

# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale**

**in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

## **Sviluppo di biosensori enzimatici per detection di molecole erbicide**



**Relatore**

Prof. Cristina Pagliano

*firma del relatore*

**Candidato**

Eleonora Bertone

*firma del candidato*

Dicembre 2020

# SOMMARIO

Introduzione.....	1
1. Inquinamento delle risorse idriche in Europa.....	3
1.1 Inquinamento delle acque superficiali.....	4
1.2 Inquinamento delle acque sotterranee.....	6
1.3 Principali inquinanti.....	7
1.3.1 Miscele.....	9
1.3.2 Erbicidi.....	10
1.4 Inquinamento da erbicidi delle risorse idriche in Italia.....	12
1.4.1 Inquinamento da erbicidi delle acque superficiali in Italia.....	13
1.4.2 Inquinamento da erbicidi delle acque sotterranee in Italia.....	15
2. Erbicidi fotosintetici.....	19
2.1 Principali erbicidi agenti sul Fotosistema II.....	22
2.2 Principali erbicidi agenti sul Fotosistema I.....	25
2.3 Utilizzo di erbicidi fotosintetici nelle principali colture italiane.....	26
2.4 Sito d'azione degli erbicidi triazinici.....	29
2.4.1 Struttura e dinamiche dei tilacoidi.....	29
2.4.2 Struttura del PSII.....	30
2.4.3 Sito di legame $Q_B$ .....	33
3. Biosensori per la detection di erbicidi fotosintetici.....	35
3.1 Principio di funzionamento.....	37
3.1.1 Biosensori amperometrici.....	39
3.1.2 Biosensori a fluorescenza.....	43
3.2 Immobilizzazione.....	46
3.3 Parametri di efficienza del biosensore.....	48
3.3.1 Limite di rilevabilità.....	49
3.3.2 Caratteristiche di calibrazione: range di lavoro e sensibilità.....	52
3.3.3 Selettività e affinità.....	53
3.3.4 Stabilità.....	53
3.4 Confronto di biosensori per il rilevamento di terbutilazina.....	55
3.5 Ottimizzazione del biosensore: nuove sfide per il futuro.....	56
3.5.1 Modifiche genetiche.....	57
3.5.2 Nanomateriali.....	61
4. Progetto: Realizzazione di un biosensore per il rilevamento di terbutilazina in acqua ambientale e validazione attraverso sperimentazione sul campo.....	63
4.1 Abstract.....	63
4.2 Descrizione dettagliata della proposta progettuale.....	63

4.2.1 Stato dell'arte .....	63
4.2.2 Obiettivi e metodologie della proposta .....	66
4.3 Articolazione del progetto in work-package .....	70
4.3.1 Unità di ricerca ed enti coinvolti, modalità di collaborazione .....	70
4.3.2 Pianificazione delle attività di progetto .....	73
4.4 Potenzialità applicative .....	77
4.5 Sostenibilità economica .....	78
5. Conclusioni.....	79
Lista Abbreviazioni.....	I
Riferimenti Bibliografici .....	II
Sitografia.....	VI
Appendice A .....	VII
Appendice B .....	VIII
Ringraziamenti .....	X



## INTRODUZIONE

La contaminazione delle risorse di acqua potabile in Europa e in particolare in Italia è legata a vari aspetti dell'attività umana, tra cui i principali determinanti sono l'utilizzo di pesticidi in agricoltura e l'immissione di acque reflue derivanti da attività industriali o domestiche. La conseguenza principale è la presenza nei bacini idrici di sostanze potenzialmente dannose per l'ecosistema e per la salute umana; tra queste soprattutto metalli, pesticidi, prodotti dell'industria chimica e prodotti farmaceutici giocano un ruolo fondamentale.

Il problema dell'inquinamento pone come obiettivo per i vari Stati quello della salvaguardia e tutela dell'ambiente e rivela la necessità di approfondire ulteriormente le conoscenze in questo ambito.

Gli Stati dell'Unione Europea sono impegnati a proteggere e migliorare lo stato degli ecosistemi acquatici attraverso l'imposizione di concentrazioni massime ammissibili degli inquinanti sopra nominati e attraverso programmi di monitoraggio della loro presenza e concentrazione. I corpi idrici analizzati sono suddivisi in acque superficiali (tutte quelle interne, di transizione e costiere) e acque sotterranee (tutte quelle che si trovano sotto la superficie del suolo e a contatto diretto con il suolo o il sottosuolo).

I rapporti europei, che sono stati analizzati, mostrano un monitoraggio limitato solo ad alcune zone, una disuniformità nella raccolta e analisi dei dati e la necessità di studiare metodi innovativi per la purificazione dell'acqua dai contaminanti. Inoltre, va considerata la mancanza di informazione e sensibilizzazione dei consumatori riguardo allo stato attuale dell'inquinamento delle acque e dei pericoli che esso comporta per la salute.

L'obiettivo è quello di affrontare in modo organico e ad ampio spettro il problema dell'inquinamento delle risorse idriche da erbicidi e, sulla base di uno stato dell'arte aggiornato ed esaustivo, di proporre delle idee innovative per migliorare il monitoraggio ambientale di alcuni erbicidi tra i più pericolosi e abbondanti nelle acque.

Si partirà dall'esposizione della situazione attuale europea ed italiana riguardante l'inquinamento delle risorse idriche da erbicidi (Capitolo 1), concentrandosi poi specificamente su erbicidi fotosintetici (Capitolo 2), con particolare attenzione alla sostanza terbutilazina. Verranno poi trattate le principali tecniche di analisi chimica e biologica attualmente in uso per il rilevamento di queste sostanze nelle acque (Capitolo 3). Infine, si formuleranno proposte di miglioramento e ottimizzazione dei metodi analitici attualmente in uso nel monitoraggio di questi inquinanti nelle riserve idriche (Capitolo 4).



# 1.INQUINAMENTO DELLE RISORSE IDRICHE IN EUROPA

L'Europa è impegnata a perseguire gli obiettivi di salvaguardia, tutela e miglioramento della qualità ambientale, al fine di proteggere la salute umana. Inoltre, promuove misure destinate a risolvere i problemi ambientali a livello regionale, nazionale o comunitario.

I principi fondamentali adottati in materia ambientale sono la precauzione, l'azione preventiva e la correzione in via prioritaria alla fonte, come sancito dal Trattato sul Funzionamento dell'Unione Europea[1]. Gli Stati membri si sono impegnati, con la Water Framework Directive (WFD)[2], ad intraprendere azioni per concretizzare questi principi. Ogni Stato ha accettato di fissare valori limite e standard di qualità e di elaborare programmi di monitoraggio dello stato delle acque.

Fissare gli standard di qualità (Environmental Quality Standards, EQS) significa definire la concentrazione massima media annuale ammissibile nel bacino idrico, considerando dei fattori di sicurezza stabiliti dalla valutazione del rischio chimico. I valori limite devono essere individuati per i principali inquinanti elencati nella WFD, tra cui: metalli, biocidi, fitosanitari, cianuri, idrocarburi e sostanze ritenute cancerogene o mutagene. Per il monitoraggio di queste sostanze, si deve prevedere un programma di misure per ogni distretto idrografico.

Nel 2012 è stato realizzato un primo ciclo di report dei piani di gestione dei bacini idrografici, per monitorare quali di questi non rispettassero gli standard imposti. Nel 2018 è stato effettuato un secondo ciclo di controlli e si è verificato un notevole miglioramento dello stato chimico dei bacini e una riduzione del numero di casi non conformi agli standard. Nonostante questo, il 46% dei bacini idrografici superficiali presentava uno stato di inquinamento non accettabile. La maggior parte di essi a causa della presenza di mercurio, mentre il 3% risultava inquinato da altre sostanze, tra cui principalmente pesticidi[3].

La presenza nell'acqua delle sostanze riconosciute come pericolose è risultata elevata. Le cause di questi livelli così elevati vanno ulteriormente indagate. Inoltre, si ha la necessità di identificare le azioni da intraprendere per far sì che in ogni bacino idrico la concentrazione di questi inquinanti rispetti i limiti stabiliti dalla legge.

In questo contesto L'Unione Europea, a Febbraio del 2020, ha pubblicato una Call europea[4] in cui si è impegnata ad investire su nuovi progetti di ricerca e innovazione che garantiscano a tutti l'approvvigionamento di acqua incontaminata e che puntino a migliorare la salute umana. L'idea segue le linee guida dettate dalle Nazioni Unite e dalla World Health Organization che hanno posto come obiettivo per il futuro il miglioramento delle conoscenze sugli inquinanti delle risorse idriche, al fine di ridurre il rischio per la salute umana e per l'ambiente. Molti dei contaminanti conosciuti, infatti, sono estremamente dannosi per l'ecosistema anche a basse concentrazioni. Inoltre, spesso intervengono vari fenomeni complessi nel trasporto e accumulo di queste sostanze che, quindi, riescono a diffondere attraverso il terreno, accumularsi in particolari punti di interesse ed entrare anche a far parte della catena alimentare. L'obiettivo è quello di approfondire le conoscenze riguardanti il trasporto e la persistenza nell'acqua degli inquinanti e di proporre strategie per la detection, il monitoraggio e la rimozione. In particolare, la Call europea si ripropone di finanziare progetti di ricerca incentrati su tre aree principali riguardanti contaminanti di interesse emergente (Contaminants of Emerging Concern, CEC) nelle risorse idriche:

1. *Misura del comportamento dei CEC*

La richiesta è quella di sviluppare strumenti e indicatori per tracciare il percorso di queste sostanze dal punto in cui vengono immesse nell'ambiente comprendendo i fenomeni di trasporto, accumulo, degradazione e rimozione che le coinvolgono.

2. *Valutazione del rischio legato ai CEC*

In particolare, si deve approfondire il rischio per la salute umana dovuto all'assunzione diretta di acqua contaminata o alla trasmissione delle sostanze attraverso la catena alimentare.

3. *Azioni e strategie per ridurre i CEC*

Le proposte devono riguardare sia la riduzione di rilasci alla sorgente, sia interventi di mitigazione da realizzare in risorse idriche che sono già state contaminate.

La contaminazione delle fonti di acqua potabile è una problematica di interesse internazionale, non solo comunitario. È di primaria importanza quindi sviluppare la ricerca in questo ambito e agire in modo da ridurre il rischio e salvaguardare la salute umana a livello mondiale.

## 1.1 Inquinamento delle acque superficiali

L'obiettivo comune di tutti gli Stati membri dell'Unione Europea è quello proteggere, ripristinare e migliorare la qualità dei corpi idrici superficiali attuando tutte le misure necessarie[2]. Le acque superficiali sono tutte le acque interne ai confini di uno stato che scorrono sulla superficie. In particolare, esse comprendono: fiumi, laghi, acque di transizione, acque costiere e corpi idrici superficiali artificiali (dighe).

Per valutare lo stato di un corpo idrico superficiale, si analizzano vari elementi che ne determinano la qualità; per esempio si analizzano parametri chimico-fisici (temperatura, salinità, ossigenazione), parametri biologici (composizione e abbondanza di flora acquatica e fauna ittica) e si valuta la presenza di inquinanti. Il bacino idrico è in buono stato se le sue condizioni si discostano solo lievemente da quelle dello stesso tipo di bacino incontaminato. Al contrario, quando lo stato delle acque superficiali non è accettabile, se ne valuta il rischio chimico associato. Il rischio chimico è calcolato basandosi sul confronto tra la concentrazione dei singoli inquinanti nell'acqua e i limiti imposti dagli standard di qualità (utilizzando fattori di incertezza).

Il rischio chimico può essere acuto, dovuto ad una o poche esposizioni e strettamente correlato con alte concentrazioni, oppure cronico, che si presenta in seguito ad una continua e duratura esposizione al contaminante e perciò legato alla concentrazione media.

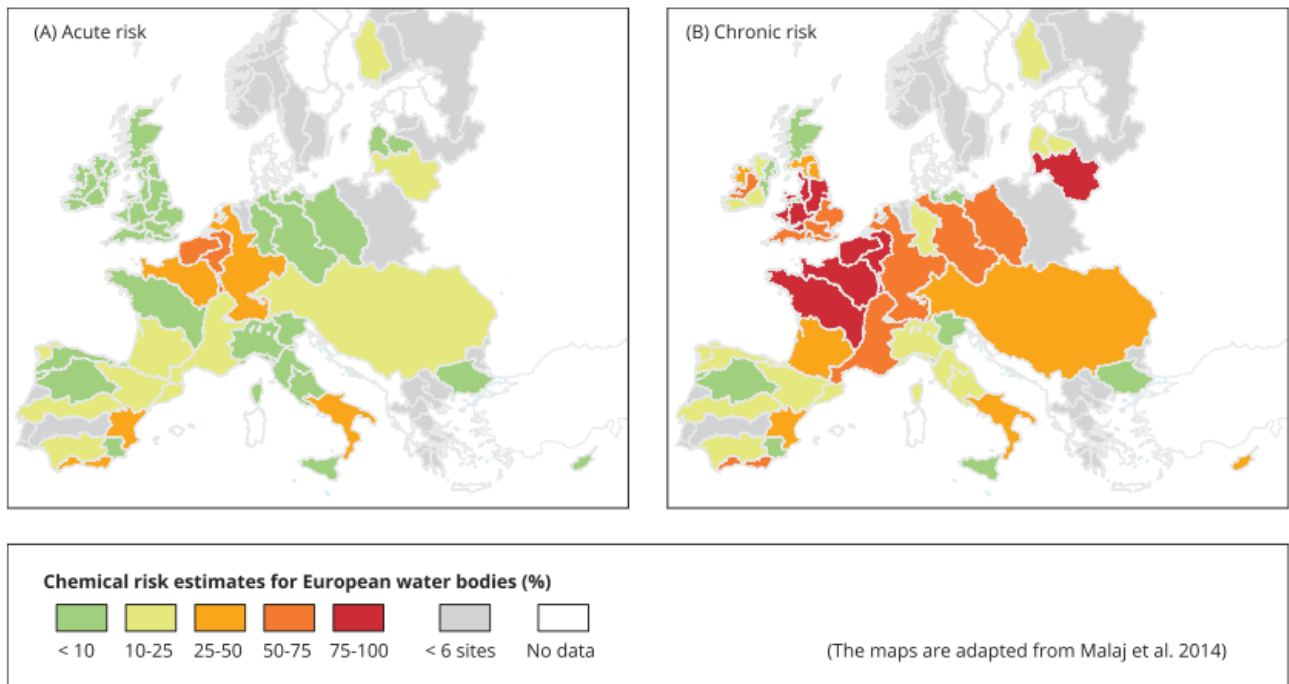
Uno studio effettuato nel 2014[3] ha analizzato il rischio chimico nei bacini fluviali europei basandosi sui dati di monitoraggio raccolti nel Water Information System for Europe. Sono state considerate più di 200 sostanze presenti nell'acqua. Le concentrazioni sono state confrontate con i valori limite ottenuti dalla valutazione dei rischi per quanto riguarda il rischio acuto e cronico.

Il territorio europeo è stato suddiviso in varie zone (Figura 1.1), in ognuna delle quali sono presenti più siti. Per ogni sito si sono confrontati i valori misurati con quelli calcolati come massimi nella valutazione dei rischi. È stata calcolata la frazione dei siti in una zona che presentava una concentrazione massima di una sostanza superiore ai limiti di rischio acuto (Figura 1A) e la frazione di essi che presentava una concentrazione media di sostanze superiore alla soglia di rischio cronico (Figura 1B). Il 14% del totale dei siti analizzati ha mostrato concentrazione massima superiore al valore ammissibile per il rischio acuto e il 42% una concentrazione media superiore al rischio cronico. Quest'ultimo



è tendenzialmente più elevato rispetto al rischio acuto, probabilmente per fatto che la contaminazione persistente, che comunque non è non esageratamente elevata, crea principalmente danni ad organismi continuamente esposti.

I valori di rischio più alti sono stati ottenuti per le zone di cui si avevano più dati, di conseguenza, è possibile che le zone in cui il rischio risulta minore, in realtà, soffrano di una carenza di monitoraggio e analisi.

