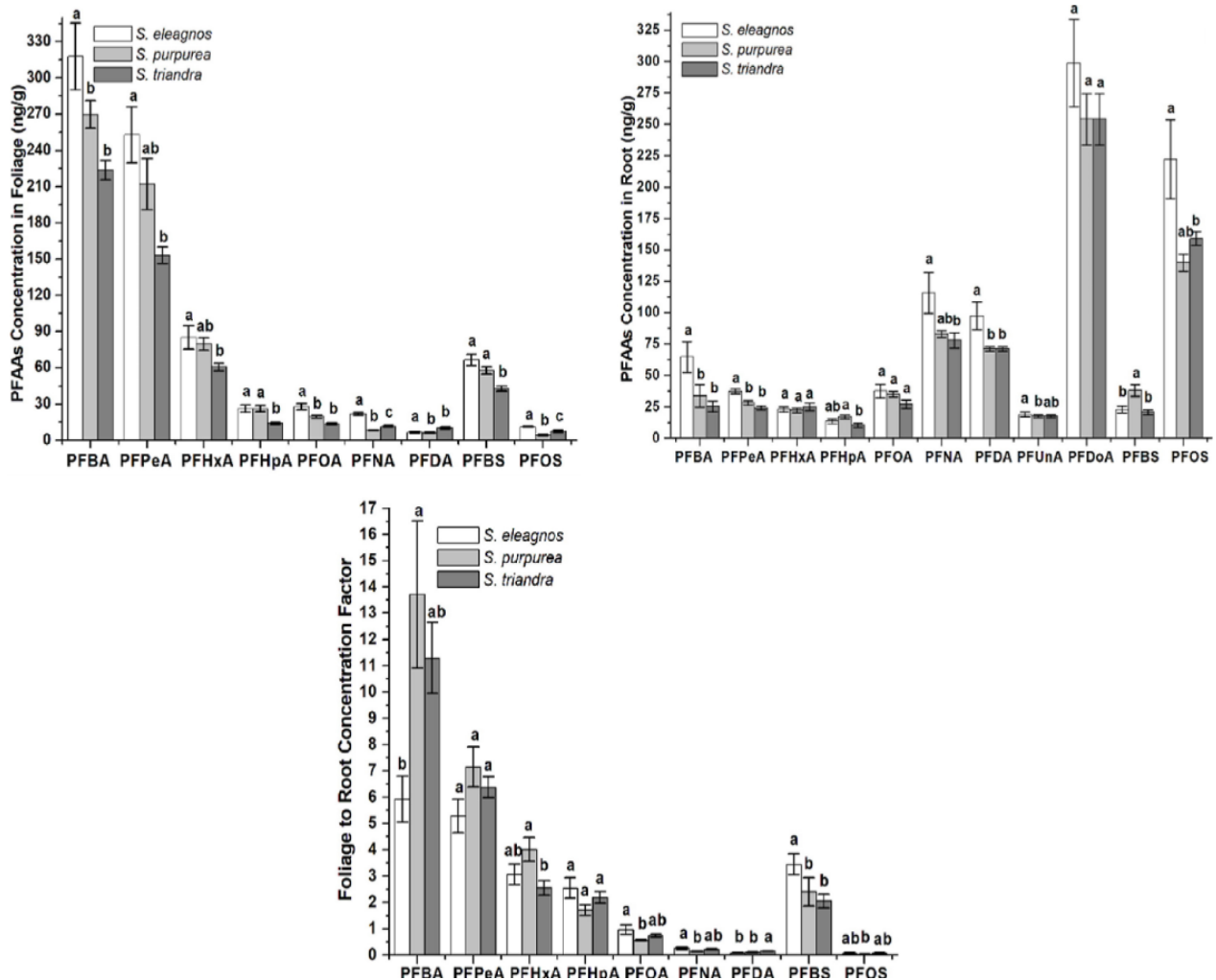


Figura 10: concentrazioni di PFAS in radici e foglie di *S. triandra* e fattore di traslocazione foglie/radici riportato da Sharma et al. (2020).

Sebbene ottenuti in condizioni controllate, questi valori indicano un potenziale del salice per interventi di fitoremedeo di suoli e acque da PFAS, ma anche un potenziale di bioaccumulo nelle piante forestali che crescono in ambienti inquinati.

3.3 IL BIOACCUMULO E LA BIOMAGNIFICAZIONE

Il termine "bioaccumulo" indica il processo per cui una sostanza chimica viene accumulata nei tessuti di un organismo attraverso tutte le possibili vie di assorbimento ed è quantificato dal fattore di bioaccumulo (BAF), definito come il rapporto tra la concentrazione della sostanza chimica nell'organismo e la concentrazione nell'ambiente esterno. Il bioaccumulo delle sostanze inquinanti può avvenire direttamente dall'ambiente in cui l'organismo vive, attraverso le superfici respiratorie o attraverso l'ingestione di altri organismi viventi lungo le catene alimentari, o anche in entrambi i modi: nel primo caso il fenomeno viene definito "bioconcentrazione", nel secondo caso "biomagnificazione".

Il fattore di bioconcentrazione (BCF), utilizzato inizialmente per gli organismi acquatici con riferimento all'assorbimento dell'inquinante dall'acqua, è oggi utilizzato anche per le piante in rapporto alla concentrazione nel suolo.

Il fattore di biomagnificazione (BMF) è definito come il rapporto tra la concentrazione di una sostanza nel predatore e la concentrazione presente nella sua preda. La "biomagnificazione", è un fenomeno che comporta l'accumulo di molecole, sia visibili che invisibili, lungo una catena alimentare. La concentrazione di sostanze nocive vicino all'apice della catena aumenta all'aumentare della lunghezza della catena trofica. Quando una sostanza vi entra, a partire da un produttore primario o da un consumatore, solitamente si accumula in esso con una bassa concentrazione. La concentrazione di molecole nocive aumenta ad ogni passaggio, durante l'interazione degli individui.

Fattore fondamentale per BCF e BMF è la persistenza di una sostanza, che si esprime in termini di emivita (half-life) e riflette:

- la potenzialità di un'esposizione a lungo termine degli organismi alla sostanza,
- la potenzialità di una sostanza di raggiungere l'ambiente marino.

Nel caso specifico di specie acquatiche si esprime come il rapporto tra le concentrazioni della sostanza negli organismi viventi secondo la formula:

$$Co/Cw$$

in cui Co è la concentrazione (mg/kg di peso fresco) nel corpo e Cw è la concentrazione nell'acqua (mg/L) all'equilibrio. Naturalmente tale fattore varia, oltre che da sostanza a sostanza, anche da specie a specie. Bisogna sottolineare che

elevati livelli di bioaccumulo sono responsabili del fenomeno di "amplificazione", che porta quantità e concentrazioni nei comparti ambientali dai livelli in traccia a livelli preoccupanti.

Gli studi che più avvalorano il processo di biomagnificazione delle PFAS sono quelli condotti sugli organismi acquatici. Questa scelta è da imputarsi alla concentrazione degli studi scientifici sulla trasmissione di PFAS nelle acque, perché sono le prime in cui sono stati trovati i contaminanti e anche sono la fonte più diretta di trasmissione per uomo e animali.

Le PFAS sono estremamente persistenti nell'ambiente e sono state rilevate nelle matrici ambientali, nelle piante e negli animali (Lee et al., 2010; Peng et al., 2014) e accumulandosi in atmosfera, acque e suolo li rendono sorgenti secondarie (Ahrens e Bundschuh, 2014). Sebbene i fenomeni di biomagnificazione di varie PFAS siano stati documentati negli ecosistemi terrestri (Müller et al., 2011), si presume che la biomagnificazione sia più elevata in ambiente acquatico che nelle reti trofiche terrestri. La letteratura riporta ampie differenze di emivita delle PFAS nell'uomo e negli animali, ad esempio da 4 anni nell'uomo a pochi giorni o ore nei roditori, mentre non sono disponibili informazioni per gli animali da allevamento. Rispetto agli esseri umani, la distribuzione di questi composti nell'ambiente e nell'interfaccia piante/suolo (la rizosfera) si conosce meno. Stahl et al. (2009) e Felizeter et al. (2012) hanno riportato che le PFAS sono assorbite dalle radici delle piante anche se non è attualmente possibile discriminare l'adsorbimento all'esterno della radice dall'effettivo assorbimento, in particolare per quelle con le catene carboniose più lunghe. L'adsorbimento da parte delle fasi solide inorganiche del suolo quali argille, ossidi e idrossidi di Fe e Mn aumentano con la lunghezza della catena (Higgins e Luthy, 2006), quindi la mobilità ambientale delle PFAS a lunga catena è principalmente controllata dal loro rilascio nella soluzione circolante del terreno.

Nell'uomo (Olsen et al., 2007) e in altri mammiferi (Houde et al., 2006, 2011) è stato documentato anche il bioaccumulo di PFAS. La presenza a vari livelli trofici di 17 sostanze poli- e perfluoroalchil (PFAS), compresi i perfluoroalchil- addotti (PFAA) e di alcuni dei loro precursori come i perfluoroalcan-sulfonammidi, 6:2 fluorotelomeri solfonati (6:2 VISA), è stata studiata in catene trofiche di corpi idrici superficiali di varie aree d'Europa. Questi studi hanno rivelato che i pesci presenti nei fiumi francesi presentavano concentrazioni più alte degli invertebrati, mentre i pesci del fiume Reno (Germania) presentavano concentrazioni elevate di acido perfluoroundecanoico, acido

perfluorotridecanoico e perfluorodecan sulfonato (PFDS), attribuite alla presenza di sorgenti industriali (Simmonet-Laprade et al.; Mourier et al., 2019).