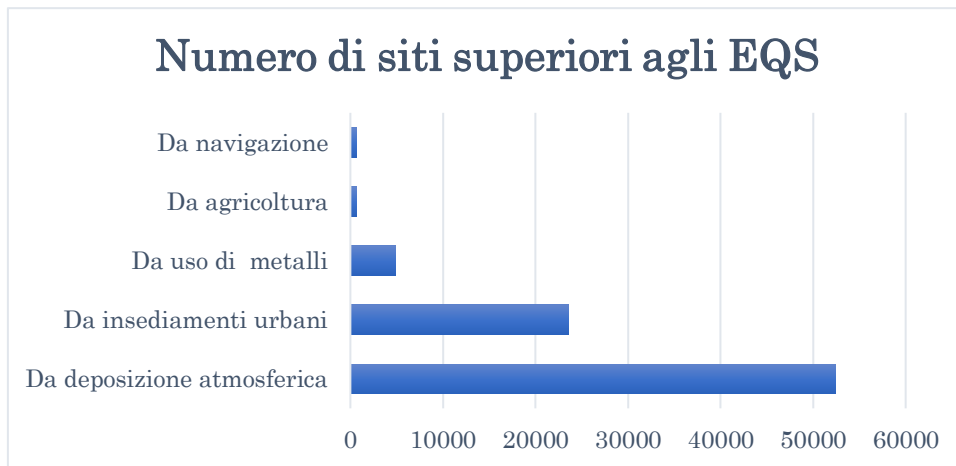


**Figura 1.1:** Percentuale dei siti (per ogni zona) con concentrazioni superiori al valore di rischio acuto (A) e rischio cronico (B). La percentuale è calcolata come frazione di siti non conformi su numero di siti analizzati in quella sezione della mappa. I valori percentuali sono raggruppati in range ai quali è associato un colore differente. (Immagine tratta da: [3]).

Le acque superficiali presentano una grande varietà di inquinanti; essi possono essere raggruppati in base alle attività da cui sono originati, dunque possono derivare da: deposizione atmosferica, insediamenti urbani, uso di metalli, agricoltura e navigazione.

Uno studio effettuato su 111.105 bacini di acqua superficiale situati negli Stati membri dell'Unione[3], ha stilato una lista degli inquinanti che più frequentemente superano gli EQS sanciti dalla WFD. Essi sono suddivisi in base al criterio esposto sopra e riportati nel grafico in Figura 1.2.

Dei siti analizzati, 689 in tutta Europa presentano concentrazione di sostanze provenienti dall'agricoltura superiori agli standard imposti. Per quanto questo numero sembri insignificante rispetto alle altre fonti di contaminazione, la presenza eccessiva di pesticidi nelle acque superficiali europee non è per nulla trascurabile e rappresenta un problema rilevante a livello ambientale e per la salute umana.



**Figura 1.2:** Numero di bacini di acque superficiali in Europa che supera i valori di EQS per classe di inquinanti. (Grafico realizzato elaborando i dati riportati in [3]).

## 1.2 Inquinamento delle acque sotterranee

Le acque sotterranee sono tutte le acque che si trovano sotto la superficie del suolo nella zona di saturazione e a contatto diretto con il suolo o il sottosuolo. Queste sono immagazzinate nei pori delle rocce sedimentarie e nelle fenditure delle rocce compatte. Le acque sotterranee, che si trovano a profondità non eccessive, entrano a far parte del ciclo idrogeologico e sono fondamentali per l'uomo in quanto rappresentano la più grande fonte di acqua potabile.

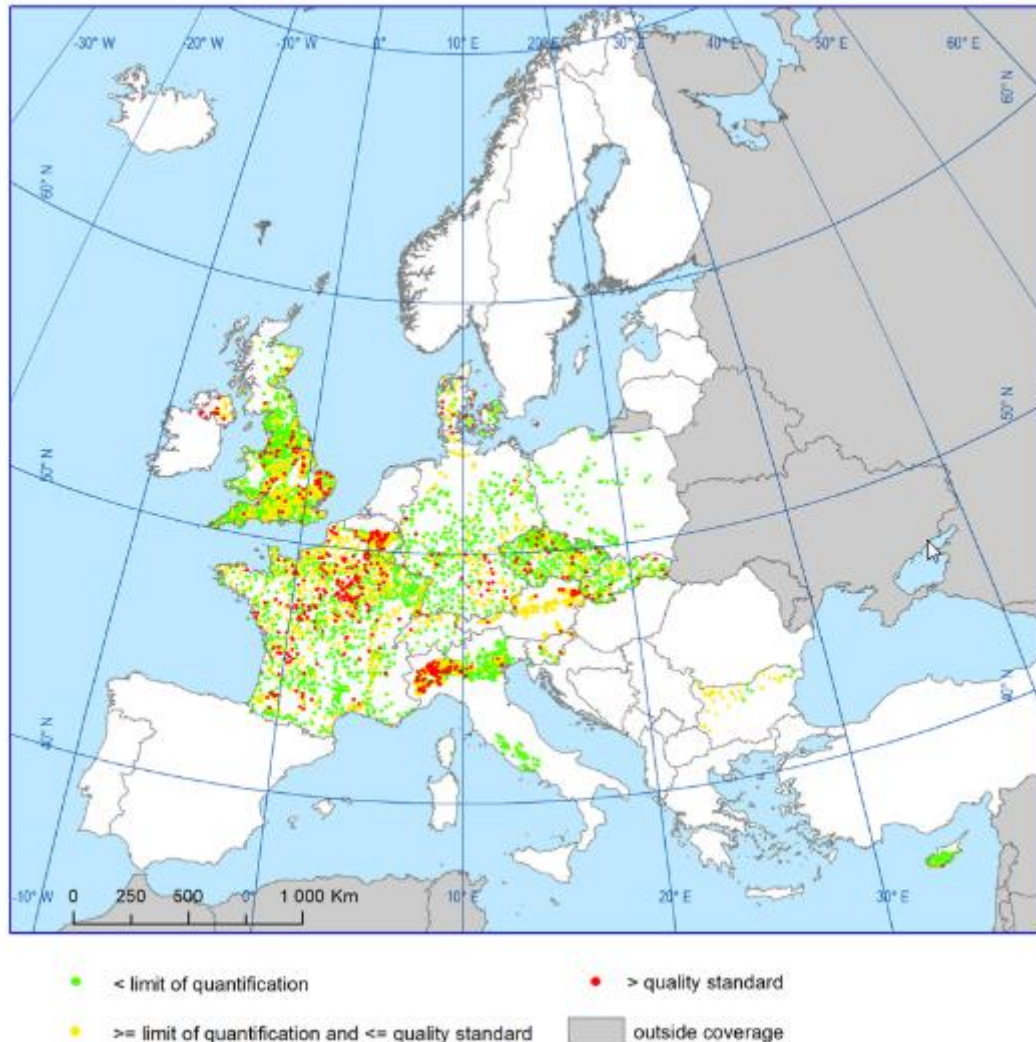
Gli Stati dell'Unione Europea devono attuare le misure necessarie ad impedire o limitare l'immissione di inquinanti nelle acque sotterranee e impedire il deterioramento dello stato dei corpi idrici sotterranei[2]. Tuttavia, la presenza di inquinanti, in particolare i pesticidi, nelle acque sotterranee in Europa è rilevante.

Negli anni 2010 e 2011 la European Environment Agency ha raccolto dati sulla presenza di pesticidi nelle acque sotterranee in 7669 stazioni di monitoraggio di tutta Europa[5]. L'obiettivo era quello di evidenziare i siti in cui le concentrazioni superavano gli EQS. Questi sono rappresentati come punti rossi in Figura 1.3. La concentrazione che è stata assunta come limite degli standard ambientali per ogni pesticida è 0,1 µg/L.

I dati raccolti hanno mostrato che il 7% dei siti totali (quindi 517 stazioni di monitoraggio) presentavano valori superiori agli standard. Delle stazioni conformi agli standard, il 60% (4596 stazioni di monitoraggio) ha presentato concentrazioni inferiori ai limiti di quantificazione (punti verdi in Figura 1.3) e il restante 33% (2556 stazioni di monitoraggio) era contaminato da almeno un pesticida, ma in concentrazioni inferiori agli EQS (punti gialli in Figura 1.3).

Va sottolineato, però, che i dati di monitoraggio per alcune zone europee risultavano mancanti o, se presenti, non sono comparabili per mancanza di uniformità analitica; di conseguenza i siti con presenza effettiva di pesticidi potrebbero essere in numero maggiore di quanto è stato riportato dallo studio. Il monitoraggio della purezza delle acque attualmente è limitato da vari fattori tra cui il costo delle analisi, il numero molto elevato e in continua crescita di sostanze da ricercare nei campioni, la difficoltà di raccogliere campioni in ogni periodo dell'anno con qualsiasi condizione meteorologica. L'obiettivo di tutta la comunità di Stati dovrebbe essere quindi quello di fornire informazioni complete e standardizzate.

Le zone maggiormente a rischio sono quelle in cui l'attività agricola è intensiva; quest'ultima è considerata la causa principale della contaminazione da pesticidi nelle acque sotterranee europee. Poiché una grande quantità di acqua potabile deriva dal sottosuolo, è necessario un maggiore impegno per preservarne la qualità.



**Figura 1.3:** Stazioni di monitoraggio di acque sotterranee europee negli anni 2010-2011. Ogni punto sulla mappa indica un sito di monitoraggio, il colore è in relazione con le concentrazioni di pesticidi rilevati: rosso per il superamento degli EQS, giallo per la presenza senza superamento dei limiti, verde per valori sotto ai limiti di quantificazione. (Immagine tratta da: [5]).

### 1.3 Principali inquinanti

Le sostanze che causano la contaminazione dei bacini idrici in Europa, e in particolare in Italia, sono in numero estremamente elevato e sono molto diverse tra loro per origine, struttura chimica e proprietà.

I principali inquinanti possono essere suddivisi in sei classi in base all'utilizzo, ovvero in base allo scopo per cui vengono prodotti e utilizzati.

I principali contaminanti sono, quindi, suddivisi in:

- Pesticidi

Rappresentano una grande varietà di sostanze utilizzate allo scopo di prevenire e limitare la crescita di animali, insetti, piante infestanti, erbacce, batteri e funghi[6]. Essi vengono utilizzati principalmente in agricoltura, ma possono essere immessi nell'ambiente anche da attività industriali, domestiche e di giardinaggio. A loro volta sono suddivisi in base allo scopo per cui vengono utilizzati in: erbicidi, insetticidi, battericidi e fungicidi.

- Prodotti industriali

La loro presenza nell'ambiente è dovuta principalmente a scarichi di acque reflue di attività industriali e domestiche. Questa classe di sostanze, infatti, comprende migliaia di composti che possono essere intermedi dell'industria chimica, detergenti, surfattanti, additivi alimentari e antiossidanti. Molti di essi sono noti per la tossicità e la capacità di danneggiare il sistema endocrino umano. Alcuni di essi causano gravi danni all'ecosistema acquatico[6].

- Metalli

I metalli sono naturalmente presenti nell'ambiente e sono utilizzati per vari scopi da millenni. L'estrazione dei metalli ha portato alla formazione di zone particolarmente inquinate, che rimangono tali anche dopo molti anni dal termine delle attività estrattive. È possibile, quindi, che le piogge dilavino i metalli dalle miniere o dalle discariche. Queste sostanze sono ampiamente utilizzate anche in molte attività industriali, per cui la contaminazione è fortemente influenzata dallo scarico di acque reflue in fiumi, laghi, etc. Essendo alcuni metalli sostanze necessarie in quantità differenti per ogni organismo, è complesso indicare dei limiti oltre i quali questi diventano pericolosi. Gli standard imposti sono valutati individualmente per ciascun metallo in modo da proteggere l'ecosistema acquatico[3].

- Prodotti farmaceutici

Sono stati rilevati in concentrazioni considerevoli nelle acque sotterranee per la prima volta nel 1992. La loro presenza è causata principalmente da smaltimento inadeguato di prodotti non utilizzati o scaduti, escrezioni umane e di animali da allevamento[6].

- Estrogeni

Derivano da acque reflue di abitazioni domestiche e comportano un grave rischio per la salute della fauna acquatica, oltre che per quella umana. Essi sono notoriamente dannosi per il sistema endocrino e possono interferire sull'attività riproduttiva degli animali[6].

- Droghe illecite

Rappresentano l'ultima classe di contaminanti emergenti rinvenuti nei campioni analizzati e hanno ricevuto un interesse crescente negli ultimi anni. Così come i prodotti farmaceutici, hanno un potente effetto farmacologico, inoltre, la loro persistenza può causare gravi danni agli organismi che popolano l'acqua[6].

Nella fase di monitoraggio delle acque superficiali e sotterranee si devono seguire degli elenchi di sostanze da ricercare. La WFD[2], infatti, propone agli Stati dell'Unione Europea un elenco indicativo dei principali inquinanti che rappresentano un pericolo per la qualità delle risorse idriche. In questo caso, i contaminati sono suddivisi per classe chimica, quindi si dovranno ricercare composti organofosforici, composti organostannici, idrocarburi persistenti, cianuri, metalli, arsenico e relativi composti, biocidi e fitosanitari e infine, sostanze cancerogene, mutagene.

Non tutte le sostanze effettivamente pericolose sono incluse nella lista di composti da monitorare a causa della mancanza di informazioni sulla loro tossicità o sull'impatto ambientale. Alcuni contaminanti sono conosciuti e utilizzati da tempo, la loro presenza

nell'ambiente è ormai radicata, ma solo recentemente sono sorti dei dubbi sulla loro pericolosità[6]. Questi composti vengono generalmente indicati come “contaminanti emergenti” o “contaminants of emerging concern” (CEC), che sono anche le sostanze su cui verte la call europea nominata prima[4]. Essi vanno a sommarsi alla lunga lista di inquinanti già sistematicamente ricercati nelle analisi delle acque rendendo la situazione potenzialmente molto più grave di quanto venga stimato.

Questo è vero in particolare per i prodotti farmaceutici; essi non sono specificatamente elencati nella lista di inquinanti principali stilata nella Direttiva, ma sono spesso presenti nelle acque, seppur in concentrazioni dell'ordine dei ng/L e µg/L. Queste sostanze sono concepite per regolare il sistema endocrino e immunitario, per cui la loro presenza nelle acque può avere effetti negativi sull'intero ecosistema. Lo studio di nuove tecniche analitiche più sensibili potrebbe condurre ad una ulteriore crescita dell'elenco delle sostanze “prioritarie” da ricercare.

### 1.3.1 Miscele

Poiché le acque monitorate non sono inquinate da una sola sostanza, ma da molte contemporaneamente, e poiché nelle direttive europee l'approccio al calcolo del rischio è ancora effettuato individualmente composto per composto, si ritiene necessaria una breve trattazione sul problema ambientale legato alle miscele di contaminanti.

Uno studio del 2016[3] ha indagato sulla varietà di sostanze contaminanti le acque superficiali europee e ha riscontrato ben 426 composti organici nelle acque di tre fiumi europei, tra cui: 173 pesticidi, 128 prodotti farmaceutici, 69 prodotti industriali e 56 composti di altra natura.

Anche i dati italiani sono preoccupanti in questo ambito. Il rapporto nazionale sui pesticidi nelle acque, effettuato dall'ISPRA[7], infatti, ha riportato che nel 9% delle acque superficiali e nel 2,5% delle acque sotterranee analizzate sono presenti più di 10 composti inquinanti (con una media di 4,7). I componenti rilevati con maggior frequenza sono miscele di erbicidi triazinici e alcuni loro metaboliti (es. terbutilazina, terbutilazina-desetil, atrazina, atrazina-desetil).

Le miscele di sostanze possono avere un effetto tossicologico additivo, indipendente o interagente. Nel primo caso, la tossicità complessiva è il risultato della somma delle concentrazioni dei singoli componenti normalizzate per le rispettive dosi di effetto. Più sostanze presentano azione indipendente quando una non influenza la tossicità dell'altra, ciò accade soprattutto se i composti hanno modalità d'azione differenti. Si ha interazione, invece, quando l'effetto combinato di due o più sostanze è più forte (sinergia) o più debole (antagonismo) di quello additivo. L'effetto tossicologico additivo è il più frequente.

Nel 2009, il Consiglio dell'Unione Europea ha sottolineato come la legislazione di molti stati membri sia ancora basata su un approccio legato al singolo composto. L'obiettivo del Consiglio era quello di informarsi su se e come le legislazioni europee stavano affrontando il rischio dell'esposizione multipla a sostanze chimiche[3]. Ad oggi, però, la normativa europea non prevede ancora una valutazione completa e integrata degli effetti cumulativi dei vari componenti di una miscela in relazione anche alle diverse vie di esposizione. Sono escluse, inoltre, dalla vigente valutazione del rischio, quelle miscele di sostanze chimiche la cui singola concentrazione è al di sotto del livello di non effetto, ma la cui azione congiunta potrebbe dar luogo ad una tossicità complessiva rilevante[7].

Poiché l'esposizione multipla può comportare un rischio maggiore di quello stimato per i singoli composti, si vuole evidenziare la necessità di tenere in considerazione questo

fenomeno nella valutazione del rischio chimico legato all'inquinamento delle risorse idriche. La Commissione dell'ISPRA[7] raccomanda di adottare un modello di additività di dose-concentrazione in via cautelativa.

### 1.3.2 Erbicidi

Gli erbicidi appartengono alla classe dei pesticidi e sono sostanze chimiche utilizzate per l'eliminazione di piante infestanti o nocive. Il loro utilizzo è volto a proteggere le colture, tuttavia, a causa dell'applicazione diretta nell'ambiente, possono determinare effetti su altri organismi[3].

Gli erbicidi possono essere classificati in vari modi. Innanzitutto, possono essere totali o selettivi a seconda che distruggano tutte o solo alcune delle erbe che crescono sulla superficie trattata. Spesso gli erbicidi si suddividono in base al momento nel quale vengono applicati nel terreno: pre-semina, pre-nascita e post-nascita. Nel primo caso vengono applicati nel terreno prima della semina (prevengono la germinazione dei semi delle erbe); nel secondo caso vengono immessi nel terreno dopo la semina, ma prima della germinazione delle varie colture; nel terzo caso vengono applicati sulle foglie delle erbe dopo il loro sviluppo e possono venire a contatto con il terreno.

Un'ulteriore classificazione proposta per gli erbicidi è basata sul diverso meccanismo d'azione di queste molecole, che è in relazione a specifici siti d'azione nelle piante. Il meccanismo d'azione di uno specifico erbicida determina il preciso danno biofisico o biochimico a livello di uno specifico sito biologico nella pianta che ne causa l'effetto fitotossico.

Di seguito verranno presentati i 7 meccanismi d'azione degli erbicidi. Si consideri che è possibile che ad una singola sostanza siano associati più siti d'azione, ma solo uno di essi è da considerarsi primario.

#### Erbicidi dipendenti dalla luce

Questi composti necessitano della luce solare per agire e a loro volta sono suddivisi in 3 sottoclassi: inibitori della fotosintesi, inibitori della produzione di pigmenti e inibitori e distruttori della membrana cellulare[8].

- Gli inibitori della fotosintesi, anche detti erbicidi fotosintetici, sono in grado di bloccare la catena di trasporto elettronico a livello delle membrane fotosintetiche, agendo sul Fotosistema I (deviando gli elettroni e generando sostanze tossiche) oppure sul Fotosistema II (bloccando il trasporto elettronico legandosi a specifici siti)[9]. Questi composti causano la clorosi nelle piante e la conseguente morte. Gli erbicidi fotosintetici comprendono sostanze con strutture chimiche diverse, per esempio amidi, triazine, piridazoni, triazinoni, uracili e uree. In seguito, ci si concentrerà sugli erbicidi fotosintetici agenti sul Fotosistema II.
- Gli erbicidi inibitori della produzione di pigmenti, invece, interferiscono con la produzione di carotenoidi, sostanze che svolgono un ruolo protettivo nella pianta contro le forme tossiche reattive dell'ossigeno[8]. Quando le radiazioni solari sono molto intense, infatti, l'energia solare supera l'energia che può essere assorbita e incanalata nel trasporto elettronico fotosintetico e viene dissipata generando specie reattive dell'ossigeno (ROS) come i singoletti di ossigeno, sostanze molto tossiche che distruggono i tessuti vegetali. I singoletti di ossigeno danno il via a reazioni di foto-ossidazione con complessi pigmento-proteina, come la clorofilla, causando la distruzione dei cloroplasti. I carotenoidi sono in grado di "smorzare" i singoletti di

ossigeno eccitati. L'erbicida inibendo la sintesi di questi pigmenti permette ai ROS di distruggere i tessuti cellulari della pianta.

- Gli erbicidi distruttori delle membrane cellulari, infine, agiscono indipendentemente dalla fotosintesi, ma necessitano di luce per svolgere la loro funzione. Inibiscono la fotoporfirinogeno ossidasi (Protox), un enzima coinvolto nella conversione luce dipendente della protoporfirina in porfirina, la quale produce clorofilla. L'inibizione dell'enzima blocca la serie di reazioni e provoca l'accumulo dell'intermedio protoporfirina, una sostanza fitotossica per la pianta. L'accumulo di protoporfirina, infatti, danneggia velocemente i lipidi della membrana, causandone la rottura con conseguente essiccazione e disintegrazione della cellula e del tessuto vegetale.

#### *Erbicidi inibitori della biosintesi di acidi grassi*

Molti erbicidi di contatto attualmente usati agiscono modificando la struttura della membrana attraverso effetti sulla biosintesi di lipidi o la produzione di radicali tossici[8].

#### *Erbicidi inibitori della crescita cellulare*

Questa categoria di erbicidi inibisce la divisione cellulare principalmente in due modi: inibendo l'assemblaggio dei microtubuli, che sorreggono la struttura della cellula in fase di divisione, o inibendo la sintesi della parete cellulare. Questo meccanismo d'azione è generalmente secondario, ovvero erbicidi che agiscono principalmente in altri modi possono avere anche questo effetto sulle piante bersaglio[8].

#### *Erbicidi ad azione simile all'auxina - Regolatori della crescita*

Ci sono almeno sei classi di ormoni che regolano la crescita delle piante: auxine, citochinine, gibberelline, etilene, acido abscissico e poliammine. Gli ormoni delle piante sono sostanze chimiche che vengono prodotte in determinati punti della pianta e agiscono, in basse concentrazioni, in altri punti. Questi erbicidi influenzano la sintesi o l'azione degli ormoni della crescita. Non esistono erbicidi che hanno questo come meccanismo d'azione primario, questo meccanismo è sempre secondario[8].

#### *Erbicidi inibitori della biosintesi di amminoacidi*

La biosintesi degli amminoacidi è il punto di partenza per la sintesi delle proteine nelle piante. Poiché le piante sintetizzano ogni amminoacido essenziale, in linea teorica, bloccando la sintesi amminoacidica si ottiene la loro morte. Gli erbicidi appartenenti a questa classe sono suddivisi in tre sottoclassi, ognuna delle quali inibisce un enzima coinvolto nella sintesi di determinati amminoacidi[8].

#### *Erbicidi inibitori della respirazione*

Le piante ottengono energia trasformando l'energia solare in energia chimica accumulata in carboidrati attraverso la fotosintesi. La respirazione è il processo di rimozione del potere riducente dai carboidrati, dai grassi o dalle proteine e il suo trasferimento all'ossigeno con l'intrappolamento concomitante di energia nell'ATP. Gli erbicidi che inibiscono la respirazione cellulare non sono attualmente utilizzati e sono interessanti solo da un punto di vista storico[8].

#### *Erbicidi con meccanismo d'azione ignoto*

Il meccanismo d'azione non è noto per molti erbicidi inorganici, questi ora non sono più utilizzati poiché sono stati sostituiti da quelli organici. Gli studi su queste sostanze sono stati effettuati molti anni fa con tecniche analitiche meno sofisticate rispetto a quelle moderne, molto spesso non è stato identificato il meccanismo d'azione. Poiché queste

sostanze non sono più utilizzate, non esistono studi recenti che possano indagare con mezzi più efficienti il sito d'azione[8].

#### **1.4 Inquinamento da erbicidi delle risorse idriche in Italia**

In Italia la qualità delle acque destinate al consumo umano è disciplinata dal Decreto Legislativo del 2 febbraio 2001 che armonizza la direttiva europea 98/83/CE[10]. La salubrità e la “pulizia” delle acque destinate ad uso umano devono essere garantite al fine di proteggere la salute umana dagli effetti indesiderati derivanti da possibile contaminazione. Il decreto intende con “acque destinate al consumo umano” le acque destinate ad uso potabile e quelle utilizzate dalle imprese alimentari per la fabbricazione, il trattamento, la conservazione o l'immissione sul mercato di prodotti o di sostanze destinate al consumo umano. Queste acque devono rispettare determinate caratteristiche imposte dalla legge: devono essere salubri e pulite; non devono contenere microrganismi, parassiti o altre sostanze in concentrazioni tali da nuocere alla salute umana; devono soddisfare dei parametri minimi di qualità. Questi sono in generale dei valori massimi di concentrazione ammissibile. La contaminazione da erbicidi dei bacini idrici deve rispettare due parametri: uno relativo alla concentrazione del singolo componente e uno relativo alla concentrazione totale data dalla somma delle concentrazioni dei singoli erbicidi. Per la concentrazione della singola sostanza il valore massimo tollerato è 0,10 µg/L, mentre il parametro per la concentrazione totale è 0,50 µg/L.

In generale, i limiti fissati devono essere rispettati nel punto di erogazione e utilizzo. Più precisamente, le acque che vengono fornite attraverso rete idrica o cisterna devono rispettare i parametri nel punto di fuoriuscita dal rubinetto; le acque imbottigliate devono rispettare i parametri nel punto in cui sono immesse nei contenitori; le acque destinate all'industria alimentare devono soddisfare i parametri nel punto in cui sono utilizzate nell'impresa.

Il Decreto stabilisce, inoltre, che devono essere effettuati dei controlli per garantire che le acque soddisfino i requisiti di qualità. Tali controlli sono sia interni, ovvero condotti dal gestore del servizio idrico, che esterni, ossia realizzati dall'azienda unità locale territorialmente competente. Il Ministero della Sanità, poi, provvede all'elaborazione e alla pubblicazione di una relazione sulla qualità delle acque destinate al consumo umano al fine di informare i consumatori. In seguito, si farà spesso riferimento al rapporto dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) riferito agli anni 2015-2016[7].

L'acqua destinata al consumo umano viene prelevata da diverse fonti; in generale è possibile distinguere in risorse derivanti da acque sotterranee e da acque superficiali. I dati ISTAT riferiti all'anno 2015[11] riportano il volume di acqua potabile prelevata da diverse fonti: sorgenti, pozzi, corsi d'acqua, laghi, bacini artificiali e acque marine. Si considerano acque sotterranee quelle provenienti da sorgenti e pozzi, mentre le altre fonti sono acque superficiali. Secondo l'ISTAT, in un anno in Italia sono stati prelevati 9.487.692 migliaia di metri cubi di acqua destinata ad uso umano, ovvero circa 9 miliardi. Di questi, circa 8 miliardi di metri cubi (l'84,3%) provengono da acque sotterranee, che quindi rappresentano una risorsa fondamentale di acqua potabile. In Appendice A si riporta la tabella pubblicata dall'ISTAT da cui sono stati estrapolati i dati presentati. Nei paragrafi successivi si analizzerà lo stato di contaminazione da erbicidi delle acque superficiali e sotterranee in Italia, come rilevato dall'ISPRA nel rapporto biennale relativo agli anni 2015 e 2016[7]. Questo rapporto si basa sui dati raccolti dalle Regioni riguardanti i risultati del monitoraggio delle acque interne superficiali e sotterranee nei due anni in esame. L'elaborazione di tali dati da parte dell'ISPRA ha l'obiettivo di monitorare



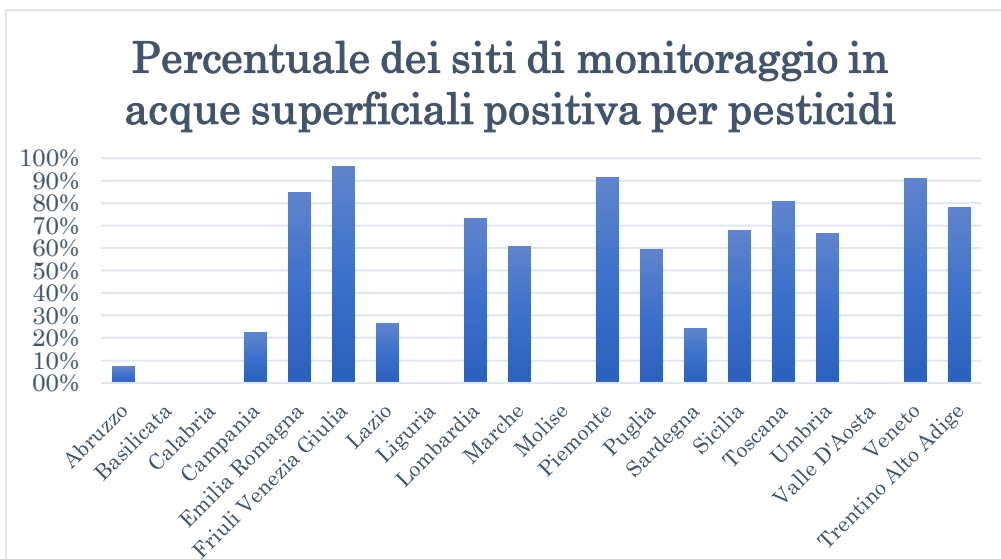
l'eventuale contaminazione e verificare l'efficacia dei provvedimenti presi a salvaguardia dell'ambiente acquatico. Lo studio ha analizzato 4.250 punti di monitoraggio nel 2015 e 4.683 punti di monitoraggio nel 2016. In totale i campionamenti effettuati nel biennio sono stati 35.353 con 1.029.903 determinazioni analitiche. I risultati delle analisi hanno identificato 259 diverse sostanze contaminanti, molte delle quali appartenenti alla classe degli erbicidi.

Alcune Regioni, però, non hanno fornito i dati di monitoraggio, quindi la contaminazione delle risorse idriche che risulta dall'analisi dei dati è in realtà solo una stima della contaminazione effettiva. I dati riguardanti le Regioni del Centro-Sud sono in generale poco rappresentativi della situazione reale sia per numero di siti di monitoraggio, sia per il numero di sostanze ricercate nei campioni. Emerge quindi la necessità di migliorare le indagini estendendo la copertura territoriale con più siti di monitoraggio, in particolare nelle zone critiche, e aumentando il numero di pesticidi ricercati nei campioni, basandosi anche sulle sostanze più utilizzate nel territorio.

#### **1.4.1 Inquinamento da erbicidi delle acque superficiali in Italia**

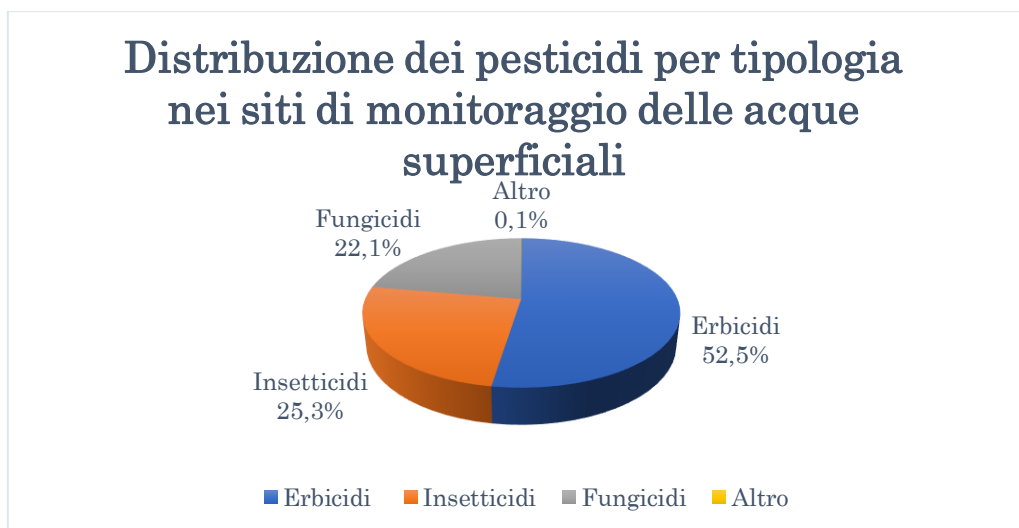
Per comprendere il livello di contaminazione delle risorse idriche superficiali in Italia, è stata analizzata innanzitutto la presenza in generale di pesticidi, per poi concentrarsi sugli erbicidi. Dallo studio condotto dall'ISPRA è emerso che nel 67% delle acque superficiali italiane sono presenti pesticidi, di questa quota circa il 50% è contaminata per via di erbicidi e relativi metaboliti. Per poter determinare la presenza di una sostanza in acqua, la sua concentrazione deve essere superiore al limite di quantificazione, ovvero il valore minimo percepito dallo strumento di analisi. La presenza della sostanza in acqua, quando rilevata, non in tutti i casi ha superato i limiti di concentrazione imposti dalla legge. La sua presenza quindi, per quanto rappresenti una contaminazione della risorsa idrica, è accettabile da un punto di vista legislativo.