4. I PRINCIPI E LE TECNICHE DI BIOMONITORAGGIO

4.1 GLI APOIDEI E IL LORO RUOLO

Gli Apoidei (Apoidea Latreille, 1802) sono una superfamiglia di imenotteri che raggruppa circa 30.000 specie, la più nota delle quali è l'ape da miele (*Apis mellifera*).

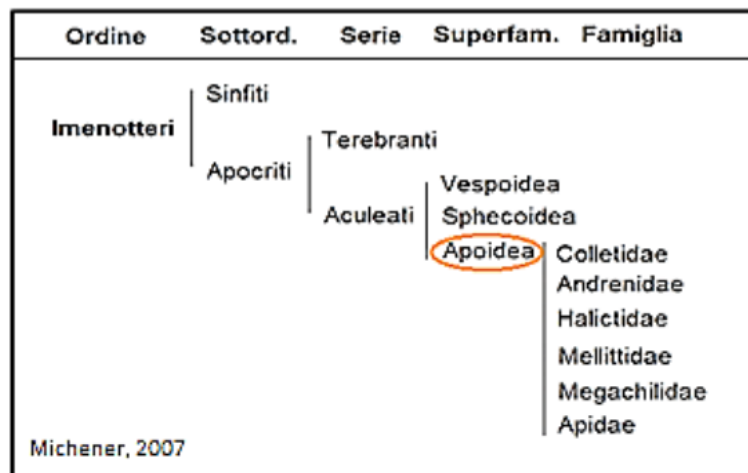


Figura 11: Sistematica della superfamiglia degli Apoidei.

Più del 40% delle specie di invertebrati, in particolare api e farfalle, garantiscono l'impollinazione e tra di essi, le api domestiche e selvatiche sono responsabili di circa il 70% di quella complessiva delle piante. Attualmente, l'antropizzazione e l'inquinamento ambientale in Europa pongono sotto minaccia di estinzione circa il 10% delle specie di api europee (IUCN, 2015). L'estinzione di questi insetti, visto il loro indispensabile ruolo nel mantenere vivi gli equilibri essenziali di cui tutta la natura e tutti gli esseri viventi necessitano, porterebbe all'estinzione di molte specie di piante, pregiudicando la produzione alimentare. Infatti, i processi di impollinazione entomofila garantiscono circa il 35% della produzione globale di cibo e hanno contribuito in misura significativa all'incremento della produzione agricola degli ultimi decenni. Inoltre hanno incrementato il valore economico mondiale del settore agro-alimentare, ad oggi stimato in 260 miliardi di euro/anno (Lautenbach, 2012).

Globalmente, oltre il 90% delle piante coltivate sono visitate dagli Apoidei e il 70% delle colture agrarie di rilevanza mondiale beneficiano dell'impollinazione animale (Klein et

al., 2007). Delle oltre 20.000 specie di apoidei conosciute soltanto alcune come l'ape occidentale (*Apis mellifera*), l'ape orientale del miele (*Apis cerana*), alcuni calabroni e poche specie di api solitarie sono state addomesticate, le altre sono selvatiche.



Figura 12: Ape bottinatrice selvatica mentre preleva nettare da lavanda.

Le specie selvatiche svolgono in natura un ruolo vitale come impollinatori fornendo un servizio di regolazione dell'ecosistema; è stato stimato che circa il 90% delle piante selvatiche dipendono dall'impollinazione animale per la riproduzione sessuale (IPBES, 2017). Nello scenario peggiore, l'unica possibilità per gli agro-ecosistemi di salvaguardia i livelli attuali di produttività potrebbe essere l'impollinazione artificiale, ma a costi elevatissimi.

Se la protezione degli insetti impollinatori, in particolare degli apoidei è di fondamentale importanza per l'impollinazione in agricoltura, occorre ricordare anche che le api forniscono prodotti alimentari quali miele, pappa reale, cera e propoli, di elevato valore economico. Proprio il declino delle specie selvatiche ha fatto crescere l'importanza dell'ape mellifera per alcune colture. La *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2014) organo dell'Organizzazione delle Nazioni Unite ha dichiarato il rischio della riduzione degli insetti impollinatori come un problema mondiale, aggiungendo che il valore economico del servizio di impollinazione offerto dalle api è stimabile dieci volte superiore rispetto al valore del miele prodotto (Aizen et al., 2009).

L'inquinamento ambientale inoltre è tra le cause principali del declino delle api, esso si accumula nel loro corpo e di conseguenza nei prodotti dell'alveare. L'elevata

capacità di esplorazione del territorio e la capacità di accumulo delle sostanze presenti nell'ambiente rende le api particolarmente adatte come bioindicatori della qualità dell'ambiente, in particolare di quello agrario.

In Italia si sono registrate perdite significative di popolazioni d'api nell'ordine di 10^2 - 10^3 volte maggiori rispetto alla media europea (EFSA, 2008). Questa moria è dovuta ad un insieme di cause:

- l'effetto additivo e sinergico dei cambiamenti climatici;
- il cambio di uso del suolo e le tecniche agronomiche impattanti;
- la riduzione di fonti alimentari e di aree di foraggiamento per le api;
- l'uso di prodotti fitosanitari;
- la maggiore vulnerabilità a protozoi, virus, batteri e funghi patogeni e parassiti;
- infine con un impatto molto significativo, come sottolineato precedentemente, l'inquinamento.

4.2 LE API: BIOINDICATORI AMBIENTALI

La popolazione apoidea reca importanti servizi ecosistemici per la conservazione e la biodiversità vegetale e importanti prodotti per l'industria alimentare. I prodotti apistici, il polline e l'analisi del corpo stesso delle api consentono di ottenere indicazioni sullo stato ambientale e sulla contaminazione chimica in esso presente (Girotti et al., 2013). Le analisi chimiche di laboratorio consentono di rilevare su api, polline e prodotti delle api le sostanze attive presenti in alcuni prodotti fitosanitari utilizzati nelle aree su cui le stesse effettuano i voli e bottinano (Porrini et al., 2003; Rişcu e Bura, 2013).

L'utilizzo delle api per il biomonitoraggio è legato all'attività delle api bottinatrici che compiono in media una decina di uscite al giorno dall'alveare, ogni ape perlustra un'area di circa 7 km² per prelevare nettare, polline, melata e acqua necessarie alla colonia. Le api indicano la qualità dell'ambiente principalmente attraverso due parametri: la mortalità e l'accumulo nel corpo o nei prodotti dell'alveare. La mortalità è tipicamente associata alla presenza di sostanze tossiche ad azione specifica come ad esempio gli insetticidi, mentre l'accumulo è stato osservato per sostanze poco tossiche o non metabolizzabili come i metalli pesanti.

L'etologia ben caratterizzata, e le caratteristiche morfologiche fanno dell'ape un indicatore ecologico particolarmente adatto a reagire, intercettare ed accumulare le sostanze quando entra in contatto con l'atmosfera, il suolo, l'acqua e le piante. Ad esempio, gli effetti di mortalità correlati all'utilizzo di agrofarmaci quali gli antiparassitari vegetali trasportati dal vento rappresentano casi ben documentati di effetti diretti, mentre nel caso di agrofarmaci non letali, come prodotti fitoiatrici a base di nicotinoidi, le api presentano comportamenti anomali, quali disorientamento.

L'Istituto Superiore per la Ricerca Ambientale (ISPRA, 2011) ha dimostrato la correlazione tra la mortalità delle api in aree naturali e la diffusione di fitofarmaci, e simili. Nei casi di contaminazione da metalli pesanti o metalloidi, gli elementi potenzialmente tossici vengono captati dal corpo dalle api o assorbiti suggendo il nettare dei fiori o l'acqua, e si ritrovano nei prodotti dell'alveare. Casi estremi di accumulo di questi inquinanti sono riscontrabili in ambiente urbano o in aree soggette a contaminazione da radioisotopi. Proprio quest'ultima caratteristica chiarisce come le api possano essere bioindicatori molto sensibili, infatti sebbene la concentrazione totale di radionuclidi sia di solito molto bassa anche in aree contaminate, le api le evidenziano.

4.3 L'EVOLUZIONE DEL BIOMONITORAGGIO

Fin dal secolo scorso gli apoidei rivestono un'importanza strategica nella valutazione della qualità dell'ambiente e dello stato degli ecosistemi naturali. Il tempo che uno sciame di 10.000 -15.000 api raccogliatrici trascorre esplorando i 700 ettari che circondano l'alveare per foraggiarsi, dipende dalla stagione e dalle condizioni climatiche. Le api sono considerate "super-generaliste", cioè si nutrono di un'ampia varietà di specie di piante da fiore, e grazie a questo grande lavoro di raccolta effettuano indirettamente un campionamento estremamente approfondito del loro habitat. Gli organismi bioindicatori sono quelli che subiscono variazioni evidenti nella fisiologia, nella morfologia o nella distribuzione spaziale, caratteri correlabili a sostanze inquinanti presenti in quel determinato ambiente. Rispetto alla sola valutazione dei livelli della presenza di sostanze tossiche, il biomonitoraggio ha il vantaggio di fornire stime degli effetti sugli esseri viventi. Un gruppo di ricercatori che si occupano di

biomonitoraggio hanno fondato *BeeOdiversity*, un'azienda che nasce con l'obiettivo di tutelare la biodiversità e per questo compie innanzitutto analisi ambientali.