Analizzando i siti risultati positivi alla presenza di pesticidi, è stato possibile individuare le aree in cui l'acqua superficiale è più frequentemente inquinata (Figura 1.4). Suddividendo il territorio italiano in Regioni, si è determinato in quali la frazione di siti di monitoraggio inquinati su numero totale di siti di monitoraggio nella Regione sia risultata elevata. Le zone con percentuali di contaminazione più alta sono risultate Veneto, Friuli-Venezia-Giulia e Piemonte con valori che superano il 90%. Seguono Emilia-Romagna, Toscana, Lombardia e Trentino Alto Adige con percentuale di siti positivi superiore al 70%. La Val D'Aosta, il Molise e la Basilicata, invece, non hanno registrato in nessun sito di monitoraggio la presenza di pesticidi. In Liguria e Calabria non è stato monitorato nessun sito di acqua superficiale, per cui la contaminazione nulla in Figura 4 corrisponde ad un'assenza di dati. Se ne può dedurre che la contaminazione da pesticidi è più frequente nelle aree in cui l'agricoltura è un'attività particolarmente diffusa e spesso è intensiva.



**Figura 1.4:** Percentuale di siti di monitoraggio in acque superficiali in cui è stata rilevata la presenza di pesticidi nelle Regioni italiane nel 2016. (Immagine realizzata elaborando i dati riportati in [7]).

I pesticidi sono utilizzati per eliminare diversi tipi di organismi infestanti quali erbacce, funghi, insetti, o batteri. Lo scopo per cui vengono utilizzati i pesticidi fornisce il criterio per una suddivisione in classi funzionali. Ogni classe include le sostanze antiparassitarie e i metaboliti che derivano dalla loro degradazione. Il report dell'ISPRA mostra i siti di monitoraggio in cui è stata rilevata la presenza di pesticidi sulla base della classe funzionale. Più della metà delle contaminazioni (52,5%) è causata dalla presenza di erbicidi e metaboliti (Figura 1.5). Precisamente il 38,6% delle acque superficiali registra la presenza di erbicidi e il 13,9% dei relativi metaboliti.



**Figura 1.5:** Percentuale di siti di monitoraggio di acque superficiali in cui è stata rilevata la presenza di pesticidi suddivisi per classe funzionale. Dati relativi all'anno 2016 per i siti di monitoraggio delle acque superficiali italiane. (Immagine realizzata elaborando i dati riportati in [7]).

Degli erbicidi presenti nelle acque superficiali italiane, alcuni sono stati rilevati con maggiore frequenza. In ogni sito di monitoraggio sono stati ricercati solo un numero

limitato di composti e non sempre in tutti i siti di monitoraggio sul territorio italiano si sono ricercati gli stessi erbicidi. In Figura 1.6 è mostrata la distribuzione percentuale di siti in cui è stata rilevata la presenza di specifici erbicidi. Si osserva che gli erbicidi più presenti nelle acque superficiali sono AMPA, metolaclor, glifosato e terbutilazina. Quest'ultima è presente nel 45,4% dei siti in cui è stata ricercata, mentre il suo metabolita, la terbutilazina-desetil è stato trovato nel 42,9% dei casi. Non tutte le sostanze sono state ricercate in ogni sito di monitoraggio, per cui le percentuali sono riferite al totale dei siti in cui è stato cercato quel determinato erbicida.



**Figura 1.6:** Percentuale dei siti di monitoraggio di acque superficiali in cui è stata rilevata la presenza di erbicidi specifici. Dati del 2016 su tutto il territorio italiano per le acque superficiali. (Immagine realizzata elaborando dati riportati in [7]).

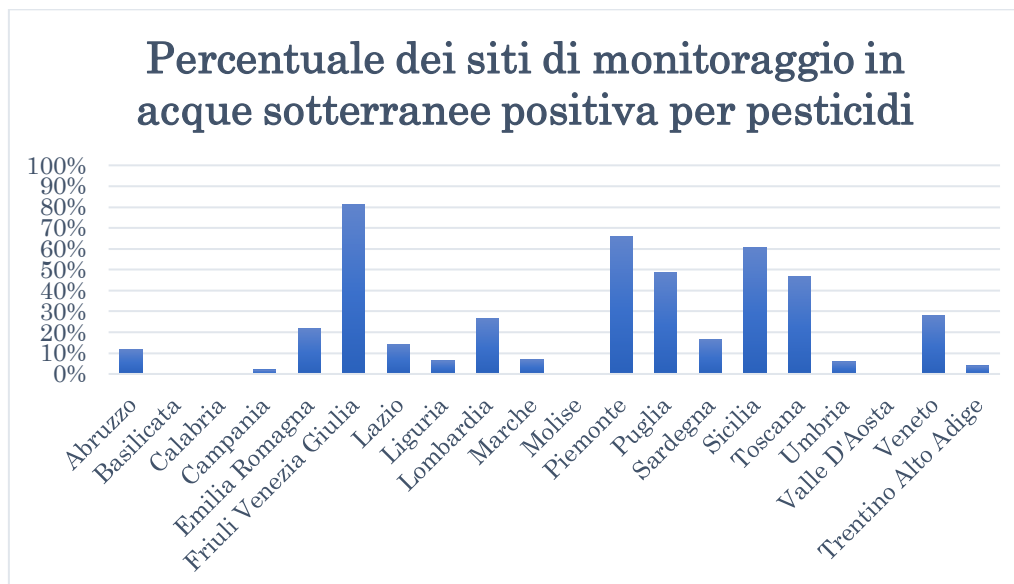
Alcuni di questi erbicidi rintracciati nel monitoraggio hanno superato le concentrazioni massime imposte dalla legge. La loro presenza in queste quantità comporta un pericolo per la salute umana e per l'ecosistema acquatico. La terbutilazina supera gli EQS in 5 siti sui 1208 in cui è stata cercata, quindi solo lo 0,4%. Più preoccupanti sono i dati relativi ad AMPA e glifosato che superano i limiti di concentrazione rispettivamente nel 47,8% e 24,5% dei siti.

#### 1.4.2 Inquinamento da erbicidi delle acque sotterranee in Italia

In precedenza, si è mostrato come le acque sotterranee siano una fonte fondamentale di acqua per il consumo umano in Italia. Questi bacini in particolare dovrebbero essere protetti dalla contaminazione da sostanze tossiche e potenzialmente dannose per la salute umana, come gli erbicidi.

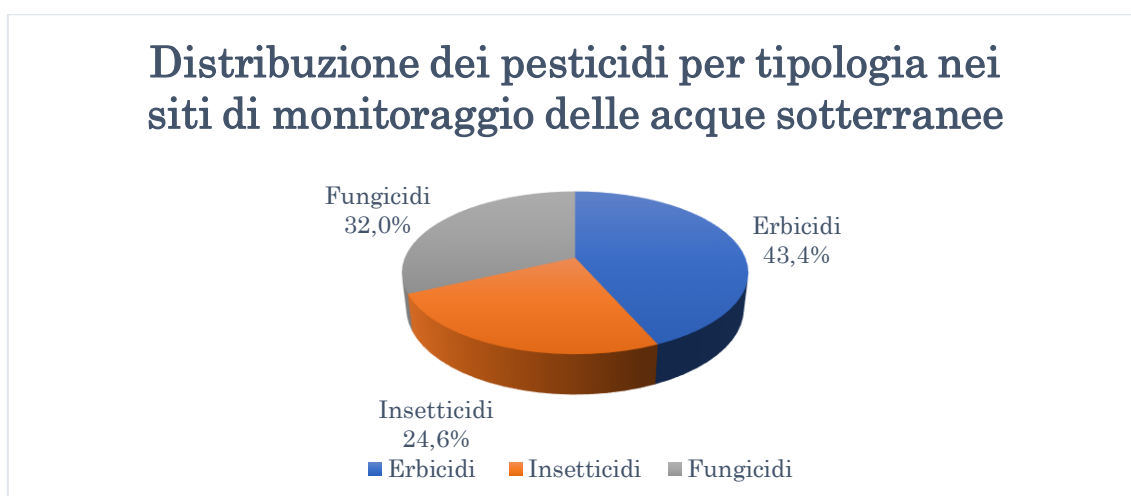
Elaborando i dati pubblicati dall'ISPRA, la percentuale di siti di monitoraggio in cui è stata rilevata la presenza di pesticidi nelle acque sotterranee è risultata pari al 34%, le percentuali per ogni Regione sono riportate in Figura 1.7. Nel complesso, la presenza di sostanze indesiderate nelle acque sotterranee è risultata inferiore rispetto alle acque superficiali. Mentre per le acque superficiali, molte Regioni superavano il 70% di siti di monitoraggio in cui erano stati trovati pesticidi (Figura 1.4), per le acque sotterranee solo il Friuli-Venezia-Giulia supera questo valore. Le altre Regioni in cui nella maggior parte dei siti di monitoraggio sono presenti pesticidi sono Piemonte (con il 65,9% di siti positivi

alla presenza di pesticidi) e Sicilia (con il 60,4% di siti positivi alla presenza di pesticidi). Basilicata, Molise e Val D'Aosta non hanno rilevato nessun pesticida nei siti di monitoraggio delle acque sotterranee. Nuovamente, non sono pervenuti i dati di monitoraggio della Calabria.



**Figura 1.7:** Percentuale di siti di monitoraggio in acque sotterranee in cui è stata rilevata la presenza di pesticidi nel 2016 nelle Regioni italiane. (Immagine realizzata elaborando i dati riportati in [7]).

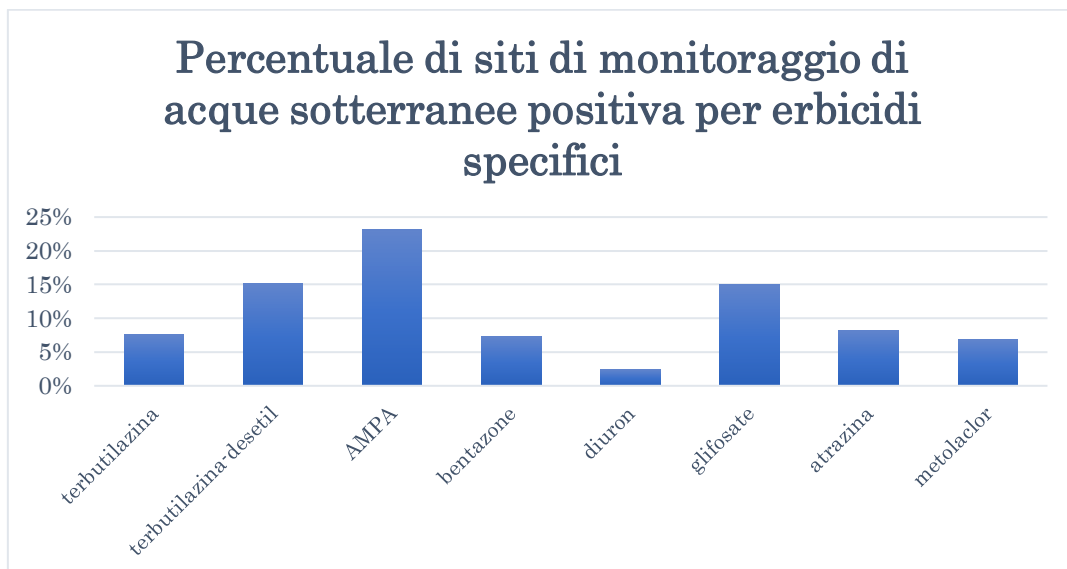
I pesticidi ritrovati nei campioni di acque sotterranee sono stati erbicidi, insetticidi e fungicidi, come mostrato in Figura 1.8. Analogamente alle acque superficiali, nelle acque sotterranee gli erbicidi sono risultati le sostanze presenti con maggiore frequenza. Nel 43,4% dei siti contaminati da pesticidi è stata rilevata la presenza di erbicidi. Questo valore comprende sia le molecole erbicide che i metaboliti derivati da esse, con percentuali rispettivamente del 28,1% e 15,3%.



**Figura 1.8:** Percentuale dei siti di monitoraggio di acque sotterranee in cui è stata rilevata la presenza di pesticidi suddivisi per classe funzionale. Dati relativi all'anno 2016 per i siti di monitoraggio delle acque sotterranee italiane. (Immagine realizzata elaborando i dati riportati in [7]).

Infine, dall'elaborazione dei dati riguardanti i siti in cui sono stati rilevati specifici erbicidi, sono stati identificati quelli con maggiore frequenza nei siti di monitoraggio delle acque sotterranee. Gli erbicidi AMPA e glifosato sono stati trovati con maggiore frequenza nel sito di monitoraggio in cui sono stati cercati, come mostrato in Figura 1.9. La terbutilazina-desetil è stata rilevata con una percentuale del 15,2%, mentre la terbutilazina con una percentuale del 7,7%. Essendo la frequenza di ritrovamento del metabolita circa il doppio di quella dell'erbicida, si può supporre che la terbutilazina vada incontro a processi di degradazione nel terreno, con conseguente percolazione nelle acque sotterranee del metabolita.

Per quanto riguarda i superamenti degli EQS nelle acque sotterranee, l'elaborazione dei dati ha mostrato che il fenomeno è meno frequente rispetto alle acque superficiali. AMPA e glifosato non rispettano gli EQS rispettivamente nel 4,8% e 5,8% dei siti in cui sono stati cercati. I valori percentuali di superamento di tutti gli altri erbicidi sono più bassi e spesso inferiori all'1%.



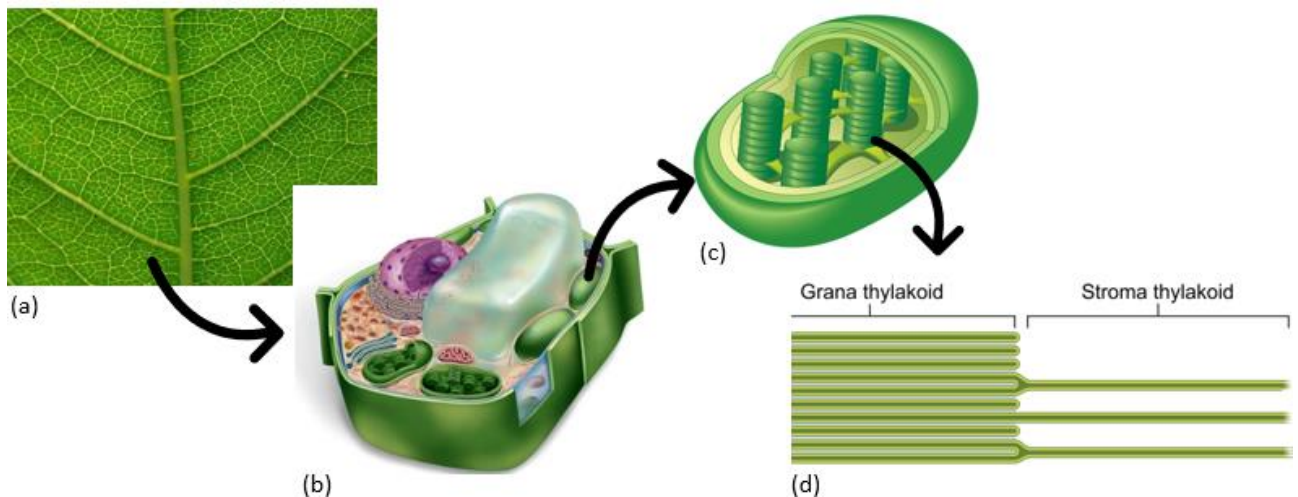
**Figura 1.9:** Percentuale dei siti di monitoraggio di acque sotterranee in cui è stata rilevata la presenza di erbicidi specifici. Dati del 2016 su tutto il territorio italiano per le acque sotterranee. (Immagine realizzata elaborando dati riportati in [7]).



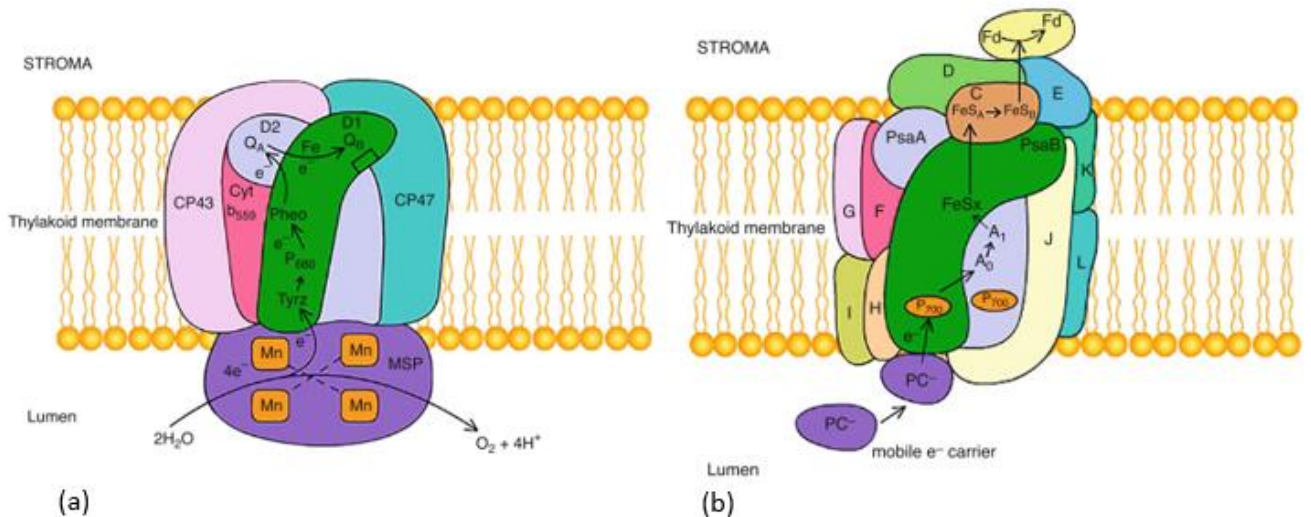
## 2. ERBICIDI FOTOSINTETICI

Gli erbicidi fotosintetici bloccano il processo di fotosintesi che permette alle piante di catturare l'energia solare e trasformarla in energia chimica. Durante la fotosintesi l'energia dei fotoni trasferisce elettroni dall'acqua all'anidride carbonica per produrre carboidrati e ossigeno molecolare. Le reazioni di fotosintesi avvengono nelle foglie del vegetale (Figura 2.1) e per questo motivo gli erbicidi fotosintetici vengono utilizzati solo in fase post-emergenza, ossia quando la pianta indesiderata è già nata.

Nella pianta il processo di fotosintesi avviene all'interno di organelli presenti nella cellula eucariotica vegetale chiamati cloroplasti. I cloroplasti sono delimitati da una doppia membrana che racchiude due regioni: le membrane fotosintetiche dette tilacoidi e il comparto acquoso detto stroma. I tilacoidi si distinguono in due domini: i grana, costituiti da un insieme di membrane a forma di disco impilate, e le lamelle stromatiche, ossia singole membrane che interconnettono i grana (Figura 2.1). È proprio nei tilacoidi che avviene il trasporto elettronico fotosintetico. All'interno dei tilacoidi sono presenti due complessi enzimatici in cui avvengono gli step fondamentali del trasporto elettronico: Fotosistema II (PSII) e Fotosistema I (PSI), i cui componenti proteici principali sono schematizzati in Figura 2.2. Il PSII si trova generalmente, ma non esclusivamente, nei grana, mentre il PSI è presente solo nelle lamelle stromatiche[12].

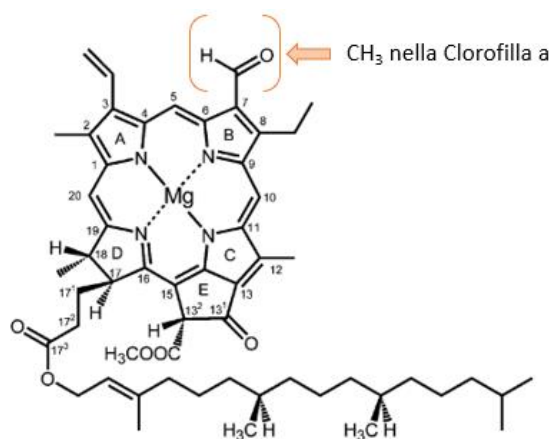


**Figura 2.1:** Rappresentazione schematica della foglia (a), cellula vegetale (b), cloroplasto (c) e domini dei tilacoidi (d). (Immagini rielaborate da [13]).



**Figura 2.2:** Rappresentazione schematica delle proteine che compongono i complessi enzimatici PSII (a) e PSI (b). (Immagine rielaborata da [14]).

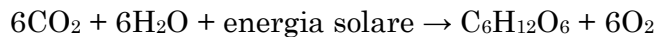
L'apparato fotosintetico si compone, oltre che di proteine, anche di pigmenti legati alle proteine, cioè le molecole che conferiscono colore alle piante e che sono in grado di intrappolare la luce solare assorbendo fotoni a diverse lunghezze d'onda. Nelle piante esistono due gruppi di pigmenti: le clorofille (conferiscono il colore verde, assorbono radiazioni nelle lunghezze d'onda di blu e rosso e sono distinte in clorofilla *a* e *b*), i carotenoidi (conferiscono colore rosso-arancio e assorbono radiazioni nel campo del verde-blu, si distinguono in caroteni e xantofille). Le clorofille sono i principali fotorecettori della fotosintesi, esse presentano una struttura con cinque anelli eterociclici in cui si alternano singoli e doppi legami (Fig. 2.3), questa struttura è la responsabile dell'assorbimento di radiazioni nella regione della luce visibile. I cinque anelli eterociclici sono coordinati ad uno ione  $Mg^{2+}$  formando una struttura simile all'anello porfirinico dell'emoglobina, nel quale però si ha lo ione  $Fe^{2+}$  [14].



**Figura 2.3:** Struttura della clorofilla *b*, la clorofilla *a* presenta un gruppo metilico in sostituzione del gruppo aldeidico in posizione C7 sull'anello B. (Immagine rielaborata da [15]).



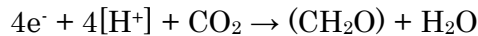
La fotosintesi è una reazione di ossido-riduzione in cui l'ossidazione dell'acqua e la riduzione della CO<sub>2</sub> portano alla produzione di ossigeno molecolare e carboidrati secondo l'equazione:



Il processo di fotosintesi si compone di due stadi: fase luminosa e fase oscura. Durante il primo stadio avviene la fotolisi dell'acqua schematizzata dalla reazione:



Durante il secondo stadio, gli elettroni rilasciati dall'acqua riducono la CO<sub>2</sub> attraverso la reazione di assimilazione della CO<sub>2</sub>:



All'interno del tilacoide avvengono le reazioni della fotosintesi dipendenti dalla luce. L'energia luminosa viene assorbita da una molecola di pigmento che quindi passa al suo stato eccitato. Il fotone, colpendo una molecola di clorofilla *a* nel centro di reazione dei fotosistemi, fa sì che questa rilasci un elettrone che poi viene trasferito attraverso la catena di trasporto elettronico sino al NADP<sup>+</sup> per generare NADPH. La "buca" elettronica generata nella clorofilla *a* del Fotosistema II è colmata da un elettrone donato dall'acqua, ne consegue la produzione di ossigeno molecolare dalla fotolisi dell'acqua [I].

Il percorso del trasporto elettronico dall'acqua al NADP<sup>+</sup> è rappresentato in ogni step dallo schema Z (Fig. 2.4). All'interno dello schema i diversi trasportatori elettronici sono posizionati lungo una scala energetica, ad indicare che quelli che si trovano più in alto sono in grado di cedere elettroni a quelli che invece si trovano più in basso. Più in alto si trova una molecola nello schema Z e maggiore è la sua tendenza a cedere elettroni [II].

Il primo passo della fotosintesi avviene nell'enzima Fotosistema II e consiste nell'eccitazione dovuta all'assorbimento di energia solare della clorofilla *a* nel centro di reazione P680, che diventa P680\*. Anche nel Fotosistema I la luce solare permette l'eccitazione nel centro di reazione detto P700, che diventa P700\*.

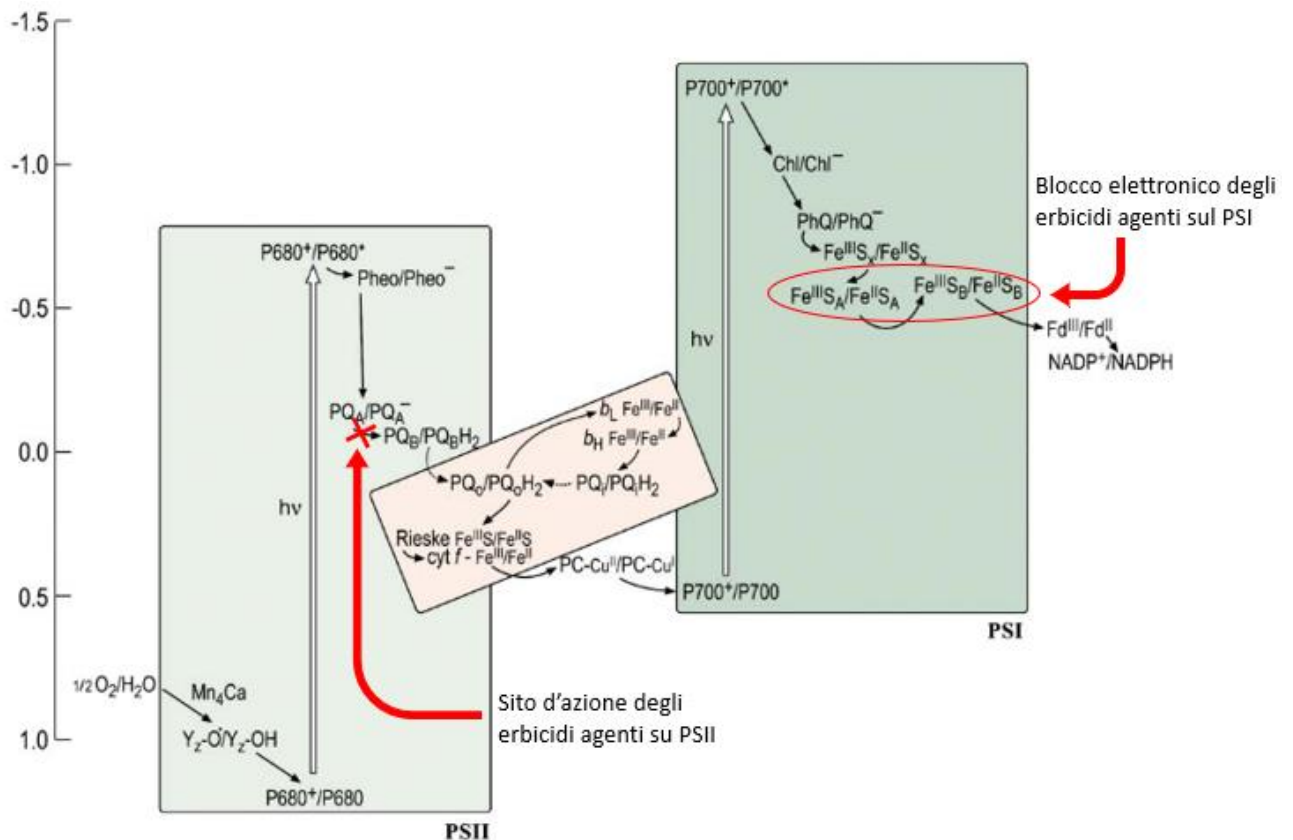
Successivamente, P680\* cede un elettrone alla molecola di feofitina (Pheo), si ottiene un P680 ossidato (P680<sup>+</sup>) e una Pheo ridotta (Pheo<sup>-</sup>). Una reazione analoga avviene nel Fotosistema I con P700\* che cede un elettrone ad un'altra molecola di clorofilla (indicata con Chl). Questi step di separazione di carica e rilascio di un elettrone sono fondamentali perché è qui che l'energia solare è convertita in energia chimica.

Pheo<sup>-</sup> cede l'elettrone ricevuto al plastochinone A (PQ<sub>A</sub>), che a sua volta lo cede al plastochinone B (PQ<sub>B</sub>).

Quando PQ<sub>B</sub> ha ricevuto due elettroni da PQ<sub>A</sub>, riceve anche due protoni dallo stroma ed è quindi pronto a staccarsi dal sito di legame B nel complesso del Fotosistema II e diffondere attraverso la membrana del tilacoide fino al complesso citocromo *f* (cyt *f*). Qui gli elettroni sono passati ad una proteina ferro-zolfo (FeS) e poi alla proteina plastocianina (PC Cu) che infine trasporta un elettrone al P700<sup>+</sup> ossidato, che si trova nel Fotosistema I.

La lacuna elettronica generata sul P680<sup>+</sup> viene invece colmata con l'ossidazione di una molecola d'acqua.

Nell'enzima Fotosistema I l'elettrone ceduto da P700\* giunge, attraverso vari step, al NADP<sup>+</sup> che viene ridotto a NADPH [III].



**Figura 2.4:** Schema Z della catena di trasporto degli elettroni nell'apparato fotosintetico. Le reazioni rappresentate all'interno dei riquadri verdi avvengono rispettivamente nel Fotosistema II (PSII) e nel Fotosistema I (PSI). ( Immagine tratta da: [15]).

Gli erbicidi fotosintetici si inseriscono in questo complesso schema reattivo bloccando il trasporto degli elettroni. Gli erbicidi possono agire sul Fotosistema I comportandosi come “ladri” di elettroni nella catena di trasporto, oppure possono agire sul Fotosistema II legandosi al sito di legame B ( $Q_B$ ) bloccando il trasporto al plastochinone.

La morte delle piante in seguito all'utilizzo di queste sostanze avviene per clorosi (ingiallimento delle foglie dovuto a graduale scomparsa di clorofilla) o necrosi (processo di morte cellulare o tissutale), entrambe derivano da una serie di eventi sequenziali. Quando la catena di trasporto degli elettroni viene bloccata, infatti, si ha un eccesso di energia che viene trasferita a clorofilla e carotenoidi, questi vengono distrutti da un processo di foto-ossidazione e il risultato è la clorosi. L'eccesso di energia non mitigato dai carotenoidi provoca la formazione di tripletti di clorofilla che, a loro volta, generano radicali ossigeno in grado di distruggere le membrane lipidiche cellulari; si verifica, quindi, la necrosi.

Il modo in cui l'erbicida giunge al sito d'azione, ovviamente, dipende dal modo di applicazione. Se applicato sulle foglie, si muove attraverso le cuticole nel sottostante parenchima fino a raggiungere il cloroplasto nella cellula; se disperso nel terreno, si muove dalle radici alle foglie attraverso lo xilema per giungere nel cloroplasto[9].

## 2.1 Principali erbicidi agenti sul Fotosistema II

Gli erbicidi agenti sul Fotosistema II appartengono a diverse famiglie di composti schematizzati in Tabella 2.1.

### Fenil-carbamati

Gli erbicidi di questa famiglia sono due: desmidipham e phenmedipham; vengono anche indicati come bis-carbamati. La struttura comune presenta due gruppi fenilici legati a due gruppi di acido carbamico[9]. Essi sono utilizzati nel controllo postemergenza, ovvero dopo che l'erba infestante è già germogliata, soprattutto contro piante a foglia larga. Le varietà più resistenti degradano l'erbicida, mentre quelle più sensibili non riescono[8].