Uno dei programmi da loro sviluppati riguarda proprio il monitoraggio delle api e l'analisi del polline, per comprendere quali e in che percentuali vi siano presenti inquinanti nelle aree di interesse. Per farlo prelevano dagli alveari una porzione del polline raccolto senza danneggiare l'alveare. Il progetto porta il nome di "*BeeOmonitoring*" e si tratta del lavoro congiunto dell'intelligenza delle api e di un software di interpretazione dei dati. Le api svolgono la funzione di droni naturali raccogliendo campioni su una vasta area a basso costo mentre lo strumento scientifico consente di misurare l'inquinamento creato dall'industria e dall'agricoltura e di compilare un'analisi situazionale della salute dell'ecosistema. *BeeOmonitoring* attualmente è l'unico strumento che consente la raccolta di dati qualitativi e quantitativi, esso diventa indispensabile per avere un quadro della situazione e scegliere come intervenire. Alcuni esempi di inquinanti monitorati sono: metalli pesanti, pesticidi, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), nitrati, diossine, furani, PCB, bifenili perfluorurati (PFAS), ecc.

I progetti di *BeeOdiversity* sono arrivati a coprire 16 paesi, ma non è l'unica realtà che compie questo servizio. Negli ultimi anni con l'avvento di software sempre più sofisticati si è potuto associare il tradizionale biomonitoraggio a tecnologie nuove e arrivare a realizzare mappe ambientali complete e vaste; per esempio inserendo i dati raccolti in QGIS (applicazione open source che permette di visualizzare, analizzare e rappresentare dati spaziali; attualmente è il più diffuso al mondo) si possono creare mappe (Figura 14) indicanti le piante inquinate da POP in una certa area.

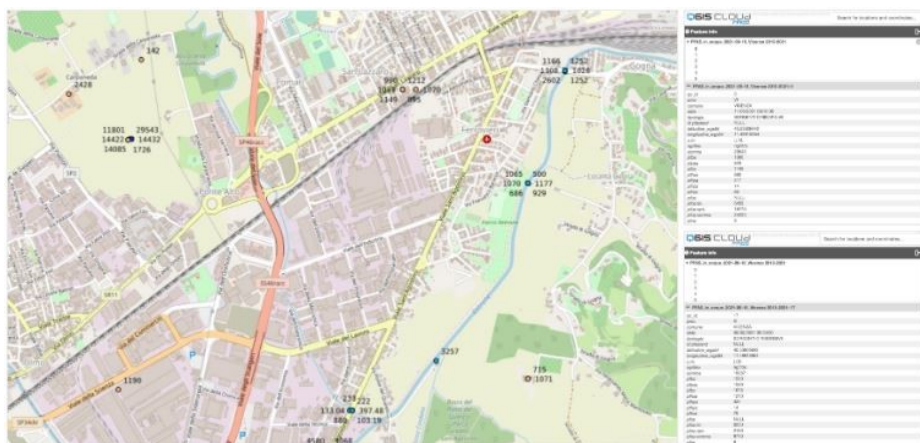


Figura 13: Esempio di progetto QGIS con dati ARPAV del 2021 sulla contaminazione da PFAS nella zona di Vicenza.

5. DALL'ASSORBIMENTO DELLE PFAS NELLE PIANTE ALL'IMPATTO SULLE POPOLAZIONI DI APOIDEI

5.1 L'EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE A PFOS SULLE API

Viviamo in una situazione ambientale dove vi è la crescente preoccupazione a riguardo la presenza negli alimenti e nei mangimi di contaminanti persistenti alogenati di interesse prioritario come le PFAS. Le raccomandazioni future della CE invitano gli Stati membri, in collaborazione con gli operatori del settore alimentare, a monitorarne la presenza. Gli strumenti per un costante monitoraggio esistono ma vengono utilizzati di rado e solamente in aree dove sono già dichiarate alte le contaminazioni, come il caso emerso nella pianura veneta.

Per ricercare i livelli soglia di esposizione è necessario estendere le operazioni di biomonitoraggio e le analisi dose-risposta agli organismi presenti in tutti gli ambienti naturali e non solo in quelli dell'ambiente agro-alimentare. A conferma di questa manchevolezza si fa presente la scarsità di dati di laboratorio, e quei pochi che ci sono riguardano l'ambiente agrario con la finalità di attuare misure di protezione della salute umana e delle specie chiave nella produttività degli agro-ecosistemi.

La mia tesi di laurea è incentrata sullo stato delle conoscenze relative l'assorbimento delle PFAS da parte delle piante e il loro potenziale trasferimento alla parte epigea, e il conseguente passaggio di queste sostanze ad altri membri della catena trofica. La comunità più esposta è quella delle api da cui dipendono, sia una larga proporzione dell'impollinazione entomofila, sia le produzioni di miele che potrebbero essere contaminate, costituendo così una aggiuntiva sorgente per l'uomo.

Nella preparazione dell'elaborato ho usufruito sia di dati presenti in pubblicazioni scientifiche, reperite dalle banche dati digitali, sia delle informazioni derivanti da sperimentazioni svolte congiuntamente da gruppi di ricerca di chimica agraria e di orticoltura del DAFNAE. L'elemento principalmente valutato è stato l'interazione tra il carico delle PFAS bio-accumulate da alcune piante e il grado della risposta avversa alla quantità di sostanza inquinante assunto dall'*Apis Mellifera*.

Il perfluorottano sulfonato (PFOS) è un contaminante altamente persistente nell'ambiente esso si accumula e si magnifica nelle catene alimentari provocando

effetti dannosi sulla salute degli organismi che vi fanno parte. L'uso diffuso e lo smaltimento inappropriato in molteplici siti collocati per tutto il globo hanno causato l'inquinamento del suolo e dell'acqua. Una volta a conoscenza della problematica è importante il monitoraggio dei livelli di queste sostanze al loro interno. Nel caso del controllo delle acque potabili è stato stipulato un piano che preveda delle stazioni fisse di monitoraggio con eventuale installazione di filtri a carboni attivi in caso di valori elevati. Per quanto riguarda gli ambienti naturali non gestiti gli studiosi hanno ipotizzato che la via di monitoraggio più realista, ovvero che meglio tenga in considerazione tutti i fattori ambientali, sia lo studio delle colonie d'api. Questa metodologia è già nota tra gli scienziati perché in passato per altre sostanze inquinanti era già stata. Emblematici furono gli studi condotti sull'inquinamento da piombo, diventato un grosso problema agli inizi del '900, con la produzione massiccia di benzina al piombo usata per le automobili.

Valutazione dei dati della letteratura scientifica

Per la ricerca bibliografica ho utilizzato la banca dati SCOPUS e ho inserito le parole chiave 'PFAS' and 'Bee', ciò ha prodotto un solo articolo relativo alla tematica dell'impatto dei PFAS sulle api da miele, confermando quanto questa tematica sia ancora molto poco studiata. Diversamente utilizzando le parole chiave 'PFAS' and 'Soil', 'PFAS' and 'Environment' oppure 'PFAS' and 'Plant' ha prodotto un gran numero di risultati, principalmente sulla presenza di questi inquinanti in acque, suolo e piante, con un numero crescente di pubblicazioni scientifiche riguardanti piante agroalimentari e suoli agricoli. Altrettanti studi sono stati condotti sulla tossicità delle PFAS per l'uomo e le patologie umane ad esse associate. In generale, la ricerca bibliografica ha confermato la rarità degli studi dell'impatto delle PFAS negli ambienti forestali.

Discussione dell'articolo "*Biological and behavioral responses of European honey bee (*Apis mellifera*) colonies to perfluorooctane sulfonate exposure*"

Lo studio di *Sonter, Rader, Stevenson, Stavert e Wilson* all'interno della valutazione del rischio ecologico delle PFAS si è interrogato sulle risposte biologiche e comportamentali all'esposizione della PFOS sulle colonie di *Apis mellifera*. Circa 1000 api sono state esposte per 4 settimane a concentrazioni tra 0 e 1.6 mg/L di PFOS,

fornitogli tramite sciroppo di zucchero in soluzione al 55%. I ricercatori hanno poi monitorato le feci, il miele e il tessuto delle api alle varie concentrazioni d'inquinante dalla più bassa di 0.02 mg/L alla più alta di 1.6 mg/L.

Gli studi sulle colonie, piuttosto che sui singoli individui, sono stati fondamentali per comprendere appieno l'impatto all'esposizione su questi insetti dal comportamento fortemente sociale. Le api infatti sono insetti operosissimi, vivono in colonie o in famiglie ed ognuna svolge la sua attività, sulla base di compiti ben definiti in relazione alla casta di appartenenza. Queste loro capacità sociali fanno sì che non sia affatto un'esagerazione considerare la colonia come un superorganismo. Le api forniscono servizi di impollinazione agli ecosistemi sia gestiti che selvatici, questo processo è indispensabile per la riproduzione delle piante ed è alla base della sopravvivenza stessa di molte specie sulla Terra, uomo compreso. Le popolazioni di api sono minacciate a livello globale da molteplici fattori di stress tra cui il cambiamento e l'intensificazione dell'uso del suolo, i parassiti, le malattie e l'esposizione ai contaminanti ambientali.