### Piridazinoni

L'erbicida pyramin appartiene a questa classe. La struttura comune è formata da un anello fenilico legato in posizione 2 ad un anello piridazinone[9]. Anche questi erbicidi sono usati per piante infestanti a foglia larga e persistono nel terreno dalle 4 alle 8 settimane[8].

### Triazine

Molti erbicidi appartengono a questa classe; un esempio interessante è l'atrazina. Questa molecola è stata ampiamente utilizzata per molti anni per poi essere proibita a partire dal 1992 in Italia e altri stati dell'Unione Europea, in quanto altamente tossica. Anche la terbutilazina appartiene a questo gruppo di composti, precisamente si tratta di una clorotriazina. La struttura comune è un anello eterociclico in cui 3 N e 3 C sono alternati[9]. Le triazine sono utilizzate per il controllo delle piante indesiderate a lungo termine poiché sono persistenti nel terreno[8].

### Triazinoni

La metribuzina fa parte dei triazinoni che sono costituiti da un anello eterociclico con 3 N e 3 C (come le triazine), ma disposti in maniera asimmetrica[9]. Sono usati in forma di spray nelle colture di patate e soya. In generale sono meno persistenti nel terreno rispetto alle triazine[8].

### Uracili

Esistono due erbicidi con la struttura dell'uracile: bromacil e terbacil, essi sono costituiti da un anello a 6 atomi di cui 2 sono di azoto[9]. Queste molecole sono usate come sterilizzanti del terreno, sono infatti fitotossici per un gran numero di piante erbacee e possono persistere nel terreno fino ad un anno[8].

### Ammidi

Propanil è l'erbicida più utilizzato appartenente a questa classe, presenta il gruppo ammidico legato ad un anello benzenico. Le ammidi agiscono sul Fotosistema II, ma hanno anche meccanismi d'azione secondari. Sono applicati quasi unicamente sulle foglie perché nel terreno hanno una bassissima persistenza (1-3 giorni)[8].

### Uree

Il diuron appartiene a questa classe ed è molto utilizzato, non solo come erbicida, ma anche come molecola di controllo nelle analisi fisiologiche sui vegetali. La struttura di questi composti è quella dell'urea dove gli atomi di idrogeno sono stati sostituiti con altri gruppi[9]. Sono applicati principalmente sul terreno e la persistenza varia da 2 a 6 mesi[8].

### Benzotiodiazoli

Il bentazone è l'unico erbicida in commercio appartenente a questo gruppo. La molecola è composta da un anello aromatico e un anello eterociclico in cui è presente lo zolfo. Questo composto agisce sul Fotosistema II, ma si lega in un sito differente rispetto a tutte le

molecole descritte in precedenza. L'applicazione è sempre sulle foglie per la scarsa capacità di trasferimento nelle radici[8].

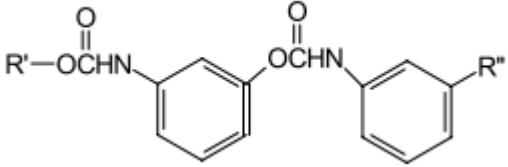
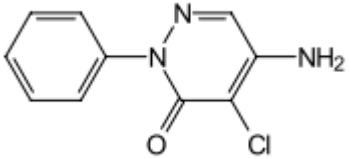
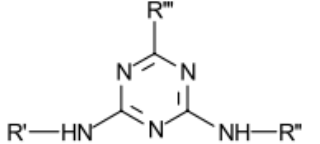
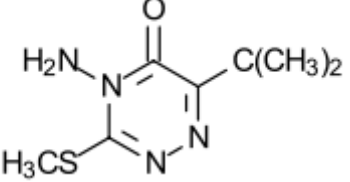
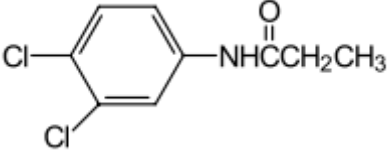
### Nitrili

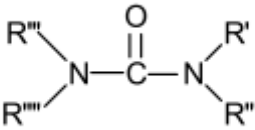
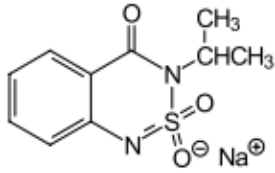
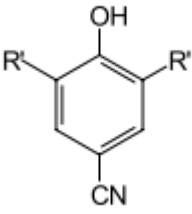
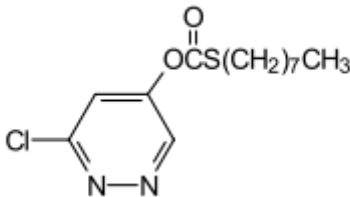
Un esempio di erbicida della classe dei nitrili è buctril. La struttura base prevede un triplo legame tra N e C, a sua volta legato all'anello benzenico. Questi composti sono stati sviluppati per distruggere le piante resistenti agli altri erbicidi. L'assorbimento veloce nel terreno ne impedisce l'applicazione sulle radici[8].

### Fenil-piridazine

Esiste solamente un erbicida in questa classe, il piridato. Esso è formato da un anello eterociclico con 2 atomi di N. È un erbicida assorbito dal terreno e applicato sulle foglie; la sua persistenza nel suolo è di circa una settimana[8].

**Tabella 2.1:** Esempio di struttura molecolare per ogni classe di erbicidi agenti sul Fotosistema II. (Immagini tratte e rielaborate da: [9]).

Fenil-carbamati	
Piridazinoni (Pyrazon)	
Triazine	
Triazinoni (Metribuzina)	
Ammidi (Propanil)	

Uree	
Benzotiadiazoli (Bentazon)	
Nitrili	
Fenil-piridazine (Piridato)	

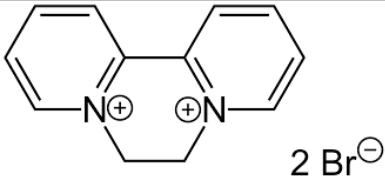
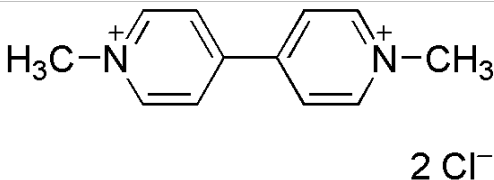
## 2.2 Principali erbicidi agenti sul Fotosistema I

I principali erbicidi agenti sul Fotosistema I appartengono alla classe dei biperidili, ovvero molecole formate da due anelli eterociclici a sei atomi di cui uno è un azoto. I composti utilizzati in agricoltura sono diquat e paraquat, le cui strutture sono riportate in Tabella 2.2. Essi sono completamente dissociati in acqua e la loro azione erbicida è dovuta allo ione positivo biperidinico. Il meccanismo d'azione dei due erbicidi è identico, lo ione bivalente accetta un elettrone da PSI formando un radicale. I radicali tendono ad assumere una conformazione coplanare e formare strutture coniugate in modo da stabilizzare l'elettrone spaiato. La stabilità di queste strutture è essenziale per ridurre l'ossigeno molecolare e generare specie molto reattive che distruggono la membrana cellulare. Probabilmente il donatore di elettroni è il centro ferro-zolfo del PSI ( $\text{Fe}^{\text{III}}\text{S}_A$  e  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{S}_B$  in Figura 2.4). Il potenziale redox dello ione biperidinico, infatti, gli consente di accettare un elettrone dal centro ferro-zolfo[12]. Si forma così un radicale libero che reagisce con l'ossigeno molecolare generando specie reattive dell'ossigeno (ROS) come radicali superossido di ossigeno ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), perossidi d'idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), gruppi idrossilici ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) e singoletti di ossigeno ( $^1\text{O}_2$ ). Ognuna delle sostanze prodotte danneggia la membrana cellulare, il risultato è la necrosi della pianta nel giro di poche ore o al massimo un giorno.

Questi erbicidi vengono applicati sulle foglie e, poiché sono soggetti ad una traslocazione scarsissima da una cellula all'altra, è necessario ricoprire completamente tutte le foglie durante l'applicazione. Sono erbicidi non selettivi e hanno effetti su tutti i vegetali, ma non essendo traslocati sistemicamente, distruggono solo le foglie su cui sono stati applicati. Non vengono utilizzati sulle radici perché sono assorbiti molto velocemente dal terreno.

Paraquat è più efficiente su piante erbacee, mentre diquat è preferibile contro piante a foglia larga[8].

**Tabella 2.2:** Esempi di struttura molecolare per ogni classe di erbicidi agenti sul Fotosistema I. (Immagini tratte e rielaborate da [8]).

Diquat	
Paraquat	

### 2.3 Utilizzo di erbicidi fotosintetici nelle principali colture italiane

Gli erbicidi fotosintetici comprendono un gran numero di composti che vengono utilizzati in misura diversa in base all'efficacia su una specifica coltura. In Italia le principali colture sono riso, mais, cereali, limoni, fiori, vite, olivo e tabacco. Il riso e i cereali vengono coltivati soprattutto nelle Pianura Padana, che comprende Lombardia, Emilia-Romagna, Veneto e parte del Piemonte. Nel Centro Italia sono presenti zone agricole praticamente ovunque: Toscana, Marche, Lazio, Umbria e Abruzzo presentano le colture più disparate. Nel Sud Italia, invece, si trovano le colture tipicamente mediterranee, come gli agrumi in Sicilia o gli olivi in Puglia. Nelle aree in cui l'attività agricola è molto sviluppata si utilizza un'elevata quantità di erbicidi e di conseguenza si avrà una maggiore contaminazione dei bacini idrici causata da queste sostanze. In particolare, c'è il rischio che gli erbicidi possano raggiungere le riserve di acqua sotterranea inquinando le fonti di acqua potabile.

Gli erbicidi fotosintetici maggiormente utilizzati nelle colture italiane appartengono alle classi delle ammidi, derivati dell'urea, nitrili e triazine. Le colture di mais e frumento sono tra le più importanti in Italia e, secondo i dati pubblicati dall'ISTAT[16], [17], per queste colture gli erbicidi che appartengono alle quattro classi sopra elencate sono i più utilizzati. Lo studio dell'uso di erbicidi su queste colture si sviluppa dal 2002 al 2018 per il mais e dal 2003 al 2017 per il frumento. Nell'arco degli anni la quantità di erbicida (in kg) per ettaro trattato è variata. Per il mais gli erbicidi utilizzati maggiormente appartengono al gruppo delle ammidi, con una media di 1 kg di principio attivo per ettaro di terreno trattato. Le triazine presentano una media di 0,57 kg per ettaro e il loro utilizzo si può ritenere circa costante nel corso degli anni. L'impiego di derivati dell'urea e nitrili, invece, è diminuito soprattutto nel 2018 (Tab. 2.3). Per il frumento si è verificata una forte crescita nell'uso di ammidi; nel 2003 questi erbicidi non erano impiegati per questo tipo di coltura, mentre nel 2017 sono diventati i più utilizzati con una media di 2,67 kg per ettaro trattato. Anche le triazine inizialmente non erano usate per il frumento, ma nel 2017 sono arrivate ad un impiego medio di 0,33 kg per ettaro (Tab. 2.4). In Appendice B si riporta la tabella pubblicata dall'ISTAT da cui sono stati estrapolati i dati presentati.

**Tabella 2.3:** Media kg di principio attivo/ettaro trattato per colture di mais.  
(Dati tratti da[16]).

<b>Categoria erbicidi</b>	<b>2002</b>	<b>2007</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>
Ammidi	0,83	1,5	0,84	0,8
Uree	0,33	3,3	0,06	0,05
Nitrili	0,51	0,59	0,45	0,33
Triazine	0,47	0,89	0,49	0,45

**Tabella 2.4:** Media kg di principio attivo/ettaro trattato per colture di frumento. (Dati tratti da[17]).

<b>Categoria erbicidi</b>	<b>2003</b>	<b>2008</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>
Ammidi	0	0,5	1,32	2,67
Uree	1,55	0,1	0,09	0,14
Nitrili	0,46	0,6	0,29	0,34
Triazine	0	0,1	0,69	0,33

I bacini idrici che si trovano in prossimità di colture in cui sono utilizzati erbicidi sono particolarmente soggetti al rischio di contaminazione. Uno studio del 2010 ha analizzato campioni di acque sotterranee prossime a diversi tipi di colture e utilizzate come risorse di acqua per il consumo umano, allo scopo di rilevare la presenza e la concentrazione di erbicidi contaminanti[18]. I siti che sono stati selezionati sono 20 e si trovano in cinque Regioni italiane: Piemonte, Veneto, Toscana, Umbria e Sicilia. Ogni sito è stato scelto poiché situato in vicinanza di una delle principali colture citate precedentemente (riso, mais, cereali, limoni, fiori, vite, olivo e tabacco). I campioni sono stati prelevati in primavera e in autunno al fine di osservare un eventuale cambiamento della contaminazione media durante l'anno.

I siti di monitoraggio di acque sotterranee nelle vicinanze di colture di mais sono situati in Piemonte e Veneto. In tutti i campioni provenienti da questi siti sono stati rilevati erbicidi appartenenti alla classe delle triazine. Le sostanze rilevate sono atrazina e terbutilazina e i loro metaboliti desetil-atrazina e desetil-terbutilazina. Le concentrazioni rilevate per queste sostanze sono riportate in Tabella 2.5. Gli erbicidi triazinici subiscono dei processi di degradazione nel terreno, i metaboliti sono particolarmente persistenti e percolando attraverso il terreno giungono alle acque sotterranee. Infatti, i metaboliti sono stati rilevati a concentrazioni comparabili e in alcuni casi maggiori rispetto alle molecole di partenza. Anche un altro erbicida, il bentazone è stato rilevato, ma solo in un sito di monitoraggio e a concentrazioni molto basse.

**Tabella 2.5:** Concentrazione di erbicida nei siti di monitoraggio vicino alle colture di mais in µg/L. (Dati tratti da[18]).

Composto	Sito 3		Sito 4		Sito 5		Sito 7	
	Prim	Autun	Prim	Autun	Prim	Autun	Prim	Autu
Atrazina	0,20	0,21	0,09	0,08	0,14	0,15	0,06	0,04
Desetil-atrazina	0,35	0,42	0,14	0,17	0,32	0,62	0,34	0,17
Terbutilazina	0,09	0,10	0,05	0,04	0,06	0,07	0,03	0,02
Desetil-terbutilazina	0,06	0,08	0,03	0,03	0,06	0,07	0,03	0,02
Bentazone	0,02	-	-	-	-	-	-	-

I siti di monitoraggio delle acque sotterranee prossime alle colture di cereali sono situati in Veneto e Umbria. In questi siti di monitoraggio, terbutilazina e desetil-terbutilazina sono le molecole rilevate con maggior frequenza. Esse sono state ritrovate in ogni campione a conferma della forte persistenza e capacità di diffusione nel terreno tipiche di erbicidi della classe delle triazine. Anche l'atrazina e il suo metabolita sono stati rilevati nei campioni, ma solo in due dei siti analizzati. Le concentrazioni rilevate nei diversi campioni e per le varie sostanze sono riportate in Tabella 2.6.

**Tabella 2.6:** Concentrazione di erbicida nei siti di monitoraggio vicino alle colture di cereali in µg/L. (Dati tratti da[18]).

Composto	Sito 6		Sito 8		Sito 12		Sito 13	
	Prim	Autun	Prim	Autun	Prim	Autun	Prim	Autun
Terbutilazina	0,08	0,05	0,20	0,05	0,06	0,02	0,03	-
Desetil-terbutilazina	0,12	0,08	0,20	0,05	0,09	0,05	0,07	-
Atrazina	0,07	0,05	0,03	0,02	-	-	-	-
Desetil-atrazina	0,32	0,24	0,04	0,02	-	-	-	-

Gli erbicidi fotosintetici appartenenti alla classe delle triazine sono molto utilizzati per il trattamento di svariate colture e sono anche particolarmente persistenti nel terreno. Queste sostanze sono i principali inquinanti delle acque sotterranee che si trovano in prossimità dei terreni in cui si usano erbicidi. Le concentrazioni di triazine nei campioni, come si può osservare in Tabella 2.5 e 2.6, in alcuni casi superano la concentrazione massima tollerata dalla legge per una singola sostanza (0,1 µg/L). Considerando che si tratta di sostanze tossiche e che i bacini idrici analizzati sono utilizzati per l'approvvigionamento di acqua per il consumo umano, è chiaro che la presenza di triazine nelle risorse d'acqua rappresenti un problema rilevante da affrontare. Il primo passo verso la soluzione della questione è uno studio più approfondito di queste sostanze.



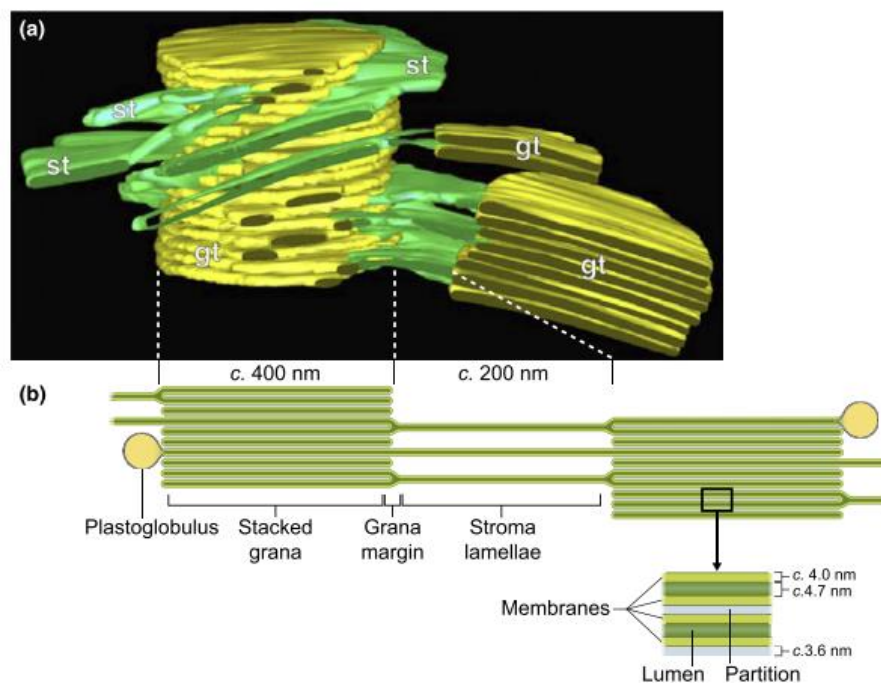
## 2.4 Sito d'azione degli erbicidi triazinici

Gli erbicidi fotosintetici appartenenti alla classe delle triazine agiscono sul PSII legandosi in un punto specifico del complesso proteico e bloccando quindi il trasporto elettronico riassunto dalla Figura 2.4 con lo schema Z. Queste sostanze diffondono all'interno della cellula vegetale fino a raggiungere il sito di legame che si trova nel complesso enzimatico PSII, a sua volta situato nei tilacoidi. Per individuare il sito d'azione è quindi necessario comprendere come sono organizzate le membrane tilacoidali.

### 2.4.1 Struttura e dinamiche dei tilacoidi

Le membrane tilacoidali si trovano nei cloroplasti e separano l'ambiente interno del tilacoide, detto lumen, da quello esterno, detto stroma. Queste membrane assumono una forma appiattita e possono essere organizzate in complessi di più dischi impaccati (grana) oppure in singole lamelle che collegano i grana (lamelle stromatiche).

I dischi che costituiscono i grana, nelle cellule vegetali, hanno un diametro che può variare tra i 350 e 600 nm, mentre lo spessore del lumen generalmente è di pochi nm. Nell'immagine riportata in Figura 2.5 si può osservare uno spessore del lumen di 4,7 nm. Inoltre, si osserva come i dischi siano molto ravvicinati e fortemente impaccati nella struttura del grana. Le lamelle stromatiche, invece, hanno una larghezza di circa 200 nm[13].

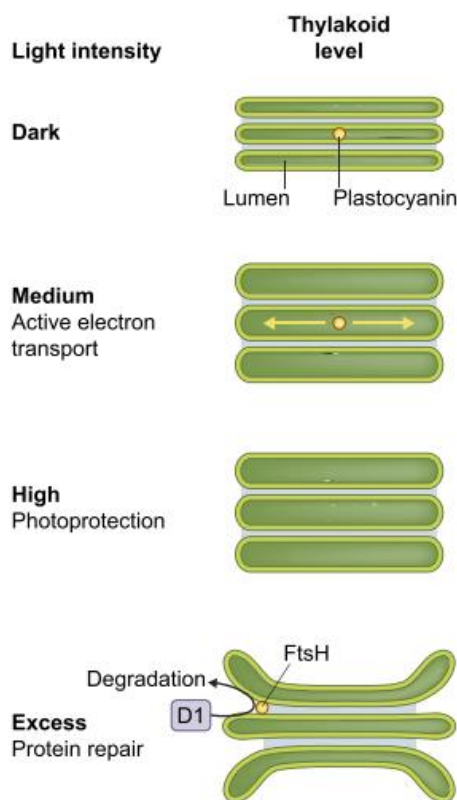


**Figura 2.5:** Ricostruzione 3D delle membrane tilacoidali di pianta ottenuta da tomografia elettronica (a). Modello in scala dei tilacoidi (b) in cui si osservano i due domini, i grana e le lamelle stromatiche, con le rispettive dimensioni. (Immagine tratta da[13]).

Nei tilacoidi sono presenti anche i plastoglobuli, ovvero delle strutture globulari attaccate alle estremità delle membrane tilacoidali. Probabilmente, i plastoglobuli sono “intrappolati” da una continuazione della membrana lipidica esterna del tilacoide. Queste strutture rappresentano una sorgente di metaboliti ed enzimi lipofilici che vengono sfruttati per mantenere costante il rapporto lipidi:proteine nel tilacoide. Infatti, è stato

dimostrato che per poter catturare l'energia solare, è necessario che questo rapporto rimanga costante.

Poiché all'interno dei tilacoidi avvengono le reazioni dipendenti dalla luce, queste strutture si sono evolute in modo da adattarsi a diverse condizioni di illuminazione. Questo significa che le membrane sono in grado di riarrangiarsi per favorire al massimo le reazioni chimiche, quando l'illuminazione è scarsa, ma soprattutto, sono in grado di attuare un meccanismo di protezione nei confronti della foto-ossidazione, quando l'energia luminosa è in eccesso. I tilacoidi possono quindi assumere diverse organizzazioni strutturali, come mostrato in Figura 2.6.



**Figura 2.6:** Rappresentazione della riorganizzazione delle strutture tilacoidali in seguito alla variazione di intensità della radiazione luminosa. (Immagine tratta da [14]).

Il PSII è immerso nella membrana tilacoidale nei grana, mentre il PSI si trova all'esterno dei grana, nelle lamelle stromatiche. La plastocianina è un trasportatore di elettroni che, muovendosi nel lumen del tilacoide, permette al flusso elettronico dal PSII di raggiungere il PSI. Si è osservato che, in condizioni di media illuminazione, si verifica un rigonfiamento del lumen, probabilmente per favorire la diffusione della plastocianina e per aumentare la velocità di trasporto degli elettroni tra i due fotosistemi. Questo meccanismo di riorganizzazione strutturale del tilacoide permette di ottimizzare il processo fotosintetico anche in condizioni meno favorevoli.

Quando l'intensità luminosa è elevata, nel tilacoide viene attivato un meccanismo di dissipazione di energia in calore per evitare che l'energia in eccesso, che non può essere utilizzata nelle reazioni fotosintetiche, causi la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) dannose per la cellula. Se l'energia assorbita supera ulteriormente quella utilizzabile, si verifica la foto-ossidazione e vengono prodotti i ROS che hanno come risultato principale la distruzione di una specifica subunità del PSII, la proteina D1. Questa distruzione "mirata" però presenta il vantaggio di dover ricostruire solo una delle subunità proteiche che costituiscono il PSII.

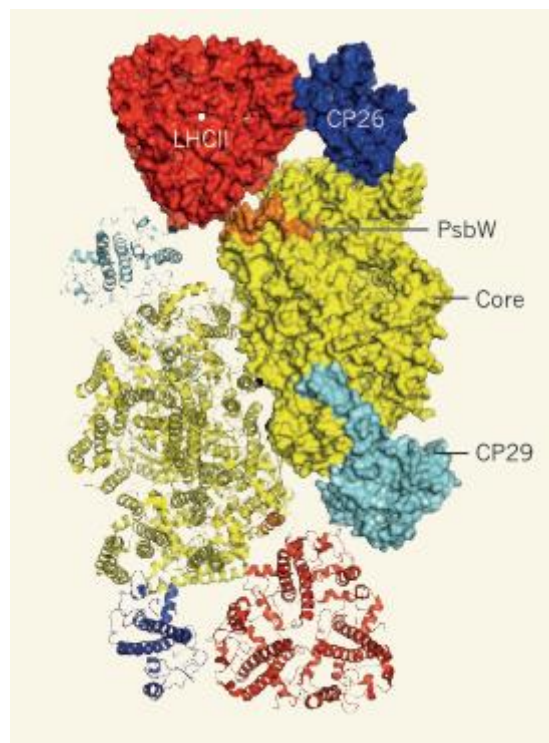
Nel tilacoide avviene un complesso processo di rinnovamento della proteina D1 che include disassemblaggio del complesso proteico PSII, degradazione e nuova sintesi della proteina D1 e riassemblaggio del complesso PSII riparato[13].

## 2.4.2 Struttura del PSII

Il PSII è un complesso di proteine e pigmenti immerso nella membrana tilacoidale che catalizza la fotolisi dell'acqua. Esso è costituito da 30 proteine e cofattori, tra cui: clorofille, carotenoidi, un cluster  $Mn_4CaO_5$ , un gruppo eme, plastochinoni e lipidi e complessivamente pesa circa 1300 KDa [19]. Il PSII è formato da due parti principali: il core e l'antenna esterna, che sono rappresentate schematicamente in Figura 2.7. Il core contiene il centro di reazione in cui avvengono le reazioni fotochimiche, mentre l'antenna ha lo scopo di catturare l'energia solare e convogliarla al centro di reazione. Il core presenta una struttura altamente conservata in tutti gli organismi che svolgono la fotosintesi,

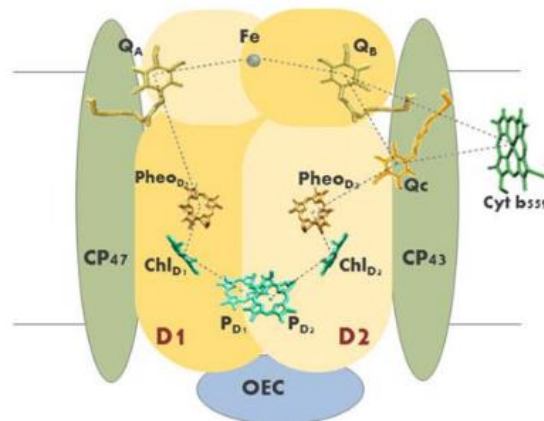
solamente alcune proteine periferiche che circondano il centro catalitico sono organizzate in maniera differente nei cianobatteri e nelle piante superiori. L'antenna esterna, invece, può variare molto da un organismo all'altro. Nelle piante l'antenna è composta da complessi di pigmenti e proteine in grado di catturare la luce (Light Harvesting Centres LHCs) e trasferirla al core.

L'antenna delle piante è formata da un trimero di LHC chiamato LHClI e da due LHC monomeriche chiamate CP29 e CP26. Tra antenna e core deve esserci un trasporto di energia altamente efficiente, infatti, lo stato eccitato della clorofilla dovuto all'assorbimento di un fotone è instabile e la clorofilla ritorna allo stato iniziale in pochi nano secondi. Una volta tornato allo stato fondamentale, l'energia viene persa. Di conseguenza, il tempo per l'uso dell'energia è limitato e deve quindi esserci un trasferimento rapido al centro di reazione. La velocità con cui questa energia viene trasferita dipende dalla distanza tra i pigmenti e dal loro orientamento relativo[20].



**Figura 2.7:** Struttura del PSII di una pianta superiore (spinacio). Nella metà in basso a sinistra è riportata la rappresentazione delle catene peptidiche, nella metà in alto a destra è mostrata la densità tridimensionale del complesso proteico. (Immagine tratta da[20]).

Il complesso del core è composto da: centro di reazione (RC), complesso di evoluzione dell'ossigeno (OEC), due antenne interne denominate CP43 e CP47, il citocromo b559 e alcune subunità minori; i componenti principali sono schematizzati in Figura 2.8. Il centro di reazione è il "cuore" del PSII poiché è il punto in cui avviene il trasporto elettronico generato dall'assorbimento di luce, RC è costituito da due proteine, D1 e D2, che a loro volta legano tutti i cofattori necessari alle reazioni[21].



**Figura 2.8:** Rappresentazione schematica del core del PSII con le principali proteine e cofattori coinvolti nel trasporto elettronico. In giallo scuro è rappresentata la proteina D1, in giallo chiaro D2, in verde CP47 e CP43, in blu l'OEC. (Immagine tratta da [22]).

D1 e D2 legano un dimero di clorofilla *a* che prende il nome di P680 per indicare la lunghezza d'onda della radiazione luminosa a cui si ha massimo assorbimento. Gli altri componenti legati alle proteine D1 e D2 e che intervengono nella separazione di carica sono due molecole di feofitina *a*, un atomo di ferro non legato ad un gruppo eme e due plastochinoni indicati come P<sub>Q<sub>A</sub></sub> e P<sub>Q<sub>B</sub></sub>. I plastochinoni sono gli accettori terminali di elettroni nel PSII; il loro nome indica il sito di legame con le proteine del core, il P<sub>Q<sub>A</sub></sub> è legato alla proteina D2 nel sito Q<sub>A</sub> e il P<sub>Q<sub>B</sub></sub> è legato alla proteina D1 nel sito Q<sub>B</sub>[14]. L'atomo di ferro presente nella struttura è associato ai due plastochinoni e contribuisce a stabilizzarli quando sono nella forma ridotta di semichioni attraverso la distribuzione della carica.

I due plastochinoni sono chimicamente identici, differiscono solo per il sito di legame, la loro funzione è quella di stabilizzare la prima separazione di carica (P<sub>Q<sub>A</sub></sub>) e condurre gli elettroni nella catena di trasporto elettronico (P<sub>Q<sub>B</sub></sub>). Inoltre, nonostante siano molecole identiche, i due plastochinoni mostrano un potenziale redox differente fondamentale per il trasferimento degli elettroni. Il P<sub>Q<sub>A</sub></sub> è fortemente legato alla matrice proteica del RC e svolge la funzione di destinatario di un singolo elettrone per mediare la doppia riduzione a cui va incontro il P<sub>Q<sub>B</sub></sub>. Quest'ultimo, invece, dopo esser stato ridotto e protonato due volte, si allontana dal sito di legame e viene immediatamente sostituito da un nuovo plastochinone. P<sub>Q<sub>A</sub></sub> e P<sub>Q<sub>B</sub></sub> sono posizionati in maniera simmetrica nei loro siti di legame intorno al ferro. Infine, recenti studi hanno individuato una terza molecola di plastochinone (P<sub>Q<sub>C</sub></sub>) legata al PSII. Tuttavia, si hanno ancora incertezze su questa molecola in quanto non è stata individuata in tutti gli studi sulla struttura del PSII, probabilmente in seguito all'adozione di differenti procedure di purificazione e cristallizzazione del campione.

Le due proteine antenna CP47 e CP43 sono posizionate in vicinanza rispettivamente di D1 e D2 nel core del PSII. Esse ospitano il maggior numero di molecole di clorofilla *a* presenti nel core e oltre ad avere un ruolo importante nel catturare radiazioni luminose, stabilizzano la conformazione attiva dell'OEC. CP43 è legato più debolmente al core e questo potrebbe avere un ruolo importante in fase di sostituzione della proteina D1 danneggiata[22].