Focalizzandoci sull'ultimo punto vi sono diverse vie tramite cui le api possono entrare in contatto con sostanze perfluoroalchiliche la prima certamente sono i pesticidi. Le prove dell'impatto negativo dei pesticidi sulla salute delle api sono in aumento, in particolare per i pesticidi neonicotinoidi. Un'altra via di esposizione potrebbe essere il polline durante il foraggiamento da piante contaminate. Questa, sebbene molto valida, resta un'ipotesi perché la traslocazione dei PFAS all'interno delle piante dalle radici, alle foglie fino agli apparati riproduttivi del fiore non è stata ancora confermata. Un altro motivo per cui il polline risulta contaminato è dal deposito di aerosol o gocce di pioggia inquinate su di esso. In fine, una via probabile è l'assunzione da parte delle api di acqua da corpi idrici contaminati. Dall'esperimento svolto da *Sonter* e collaboratori sono state analizzate settimanalmente le risposte biologiche della colonia dopo l'esposizione a PFOS. Queste includevano:

- lo sviluppo della covata ossia, presenza di uova, larve, pupe e giovani adulti;
- la temperatura dell'alveare;
- la mortalità delle operaie e la morte della regina;
- la salute gastrica ovvero la presenza o assenza di dissenteria;
- il peso delle api.

Le risposte comportamentali registrate due volte a settimana includevano:

- la risposta della colonia alla mortalità della regina, cioè, rimanere nell'alveare e allevare una regina sostitutiva, o andarsene;
- l'attività, cioè il numero di api all'esterno delle cassette dell'alveare;
- il temperamento (da 1 a 5);
- la manutenzione dell'alveare (da 1 a 5);
- la gestione dei parassiti.

Risultati

Fin dalle dosi più basse si è registrato un trend negativo nell'attività, nel temperamento e nel mantenimento dell'alveare. Aumentata l'esposizione a 0.8mg/L e si è visto un significativo aumento della mortalità.

Per quanto riguarda i parametri biologici le temperature sono diminuite fin da subito e sono scese progressivamente fino al minimo di 26.4°C (rispetto ai 29.3°C iniziali) alla concentrazione di 1.6 mg/L.

Per quanto riguarda la deposizione delle uova non è mai cessata, ma nei gruppi sottoposti a PFOS si è riscontrato un calo di larve alle concentrazioni 0.02 e 0.08 mg/L in particolare a 0.08 le pupe sono morte. La mortalità delle operaie è aumentata significativamente sopra lo 0.8 mg/L, mentre per la regina ci sono stati dati interessanti nel gruppo al 0.03 mg/L. In generale la popolazione ha subito le perdite percentuali maggiori per concentrazioni maggiori e uguali a 0.2mg/L.

I risultati delle metriche comportamentali hanno riportato che nel periodo di controllo e adattamento non ci sono state colonie in fuga ma si sono stabilite nelle gabbie e in un primo momento consumavano tutti le fonti di nutrimento messe loro a disposizione.

Invece una volta dato loro lo sciroppo contaminato alle varie concentrazioni è diminuito il consumo di risorse, fino ad arrivare alla 4° settimana dove lo sciroppo restava intatto.

Le colonie del gruppo di trattamento con PFOS hanno risposto alla morte della regina con l'unione tra colonie e in alcune occasioni con la fuga dall'alveare.

L'attività delle api è stata alta nei due orari di verifica e per tutti i gruppi. Mentre era significativamente bassa nell'esposizione a PFOS 1.6 mg/L.

Il temperamento è risultato molto agitato nei gruppi da 0.02 a 0.3 mg/L mentre molto calmo da 0.8 a 1.6 mg/L. Il mantenimento dell'alveare si è deteriorato per tutti i gruppi

e sono stati osservati dei parassiti rispettivamente con 0.08 0.8 e 1.6 mg/L.

Infine le varie analisi su tessuti, feci e miele hanno rilevato PFOS in tutti i campioni a tutte le esposizioni, non è stato invece rilevato in nessuno dei campioni raccolti dalla colonia di controllo, ciò conferma l'assenza di contaminazione incrociata tra le gabbie, né contaminazione da acqua né da sostanze alimentari.

È stato calcolato Il fattore di bioaccumulo (BAF) dividendo la concentrazione media di PFOS nei campioni di tessuto delle api per la concentrazione di esposizione a PFOS in quel gruppo di trattamento. Nei tessuti, nelle feci e nel miele è risultato un BAF pari a 0.3, un valore decisamente non trascurabile.

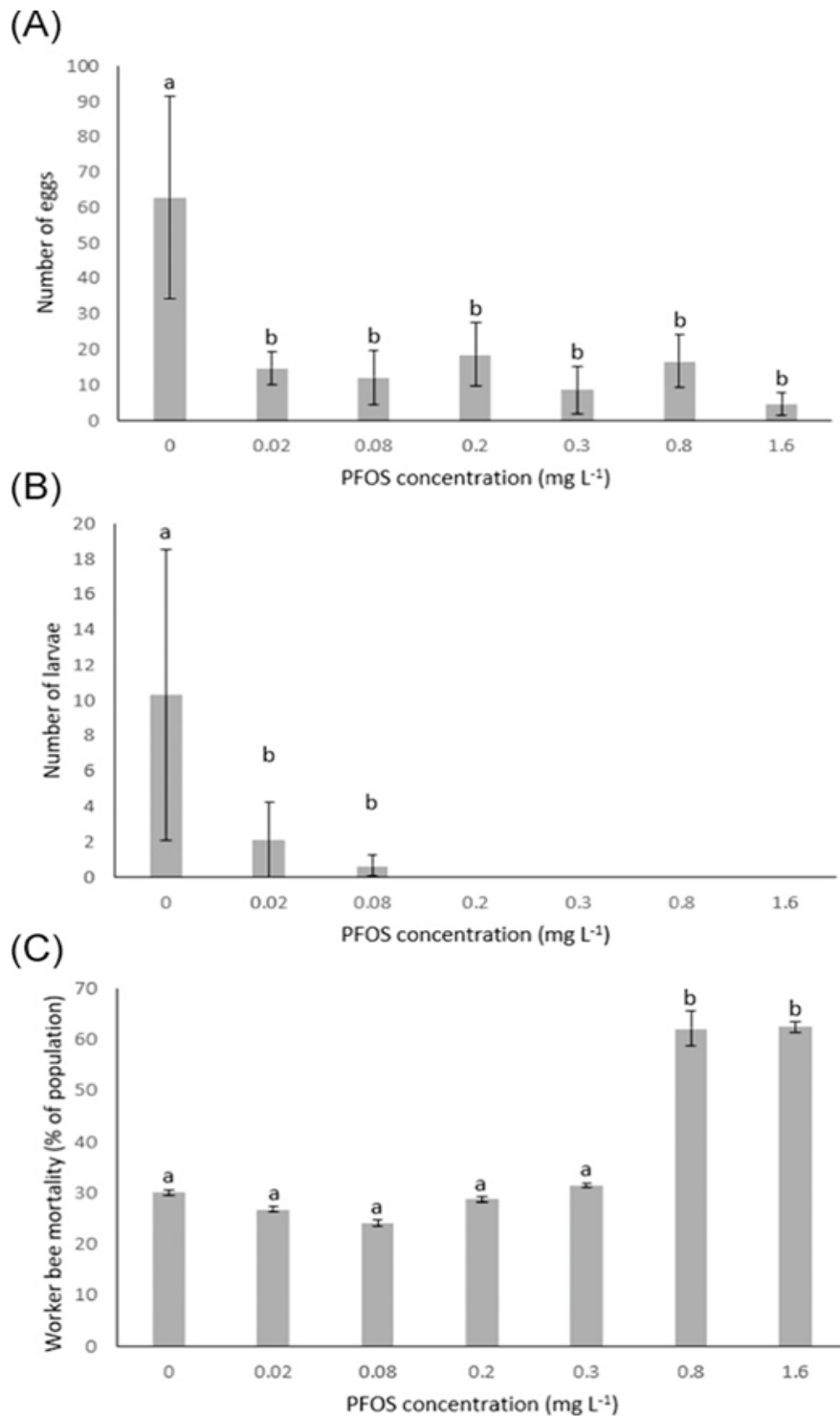


FIGURA 14: risposte biologiche osservate come (A) uova e (B) larve nello sviluppo della covata e (C) mortalità delle api operaie a quattro settimane di esposizione a PFOS. Il grafico a barre indica la media di tre repliche e le barre di errore indicano l'errore standard. Le lettere indicano differenze significative ($p < 0,05$).

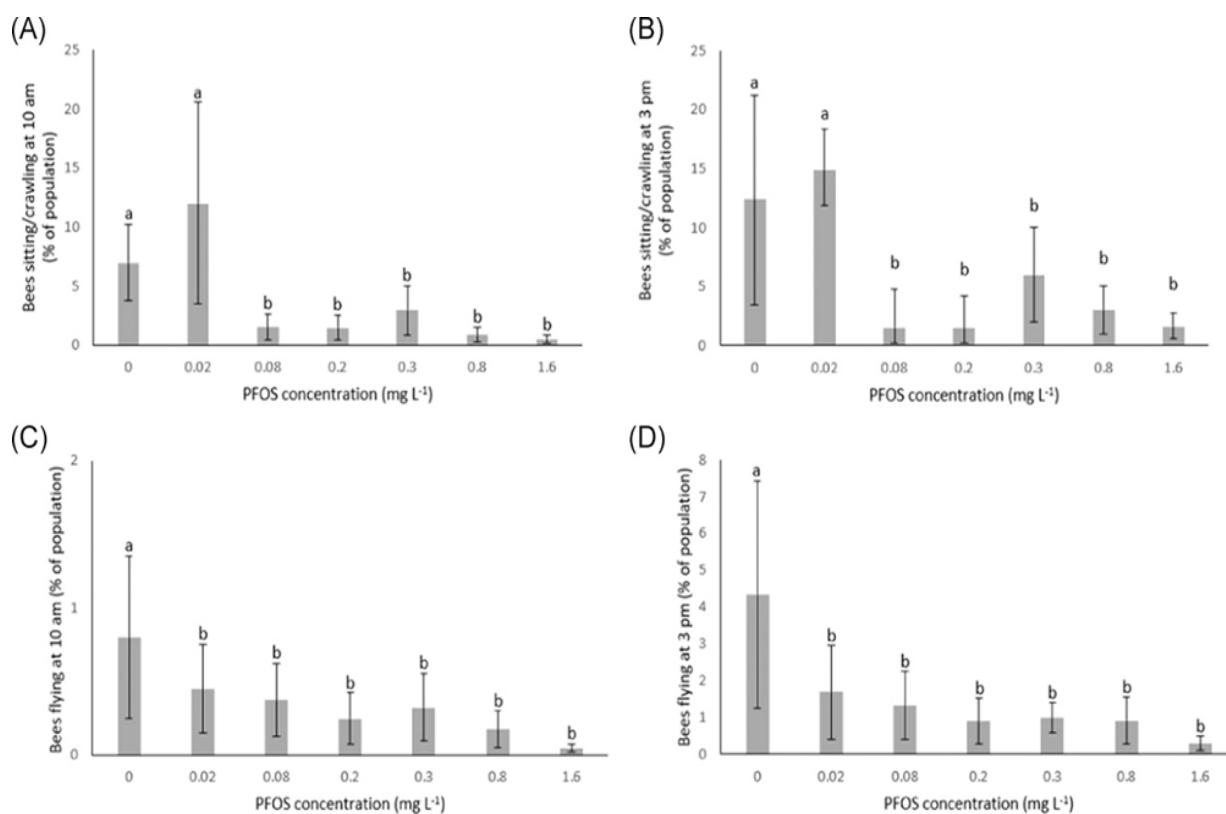


FIGURA 15: attività delle api osservata durante l'esperimento di esposizione al PFOS: (A) api (% della popolazione rimanente) sedute e/o striscianti nella gabbia alle 10:00 e (B) 15:00 e (C) api (% della popolazione rimanente) che volano alle 10:00 am e (D) 15:00. I grafici a barre indicano la media di tre repliche in quattro settimane di osservazione e le barre di errore indicano l'errore standard. Le lettere indicano differenze significative ($p < 0,05$).

I parametri biologici e comportamentali analizzati da *Sonter* e dai suoi collaboratori forniscono una prova inconfutabile che l'esposizione al PFOS influisce negativamente sulle colonie di api mellifere. Globalmente, i risultati di questo studio lasciano ipotizzare preoccupanti effetti riguardano i servizi di impollinazione entomofila, che potrebbero sommarsi a quelli già causati dal cambiamento climatico, dall'intensificazione dell'agricoltura e dalla presenza di parassiti e antagonisti. Lo studio ha evidenziato il trasferimento di PFOS nel miele, con potenziale rischio di tossicità per l'uomo che lo assume attraverso l'alimentazione, e anche potenziali perdite commerciali nel settore industriale.

Discussione studio “Levels of Contamination by Perfluoroalkyl Substances in Honey from Selected European Countries”

Nella fase di ricerca ho rinvenuto uno studio polacco (Surma et al., 2016) che analizzava le concentrazioni di 10 PFAS in 26 campioni di miele prodotti in sette paesi europei: Francia, Inghilterra, Italia, Polonia, Scozia, Slovacchia, Spagna. Nello studio sono stati campionati tipi di miele prodotti da piante diverse, ad esempio timo, eucalipto, erica, ecc. Ne è risultato che i PFCA (acidi perfluoroalchilcarbossilici) sono stati rilevati nel 92 % dei campioni con un intervallo di concentrazioni compreso tra 0.124 e 0.798 ng/g di peso fresco (Figura 16). A seguito di un’attenta lettura ho ritenuto che questo studio non fosse indicativo, per diverse ragioni:

- non si conoscono le specifiche aree di provenienza del miele nei singoli paesi, eccetto per la Polonia, dove viene specificato se proveniente da aree industrializzate o da aree remote (si presume boschive);
- non si conoscono i prodotti usati per la produzione e l’imballaggio del miele, se questi possano aver rappresentato un’ulteriore fonte di esposizione,
- sono stati presi in esame tipi di mieli diversi, prodotti da piante diverse per ogni paese, mentre sarebbe risultato più indicativo un confronto tra mieli dello stesso tipo (ad esempio il millefiori o l’eucalipto) per tutti gli stati campionati. In questo modo avremmo avuto un confronto dei valori delle PFAS presenti in una stessa specie vegetale, ma in aree diverse del pianeta.

Probabilmente nel 2016 quando è stato pubblicato lo studio, questi risultati apparivano nuovi ma da allora le ricerche hanno già ampiamente dimostrato la presenza di tali inquinanti in quasi tutti i prodotti alimentari. L’unico risultato importante per gli scopi della mia tesi è stato che il miele di eucalipto italiano conteneva il più alto numero totale di PFAS, con una concentrazione di 0.878 ng/g di peso fresco. Il miele italiano era anche caratterizzato dalla più alta varietà di PFAS oltre che dal più alto contenuto totale. Purtroppo nello studio non era chiaramente menzionata la zona di origine del miele italiano analizzato.

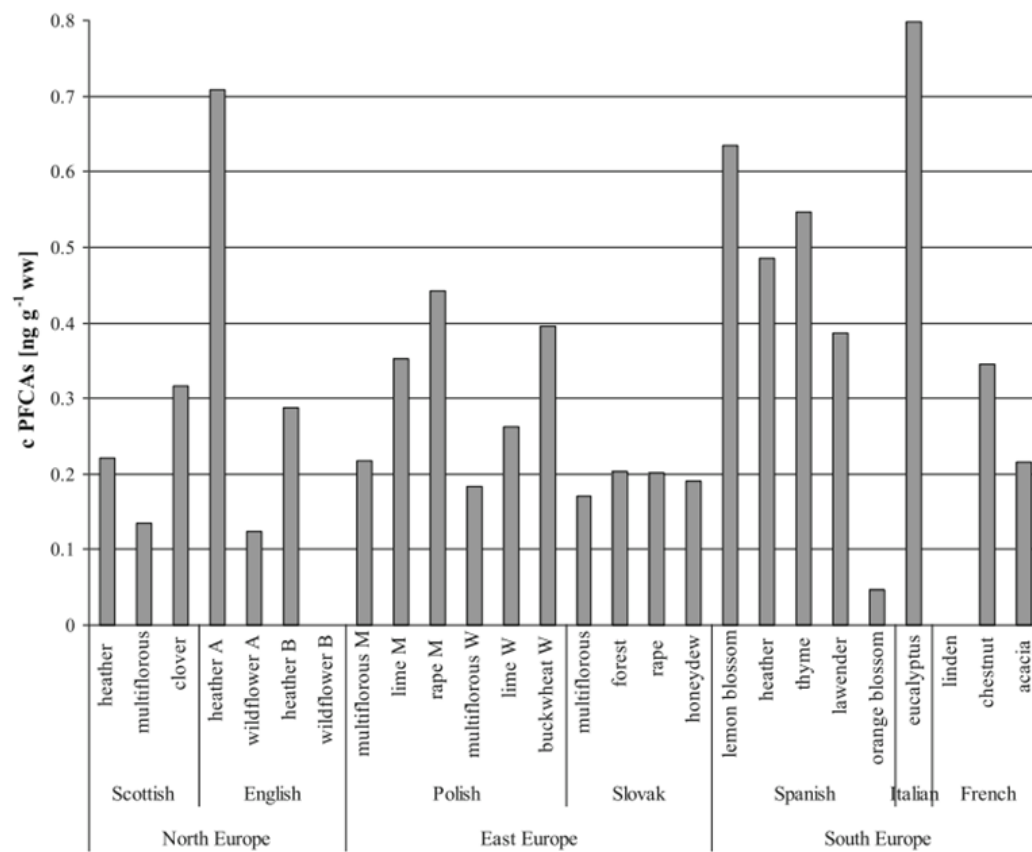


Figura 16: Contenuto totale PFAS in campioni di miele nello studio di Surma et al. (2006).

6. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Le PFAS sono sostanze anfipatiche tendenzialmente idrosolubili, presenti nell'ambiente a seguito delle attività umane, con lunga emivita naturale ed effetti biologici rilevanti sugli organismi superiori. Attraverso la diffusione atmosferica ed il dilavamento causato dalle acque meteoriche si sono diffusi globalmente sulla superficie del pianeta concentrandosi in particolare nei bacini idrici e negli oceani. La presenza delle PFAS nelle precipitazioni e nelle acque utilizzate per l'irrigazione ne ha provocato la concentrazione nei terreni in cui possono venire adsorbite con il risultante accumulo e circolo nelle piante. Nella matrice suolo possono essere assorbiti dal sistema radicale delle piante e distribuirsi in base all'affinità chimica e alle caratteristiche strutturali dei tessuti vegetali nei diversi organi delle piante. I pochi dati disponibili sulle piante forestali indicano che maggiore è la complessità strutturale della pianta, minore è la capacità diffusiva delle sostanze perfluoroalchiliche al suo interno. Le PFAS presentano notevole affinità con i tessuti vegetativi ad elevata attività metabolica ed una scarsa tendenza ad accumularsi nelle strutture di riserva.

Nell'uomo e negli animali la via primaria di contaminazione è l'ingestione di alimenti e acqua inquinati. Nell'uomo le PFAS provocano diverse patologie quali affaticamento epatico, squilibri endocrini e aumento dei livelli di colesterolo. Questi effetti sono particolarmente evidenti nelle zone maggiormente soggette a contaminazione, quali i territori ad elevata antropizzazione e industrializzazione o quelle in cui vi sia stata una massiccia contaminazione prolungata nel tempo. Tra queste aree c'è la pianura padana, precisamente tra Padova e Vicenza, dove gli scarti industriali della MITENI hanno generato un disastro ambientale senza precedenti. La progressiva presa di coscienza delle conseguenze della diffusione delle PFAS, resistenti alla degradazione ambientale, ha portato le autorità a cercare dei sistemi di controllo per arginare il problema, ma è un dato di fatto che quasi in ogni angolo del pianeta vi è la presenza di questo tipo di inquinanti. Il filtraggio delle acque, attualmente in uso nelle zone che si trovano in situazioni di criticità, prevede l'utilizzo di filtri a carboni attivi, che tuttavia non sono facilmente rigenerabili se non con trattamenti molto costosi. Limitare le PFAS nelle acque sarebbe il primo passo per ridurre la presenza nel suolo e la conseguente disponibilità per le radici delle piante. L'Unione Europea ha già iniziato da diversi anni l'iter normativo per andare a ridurre produzione e consumo di PFAS (ECHA, 2020) ed

ha anche istituito un piano per il monitoraggio delle acque sotterranee.

Nonostante la contaminazione identificata nella regione Veneto sia nota da oltre un decennio e le ULSS competenti e l'ARPAV abbiano svolto un monitoraggio continuo, le informazioni disponibili riguardano principalmente i livelli di contaminazione nelle acque superficiali e profonde e i livelli nel sangue delle popolazioni residenti nelle aree inquinate.

In mancanza di una direttiva quadro sulla protezione del suolo, il mandato istituzionale di ARPAV e ULSS non richiede l'analisi del suolo, quindi le analisi della flora spontanea sono state effettuate dai laboratori pubblici solo su mandato dell'autorità giudiziaria. Inoltre, secondo la legislazione vigente, a differenza delle acque superficiali e profonde, non sono previsti screening periodici sul suolo e sulle piante, e se effettuati non vige l'obbligo di pubblicità. Per tale motivo negli articoli scientifici quando si parla di contaminazione da PFAS nei suoli dell'Europa, i casi di inquinamento noti in Italia non sono quasi mai citati.

In generale gli studi sull'impatto delle PFAS negli ambienti forestali sono ancora molto scarsi, ma non assenti del tutto. Un esempio significativo è un documento recente riguardante la Svizzera. La Confederazione Elvetica ha effettuato una campagna di monitoraggio in tutto il suo territorio. Lo studio condotto dall'Università di Zurigo di Scienze Applicate (ZHAW) e Agroscope (il centro di competenza per la ricerca agronomica), su mandato dello Stato Federale, ha esaminato e valutato per la prima volta i livelli di 32 composti perfluoroalchilici su incarico dell'Ufficio Confederale dell'Ambiente. I composti sono stati tutti rintracciati nell'80% dei suoli esaminati e presenti in tutte le regioni della Svizzera, anche in quelle più remote. Di questo 80% dei terreni analizzati, le concentrazioni trovate oscillano tra 0.5 e 4.1 µg/kg (Figura 17). Non è stato tuttavia possibile stabilire una correlazione diretta della concentrazione di esposizione con l'uso del suolo. Però come si evince dalla mappa anche nei siti alpini sono state rinvenute tracce, seppur basse di PFAS.

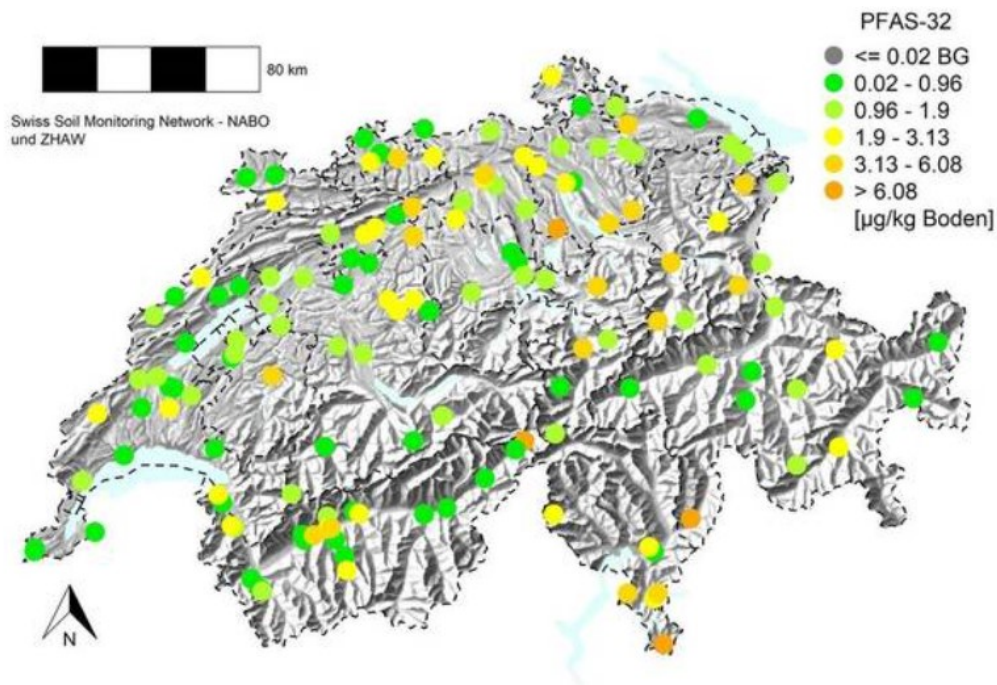


Figura 17: mappa della svizzera con i siti di analisi delle concentrazioni delle PFAS.

Riguardo gli ambienti forestali, risultati simili sono stati ottenuti anche per studi condotti sulle foreste cinesi, dove hanno rinvenuto le PFAS, sebbene a concentrazioni inferiori ai valori soglia.

Dalle informazioni che ho ricavato dalle ricerche pubblicate, ritengo interessanti i dati di accumulo nelle piante di salice, coltivate sia in soluzione idroponica, sia su suoli non inquinati ma irrigati con acque contenenti miscele di PFAS, che per composizione e concentrazione sono paragonabili a quelle presenti nelle acque superficiali e profonde della zona rossa compresa tra le provincie di Vicenza, Verona e Padova. Questi risultati sono importanti perché il monitoraggio annuale effettuato da ARPAV dimostra che in alcune aree i livelli di concentrazione delle PFAS sono rimaste costanti, nonostante la principale sorgente sospettata del rilascio, la MITENI, sia ormai chiusa da diversi anni. Questo fenomeno legato alla stabilità ambientale delle PFAS e lo stesso monitoraggio dimostra che l'inquinamento si sta estendendo anche verso la provincia di Venezia proprio seguendo l'idrografia dell'area.

Gli studi di biochimica e fisiologia sul salice (Sharma et al., 2020; Ebinezern et al., 2022), dimostrano che l'assorbimento di tali sostanze riduce la produttività delle piante inducendo stress metabolico. Tuttavia tutti i cloni di salice studiati hanno dimostrato di poter attivare meccanismi di adattamento, che consentono loro di vegetare. In un

ambiente naturale, questa plasticità metabolica è verosimilmente il fattore che porta le piante ad accumulare elevate concentrazioni di PFAS nelle parti aeree, specialmente nelle foglie.

Una delle conseguenze della persistenza di questi inquinanti, negli ambienti che ho approfondito nella mia tesi, è il loro possibile impatto sulle api. Su questo argomento la ricerca bibliografica nella banca dati SCOPUS, utilizzando 'PFAS' e 'Bee' come parole chiave collegate, ha restituito un solo studio. Questo è sorprendente, considerando l'importanza ecologica delle api e il fatto che esse sono da lungo tempo considerate affidabili biosensori della qualità dell'ambiente rispetto alla contaminazione.

Il dato importante è che le piante, sia orticole, sia cerealicole che legnose finora studiate, possono tollerare concentrazioni di PFOS dell'ordine di 1 mg L^{-1} completando il loro ciclo vitale o vegetativo annuale fino alla fioritura e alla maturazione dei frutti (es. Blaine et al., 2014; Felizeter et al., 2014). Questo comporta inevitabilmente un'esposizione per le api attraverso il polline e il nettare; gli effetti di ciò sono stati analizzati dal lavoro di Sonter et al. (2021) da me approfondito.

In conclusione, sebbene il problema della persistenza delle PFAS nell'ambiente e l'impatto su piante e animali stiano emergendo in tutta la sua gravità, le ricerche progrediscono. La soluzione al problema appare ancora lontana ma l'avanzamento delle conoscenze consentirà una sempre migliore protezione della salute umana. Un aspetto importante che ho riscontrato dall'analisi della letteratura scientifica è che i tecnologi forestali sono poco coinvolti, mentre potrebbero dare un importante contributo alla ricerca di soluzioni adeguate agli ambienti forestali. Se questo coinvolgimento non avverrà, una possibile conseguenza potrebbe essere che non ci saranno ricerche adeguate per gli ambienti forestali, col rischio di intervenire troppo tardi e perdere importanti componenti dell'ecosistema, come ad esempio le api.

7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- ❖ Celli G. (2003) *"Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination"*. APIACTA 38, 63-70
- ❖ EFSA (2008) *"Bee Mortality and Bee Surveillance in Europe"*. A Report from the Assessment Methodology Unit in Response to Agence Francaise. EFSA Journal Q-2008-428
- ❖ Kelly B.C., Ikonomou M.G., Blair J.D., SurrIDGE B., Hoover D., Grace R., and Gobas F. A. P. C. (2009) *"Perfluoroalkyl Contaminants in an Arctic Marine Food Web: Trophic Magnification and Wildlife Exposure"* Cite this: Environ. Sci. Technol. 2009, 43, 11, 4037–4043 Published: April 30, 2009 from <https://doi.org/10.1021/es9003894>
- ❖ EFSA (2009) – *"Bee Mortality and Bee Surveillance in Europe"*. CFP/EFSA/AMU/2008/02
- ❖ Aizen M.A., Garibaldi L.A., Cunningham S.A., Klein, A.M. (2009) *"How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production"*. Annals of Botany, 103, 1579-1588
- ❖ Gallai N., Salles J. M., Settele J., Vaissière B. E. (2009). *"Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline"*. Economia ecologica, 2009, vol. 68, n. 3, 810-821.
- ❖ D'Hollander W, De Voogt P, De Cohen W, Bervoets L. (2010) *"Perfluorinated substances in human food and other sources of human exposure"*. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology volume 208, 179-215
- ❖ Le Féon V., Schermann-Legionnet A., Delette Y., Aviron S., Billeter R., Bugter R., Burel F. (2010) *"Intensification of agriculture, landscape composition and wild bee communities: a large-scale study in four European countries"*. Agriculture, Ecosystems and Environment, 137, 143-150. Available online 19 February 2010.
- ❖ Maini S., Medrzycki P., Porrini C. (2010) *"The puzzle of honey bee losses: a brief review"*. Bulletin of Insectology, 63 (1), 153-160 Mourier et al 2019 Environ Poll 253,1117-1125. Letter sent (February 22, 2010)
- ❖ ISPRA (2011) *"Indagine tecnico conoscitiva sul fenomeno della moria delle api all'interno delle aree naturali protette"*. Relazione Finale, pp 185
- ❖ Cornelis C., D'Hollander W., Roosens L., Covaci A., Smolders R., Van Den Heuvel R., Govarts E., Van Campenhout K., Reynders H., Bervoets L. (2011). *"First assessment of population exposure to perfluorinated compounds in Flanders, Belgium."* Available online 20 November 2011.

- ❖ Lautenbach S., Seppelt R., Liebscher J., Dormann C. F. (2012) *“Spatial and Temporal Trends of Global Pollination Benefit”*. Published: April 26, 2012 <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035954>
- ❖ Kwok K.Y., Yamazaki E., Yamashita N. at person Envelope, Taniyasu S., Murphy M. B., Horii Y., Petrick G., Kallerborn R., Kannan K., Murano K., Lam P. K. S. at person Envelope (2013) *“Transport of Perfluoroalkyl substances (PFAS) from an arctic glacier to downstream locations: Implications for sources”* Volume 447, 1 March 2013, Pages 46-55, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969712013915>
- ❖ Girotti S., Ghini S., Maiolini E., Bolelli L., Ferri E.N. (2013) *“Trace analysis of pollutants by use of honeybees, immunoassays, and chemiluminescence detection”*. Anal Bioanal Chem, 405, 555-571
- ❖ Porrini C., Sabatini A., Girotti S., Ghini S., Medrzycki P., Grillenzoni F., Bortolotti R., Rişcu A., Bura, M. (2013) *“The impact of pesticides on honey bees and hence on humans”*. Animal Science and Biotechnologies, 46 (2), 272
- ❖ Schröter-Kermani, C., et al., 2013, *“Retrospective monitoring of perfluorocarboxylates and perfluorosulfonates in human plasma archived by the German Environmental Specimen Bank”*, International Journal of Hygiene and Environmental Health, 216(6), pp.633; from <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.08.004>
- ❖ FAO (2014) *“Pollinator Safety in Agriculture, field manual”*. Rome, Italy, pp 138
- ❖ IUCN (2015) International Union for Conservation of Nature - European Red List of Bees http://ec.europa.eu/environment/nature/conservation/species/redlist/downloads/European_bees.pdf
- ❖ Munoz, G., et al., 2015, *“Spatial distribution and partitioning behaviour of selected poly- and perfluoroalkyl substances in freshwater ecosystems: a French nationwide survey”*, Science of the Total Environment 517, pp. 48-56; from <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.043>
- ❖ Pramanik, B. P., 2015, *“Occurrence of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the water environment and their removal in a water treatment process”*, Journal of Water Reuse and Desalination 5(2), pp. 196-210; from <https://doi.org/10.2166/wrd.2014.068>
- ❖ Bellucci V., Bianco P., Formato G., Mutinelli F., Porrini C., Lodesani M. (2016). *“Morie di api e prodotti fitosanitari”*. Apitalia vol. 12, pp. 46-52, 2016
- ❖ M. Surma, H. Zielin´, M. Piskula. (2016) *“Levels of Contamination by Perfluoroalkyl Substances in Honey from Selected European Countries”*. Published: 27 May 2016

- ❖ IPBES (2017) Schmeller D. S., Niemelä J., Bridgewater P. (2017) “*The Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services*”. Published: 05 May 2017, pp 2271–2275
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10531-017-1361-5>
- ❖ Regione Veneto (2017). Sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) - Regione del Veneto; data agg. 03.08.2017, <https://www.regione.veneto.it/web/ambiente-e-territorio/pfas>
- ❖ WHO Europe, (2017), Keeping our water clean: the case of water contamination in the Veneto region, Italy, World Health Organization Regional Office for Europe; from https://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0019/341074/pfas-report-20170606-h1330-print-isbn.pdf
- ❖ Sahlin, S., 2017, PFAS in the Baltic Sea region: inventory of awareness, actions and strategies related to highly fluorinated substances, PFAS, including PFOS, Policy Area Hazards, EUSBSR, Swedish Environmental Protection Agency; from [https://portal.helcom.fi/meetings/PRESSURE%207-2017-462/MeetingDocuments/7-7 Att%20Information%20on%20PFAS%20in%20the%20Baltic%20Sea%20Region.pdf](https://portal.helcom.fi/meetings/PRESSURE%207-2017-462/MeetingDocuments/7-7_Att%20Information%20on%20PFAS%20in%20the%20Baltic%20Sea%20Region.pdf)
- ❖ Groffen, T., et al., 2017, “*Perfluoroalkylated acids in the eggs of great tits (*Parus major*) near a fluorochemical plant in Flanders, Belgium*”, Environmental Pollution 228, pp. 140-148; from <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.007>
- ❖ Crisafulli, F. (2019) “*Magnificazione Biologica – Ecologia*”. Main page wiki con pagine di divulgazione scientifica. Published: 29 November 2019 from, <https://biologiawiki.it/wiki/magnificazione-biologica/>
- ❖ Goldenman, G., et al., 2019, “*The cost of inaction: A socioeconomic analysis of environmental and health impacts linked to exposure to PFAS*”, Nordic Council of Ministers; from <http://norden.diva-portal.org/smash/get/diva2:1295959/FULLTEXT01.pdf>
- ❖ EEA, 2019, Emerging chemical risks in Europe — PFAS, European Environment Agency; from <https://www.eea.europa.eu/publications/emerging-chemical-risks-in-europe/emerging-chemical-risks-in-europe>
- ❖ Brandsma, S. H. et al., 2019, “*The PFOA substitute GenX detected in the environment near a fluoropolymer manufacturing plant in the Netherlands*”, Chemosphere 220, pp. 493-500; from <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.135>
- ❖ Sharma N., Barion G., Shrestha I., Ebinezer L. B. at person Envelope, Trentin A.R., Vamerali T., Mezzalira G., Masi A., Ghisa R. (2020) “*Accumulation and effects of perfluoroalkyl substances in three hydroponically grown *Salix L.* species*” Available online 14 January 2020, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651319314812?via%3Dihub>

- ❖ Talluri M. (2020). “Le api sentinelle dell’ambiente” SNPA Sistema nazionale protezione ambiente. from <https://www.snambiente.it/2020/05/22/le-api-sentinelle-dellambiente/>
- ❖ Lohmann, R., et al., 2020, “Are fluoropolymers really of low concern for human and environmental health and separate from other PFAS?”, *Environmental Science and Technology* 54(20), pp. 12820-12828; from <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c03244>
- ❖ Schrenk, D., et al., 2020, “Risk to human health related to the presence of perfluoroalkyl substances in food, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain”, *EFSA Journal*, 18(9), pp. 6223; from <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6223>
- ❖ Gebbink, W. A. and van Leeuwen, S. P. J., 2020, “Environmental contamination and human exposure to PFASs near a fluorochemical production plant: review of historic and current PFOA and GenX contamination in the Netherlands”, *Environment International* 137(2020), 105583; from <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105583>
- ❖ Göckener, B., et al., 2020, “Human biomonitoring of per- and polyfluoroalkyl substances in German blood plasma samples from 1982 to 2019”, *Environment International* 145, 106123; from <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106123>
- ❖ Miner, K. R., et al., 2021, “Deposition of PFAS ‘forever chemicals’ on Mt. Everest”, *Science of the Total Environment* 759, p. 144421; from <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144421>
- ❖ Serrano, L., et al., 2021, “Concentrations of perfluoroalkyl substances in donor breast milk in Southern Spain and their potential determinants”, *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 236, p. 113796; from <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2021.113796>
- ❖ ETC/WMGE, 2021, Fluorinated polymers in a low carbon, circular and toxic-free economy, ETC/WMGE Report 2021/9, European Topic Centre on Waste and Materials in a Green Economy; from <https://www.eionet.europa.eu/etcs/etc-wmge/products/etc-wmge-reports/fluorinated-polymers-in-a-low-carbon-circular-and-toxic-free-economy>
- ❖ Schroeder T., Bond D., & Foley J. (2021). “Pfas soil and groundwater contamination via industrial airborne emission and land deposition in SW Vermont and Eastern New York State, USA”. First published 01 Jan 2021 <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/EM/D0EM00427H>
- ❖ Sonter C. A., Rader R., Stevenson G., Stavert J. R., Wilson S. C. (2021) “Biological and behavioral responses of European honey bee (*Apis mellifera*) colonies to perfluorooctane sulfonate exposure” First published: 07 April 2021, from <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ieam.4421>

- ❖ Bergero M., Bontà M., Bourlot G., Latino G., (2021) “*Il Monitoraggio ambientale con le api*” Quaderni dell'Agricoltura. Creato: 17/11/202, from <https://quaderniagricoltura.regione.piemonte.it/articoli/analisi-e-ricerche/112-il-monitoraggio-ambientale-con-le-api.html>
- ❖ Bunting, S. Y., et al., 2021, “*Emerging organic compounds in European groundwater*”, Environmental Pollution 269, 115945; from <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115945>
- ❖ Surma, M., et al., (2021), “*Perfluoroalkyl substance contamination levels of pike (Esox luciusL.) and roach (Rutilus rutilusL.) from selected Masurian lakes in Eastern Europe*”, Environmental Toxicology and Chemistry 40(12), pp. 3317-3327; from <https://doi.org/10.1002/etc.5223>
- ❖ Vito, (2022), Studie naar PFAS in lucht en deposities in de omgeving van 3M en Zwijndrecht, 2022/HEALTH/R/2680, VITO NV; from <https://www.vmm.be/publicaties/studie-naar-pfas-in-lucht-en-deposities-in-de-omgeving-van-3m-en-zwijndrecht#:~:text=3M%20en%20Zwijndrecht-,Studie%20naar%20PFAS%20in%20lucht%20en%20deposities%20in%20de%20omgeving,3M%2Dsite%20en%20de%20Oosterweelwerf>
- ❖ Di Fiore C., Nuzzo A., Torino V., De Cristofaro A., Notardonato I., Passarella S., Di Giorgi S., Avino P. (2022) “*Honeybees as bioindicators of heavy metal pollution in urban and rural areas in the south of Italy*”. MDPI. Published: 13 April 2022 from <https://www.mdpi.com/2073-4433/13/4/624>
- ❖ Johnson G.R., Brusseau M.L., Carroll K.C., Tick G.R., Duncan C.M. (2022) “*Global distributions, source-type dependencies, and concentration ranges of per- and polyfluoroalkyl substances in groundwater*”. Science of The Total Environment 841, 156602.
- ❖ “*Biodiversity as a solution BeeOdiversity*”. (2022). Published: 15 July 2022, from <https://beeodiversity.com/en/>
- ❖ Zafeiraki E., Sabo R., Kasiotis K. M., Machera K., Sabová L., Majchrák T. (2022) “*Adult honeybees and beeswax as indicators of trace elements pollution in a vulnerable environment: Distribution among different apicultural compartments*”. MDPI. Published: 6 October, 2022 from <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/19/6629#>
- ❖ ARPAV (2022). Sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) - Arpa Veneto data agg. 16.12.2022. <https://www.arpa.veneto.it/arpav/pagine-generiche/sostanze-perfluoro-alchiliche-pfas>
- ❖ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M.Aleandri". Retrieved December 11, 2022, from <https://www.izslt.it/apicoltura/>
- ❖ “*Sostanze alchilate poli o perfluorurate (PFAS)*” Retrieved December 11, (2022), from <https://www.lennotech.it/processes/pfas.htm>

- ❖ Belluomo V. (2022) “*Bioaccumulo e biomagnificazione: definizione ed esempi*” WeSchool. (n.d.). Retrieved December 11 2022, from <https://library.weschool.com/lezione/ecologia-inquinamento-uomo-accumulo-ambiente-habitat-contaminazione3092.html#:~:text=Questo%20fenomeno%20di%20accumulo%20di,%20si%20parla%20di%20biomagnificazione>
- ❖ Falconi M E-learning GEOCORSI (2022) “*PFAS: Caratteristiche, Caratterizzazione e Analisi di rischio*”. Retrieved December 11, 2022, from https://www.geocorsi.it/203_110/corso-pfas-caratteristiche-caratterizzazione-e-analisi-di-rischio.html
- ❖ Androulakakis, A., et al., (2022), “*Determination of 56 per-and polyfluoroalkyl substances in top predators and their prey from Northern Europe by LC-MS/MS*”, Chemosphere 287, 131775, from <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131775>
- ❖ BMUV, (2022), “*Guidelines for PFAS assessment: recommendations for the uniform nationwide assessment of soil and water contamination and for the disposal of soil material containing PFAS*”, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz; from https://www.bmuv.de/fileadmin/Daten_BMU/Download_PDF/Bodenschutz/pfas_leitfaden_2022_en_bf.pdf
- ❖ Cousins, I. T., et al., (2022), “*Outside the safe operating space of a new planetary boundary for per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS)*”, Environmental Science and Technology 56(16), pp. 11172-11179; from <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c02765>
- ❖ EC, (2022), “*Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the field of water policy, Directive 2006/118/EC on the protection of groundwater against pollution and deterioration and Directive 2008/105/EC on environmental quality standards in the field of water policy*”, Brussels, 26.10.2022 COM(2022) 540 final 2022/0344; from https://environment.ec.europa.eu/publications/proposal-amending-water-directives_en
- ❖ ECHA, (2022), “*Perfluoroalkyl chemicals (PFASs)*”, from <https://echa.europa.eu/hot-topics/perfluoroalkyl-chemicals-pfas>
- ❖ ECHA, (2022), “*Proposal to ban ‘forever chemicals’ in firefighting foams throughout the EU*”, European Chemicals Agency”, from <https://echa.europa.eu/de/-/proposal-to-ban-forever-chemicals-in-firefighting-foams-throughout-the-eu>
- ❖ HBM4EU, (2022), PFAS policy brief; from https://www.hbm4eu.eu/wp-content/uploads/2022/06/HBM4EU_Policy-Brief-PFAS.pdf
- ❖ Lobo Vicente et al., forthcoming, “*HBM4EU results support the Chemicals*” Strategy for Sustainability and the Zero-Pollution Action Plan’, International Journal of

Hygiene and Environmental Health, 247.

- ❖ RIVM, (2022), “*PFAS restriction proposal*”, Netherlands National Institute for Public Health and the Environment; from <https://www.rivm.nl/en/pfas/pfas-restriction-proposal>
- ❖ Reinikainen, J., et al., (2022), “*The occurrence, distribution, and risks of PFAS at sites impacted by firefighting foams*”, Science of the Total Environment 829, pp. 154237; from <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154237>
- ❖ Richterová, D., et al., (2023), “*PFAS levels and determinants of variability in exposure in European teenagers—Results from the HBM4EU aligned studies (2014–2021)*”, International Journal of Hygiene and Environmental Health, 247, pp.114057; from <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114057>
- ❖ RSINews, l’informazione della R. svizzera. (n.d.). “*Un inquinamento invisibile, Ma Ben Present*”. (2023) rsi, from <https://www.rsi.ch/news/svizzera/Un-inquinamento-invisibile-ma-ben-presente-15924928.html>