L'OEC, infine, è un complesso proteico in cui avviene l'ossidazione dell'acqua; esso è formato da tre proteine legate alle proteine D1 e D2 del core. L'OEC è esposto alla parte

luminale del tilacoide. Questo complesso è legato ad un cluster  $Mn_4Ca O_5$  che può esistere in più stati di ossidazione e accumulare fino a quattro cariche positive in base al numero di elettroni rimossi. Quando il cluster accumula quattro cariche positive riesce ad ossidare una molecola d'acqua attraverso la rimozione di elettroni, il risultato è la produzione di  $O_2$  e  $4H^+$  nello spazio luminale[14].

### 2.4.3 Sito di legame $Q_B$

Gli erbicidi triazinici esplicano la loro azione di blocco della catena di trasporto degli elettroni sostituendosi al plastochinone B nel sito di legame  $Q_B$ , che è situato sulla proteina D1. Il sito di legame  $Q_B$  è formato principalmente da residui proteici di D1, infatti circa l'80% dell'energia totale di interazione deriva dai legami con proteine, il restante 20% dell'energia deriva da interazioni con lipidi e cofattori. Il  $PQ_B$  forma tre legami idrogeno con la proteina D1; gli atomi di ossigeno chetonici che si trovano in testa alla molecola di  $PQ_B$  instaurano il primo legame con il gruppo idrossilico della Ser264, il secondo con l'azoto della catena laterale di His215 e il terzo con il gruppo amidico di Phe265. Molto probabilmente il terzo legame idrogeno gioca un ruolo fondamentale nella stabilizzazione del semichinone nella fase di riduzione. Anche la coda fitilica del plastochinone  $PQ_B$  è coinvolta nelle interazioni con la proteina D1 ed è stato stimato che il contributo della coda all'energia totale di interazione è più del 60%[22]. In Tabella 2.7 sono riassunte le interazioni tra il  $PQ_B$  e il sito di legame.

**Tabella 2.7:** Fattori coinvolti nelle interazioni tra plastochinone B e sito di legame  $Q_B$ . (Informazioni tratte da [22]).

<b>Matrice proteica</b>	
Interazioni di attrazione che coinvolgono la testa	D1-Phe255, D1-Phe265, D1-Val219, D1-Leu218, D1-His215
Interazioni di attrazione che coinvolgono la coda	D2-Phe38, D2-Tyr42, D1-Phe211, PsbF-Leu26, PsbF-Thr25, D2-Arg26, D2-Arg128
Interazioni di repulsione	<b>Testa:</b> D1-Gly253, D1-Asn266 <b>Coda:</b> D2-Leu43, PsbF-Val23, PsbF-Ala22, D1-Leu271, D2-Asp25, PsbE-Glu7
<b>Lipidi e cofattori</b>	
Interazioni di attrazione che coinvolgono la testa	DGDG6
Interazioni di attrazione che coinvolgono la coda	Chl <sub>D2</sub> , MGDG18, SQDG4, DGDG6, MGDG7
Interazioni di repulsione	<b>Testa:</b> MGDG18, Chl <sub>D2</sub>

Gli erbicidi triazinici, si legano nel sito di legame  $Q_B$ , occupando così il posto del  $PQ_B$ . In generale, molecole diverse instaurano interazioni con il sito di legame di intensità differente; da questo deriva una diversa affinità del PSII nei confronti di molecole erbicide differenti.



### 3. BIOSENSORI PER LA DETECTION DI ERBICIDI FOTOSINTETICI

La qualità delle risorse idriche è valutata individuando e quantificando la presenza di sostanze inquinanti, nel caso specifico di erbicidi, attraverso diverse tecniche analitiche. La metodologia attualmente più utilizzata e convalidata consiste nel prelevare periodicamente campioni, in determinati punti del bacino idrico, e analizzarli in laboratorio. Le tecniche analitiche impiegate sono principalmente di tipo cromatografico, come, ad esempio, la cromatografia liquida (high performance liquid chromatography, HPLC) e la gas cromatografia (gas chromatography, GC). La separazione cromatografica si basa sulla differente ripartizione dei componenti della soluzione nelle due fasi presenti: fase mobile (gassosa o liquida) e fase stazionaria (solida). I cromatografi sono dotati di uno spettrometro UV o di massa, che permette di rilevare l'eluizione della sostanza inquinante di interesse attraverso la fase stazionaria nella colonna. La prova cromatografica viene progettata sulla base delle caratteristiche chimico-fisiche del composto che si desidera separare, per cui è necessario applicare un metodo differente per ogni classe di erbicida. Inoltre, ogni prova necessita di pretrattamenti come pre-concentrazione e clean-up. Di conseguenza, per quanto queste tecniche siano estremamente sensibili e abbiano raggiunto un'elevata capacità di separazione, le analisi dei numerosi campioni risultano molto costose in termini di denaro e tempo[23]. Inoltre, il campionamento discontinuo non è in grado di fornire un'immagine rappresentativa della qualità chimica (e biologica) del bacino idrico. Infatti, la concentrazione rilevata di un erbicida può variare anche di ordini di grandezza nel corso dell'anno, presentando picchi durante il periodo di applicazione dello stesso[24].

Un'altra tecnica impiegata per rilevare erbicidi in acqua è quella dei test immunologici altamente selettivi. Vengono utilizzati anticorpi che presentano un sito di legame estremamente selettivo verso una sola molecola o una sola classe di sostanze. Le misure effettuate analizzano il numero di siti di legame ancora disponibili dopo il contatto con l'analita, al fine di ricavarne la concentrazione nel campione. Un esempio di test immunologico usato per la detection di erbicidi fotosintetici è ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), in cui coniugati enzimatici marcati legano l'erbicida di interesse in maniera specifica. Questa tecnica di misurazione, però, presenta limitazioni relative all'uso di attrezzature e forniture costose, personale addestrato e l'impossibilità di eseguire determinazioni sul campo per lunghi periodi[24], [25].

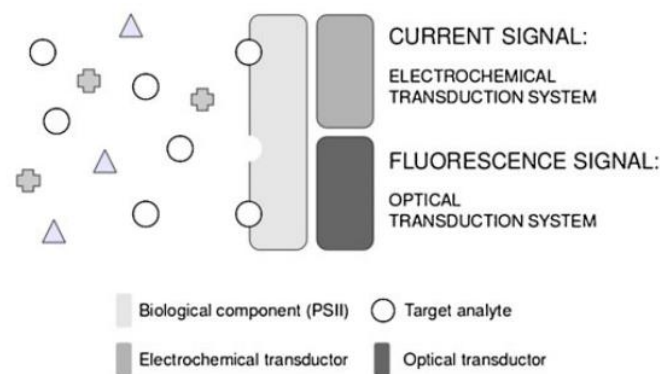
Negli ultimi decenni, le numerose ricerche sui biosensori hanno mostrato come questi possano offrire molti vantaggi se confrontati con le costose e complesse analisi di laboratorio o immunologiche. I biosensori presentano le caratteristiche ideali per un'analisi ambientale economica, veloce e semplice; inoltre, permettono di effettuare misure sul posto. Attualmente, il mercato dei biosensori è occupato quasi esclusivamente dai dispositivi impiegati in ambito biomedico, ma la diffusione di biosensori per il rilevamento di erbicidi potrebbe realizzarsi nei prossimi anni, grazie anche agli investimenti degli enti governativi, dettati dalla necessità di un monitoraggio ambientale efficiente[26].

Un biosensore è, secondo la definizione IUPAC, un dispositivo in grado di fornire informazioni analitiche quantitative impiegando un elemento di riconoscimento biologico collegato ad un sistema di trasduzione. L'elemento di riconoscimento biologico può essere una cellula intera, un organello, oppure un enzima; esso traduce un'informazione biochimica, generalmente legata alla concentrazione di un analita, in un segnale di output. Questo viene tradotto dal trasduttore in un segnale ottico o elettrico[27]. Infine, il



trasduttore deve essere collegato ad un hardware che mostra e memorizza i risultati delle misurazioni. Nei biosensori gli elementi costituenti sono racchiusi in dispositivi portatili e di piccole dimensioni. I biosensori sono distinguibili dagli altri sistemi di misura per l'assenza di fasi preparative, come l'aggiunta di reagenti[28].

Nei biosensori per il monitoraggio di erbicidi fotosintetici, l'elemento sensibile può essere il PSII purificato, la membrana tilacoidale isolata che lo contiene, oppure singole cellule di microalghe che contengono il PSII nei propri tilacoidi. In assenza di erbicidi, illuminando l'elemento di riconoscimento biologico si ha l'eccitazione della clorofilla nel PSII e si innesca la catena di trasporto elettronico verso l'accettore terminale di elettroni. In presenza dell'erbicida si avrà una diminuzione del flusso elettronico in maniera proporzionale alla concentrazione dell'erbicida stesso. Questo avviene a causa del blocco elettronico dovuto al legame che l'erbicida instaura con il PSII nel sito  $Q_B$ , sostituendosi all'accettore di elettroni. Il trasduttore, per questo tipo di biosensori, può essere di tipo ottico o elettrico. In Figura 3.1 è mostrato uno schema dell'interazione tra i diversi elementi costituenti il biosensore per la detection di erbicidi fotosintetici[26].



**Figura 3.1:** Schema dei principali elementi di un biosensore basato sul PSII per la detection di erbicidi fotosintetici. Immagine tratta da [26].

Uno dei vantaggi principali nell'utilizzo di biosensori per il monitoraggio di erbicidi in acqua consiste nella possibilità di ottenere una stima del rischio legato alla loro tossicità nei confronti degli organismi viventi. Infatti, per quanto le analisi chimiche riescano a misurare la concentrazione di ogni singolo composto, non forniscono un'immagine rappresentativa del rischio legato alla presenza di erbicidi. I biosensori basati sul PSII rilevano gli erbicidi che esercitano un effetto tossico nei confronti degli organismi fotosintetici[23]. Inoltre, in alcuni siti come, per esempio, punti di approvvigionamento di acqua per il consumo umano, sono necessarie misure rapide che non sono possibili nel caso in cui i campioni debbano essere inviati ad un laboratorio per essere analizzati. I biosensori permettono di eseguire, impiegando personale relativamente non specializzato, sul posto un prescreening dei campioni d'acqua al fine di selezionare solo quelli che presentano un rischio per l'ambiente, riducendo, così, il numero di campioni inviati ai vari laboratori[24].

L'impiego di biosensori per il monitoraggio ambientale presenta, però, ancora vari limiti tra cui i principali sono la sensibilità e la stabilità dell'elemento di riconoscimento. Un altro aspetto da considerare è la complessità e la diversità dei campioni prelevati. Infine, non è da trascurare la capacità del biosensore di riconoscere solamente una classe di sostanze, ovvero gli erbicidi fotosintetici, senza distinguere tra i vari composti. La sfida di



rendere i biosensori per la detection di erbicidi dei dispositivi in grado di effettuare misure rapide e affidabili è oggetto di varie ricerche. Una delle vie possibili per superare le limitazioni dei biosensori è la ricerca della coppia elemento di riconoscimento/metodo di immobilizzazione che offra il miglior compromesso tra stabilità e sensibilità. Inoltre, la possibilità di generare organismi modificati geneticamente consente di modificare selettivamente in punti precisi il sito di legame in modo da favorire il legame di un singolo specifico erbicida. Sarebbe così possibile ottenere, grazie ad un vettore di sensori specifici per le singole molecole, un quadro dettagliato della presenza dei vari erbicidi nel campione. Per ottenere misure direttamente nel sito di prelievo, infine, il biosensore deve essere miniaturizzato, ciò è possibile grazie al fatto che componenti elettronici e ottici di piccole dimensioni sono sempre più economici[26].

### 3.1 Principio di funzionamento

I due componenti fondamentali del biosensore sono l'elemento di riconoscimento biologico (elemento sensibile) e il trasduttore. L'elemento sensibile è un sistema più o meno complesso in grado di svolgere le reazioni fotosintetiche dipendenti dalla luce; quindi, quando eccitato da radiazione luminosa, innesca la catena di trasporto degli elettroni. All'interno dell'apparato fotosintetico, l'accettore terminale di elettroni del PSII è il plastochinone B, il quale, ottenuti i due elettroni necessari per ridursi completamente, si allontana dal complesso enzimatico in forma di plastochinolo. Nel biosensore, viene spesso utilizzato un accettore artificiale di elettroni, generalmente una molecola della famiglia dei chinoni, che durante il processo viene ridotto. In assenza di erbicida, illuminando l'elemento di riconoscimento biologico, quindi, si verifica un flusso elettronico. In presenza di erbicida, però, il legame che questo instaura nel sito  $Q_B$  blocca il trasporto di elettroni e, di conseguenza, il numero degli accettori ridotti diminuirà in maniera proporzionale all'aumento di concentrazione di erbicida. Si ha così una riduzione del flusso di elettroni rispetto alle condizioni in assenza di erbicida, usate come riferimento[28].

Il trasduttore ha lo scopo di tradurre il segnale di output dell'elemento biologico, in questo caso la variazione del flusso elettronico, in un segnale di altro tipo, generalmente elettrico o ottico.

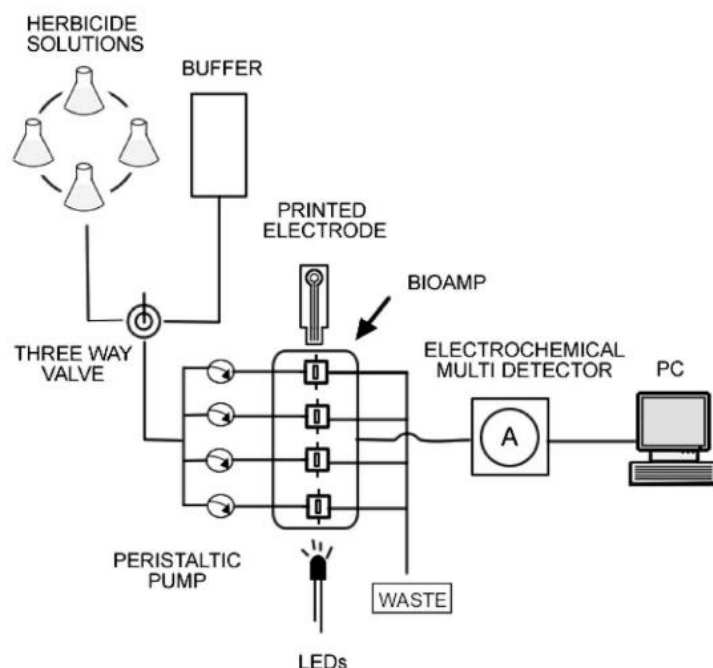
Nei biosensori elettrochimici il trasduttore è un elettrodo, un esempio di dispositivo molto diffuso è il biosensore con elettrodo serigrafato in carbonio e argento. I biosensori amperometrici traducono il flusso elettronico attivato dalla luce nel PSII in una corrente misurata tra l'elettrodo di lavoro, su cui è immobilizzato il mediatore biologico, e il contro elettrodo. L'attività fotosintetica è valutata attraverso prove amperometriche in cui viene misurato il picco di corrente che si registra quando l'accettore ridotto rilascia la carica acquisita sulla superficie dell'elettrodo, ossidandosi nuovamente. Il picco di corrente, che si verifica in seguito all'eccitazione dovuta alla luce, è tanto più basso quanto più alta è la concentrazione di erbicida. È possibile costruire delle curve di taratura utilizzando soluzioni a concentrazione nota di erbicida e poi valutare la concentrazione in un campione incognito inserendo nella curva il valore dell'altezza del picco per ottenere la concentrazione attesa[29].

I biosensori con elettrodo di Clark sono biosensori elettrochimici che misurano l'attività fotosintetica con metodo ossigrafico, ovvero rilevando la quantità di ossigeno prodotto nel PSII in seguito ad illuminazione. Quando la clorofilla P680, che si trova nel PSII, cede un elettrone in seguito all'eccitazione dovuta alla luce, infatti, la lacuna elettronica in essa generata viene colmata dagli elettroni prodotti dalla fotolisi dell'acqua, reazione catalizzata dal PSII che genera come prodotti protoni e ossigeno molecolare. I biosensori ad elettrodo di Clark, attraverso prove amperometriche, misurano la corrente elettrica nel

PSII che è direttamente proporzionale alla quantità di ossigeno prodotto durante la fotolisi dell'acqua. Di conseguenza, una diminuzione della corrente all'elettrodo è dovuta ad una minore produzione di ossigeno, provocata dalla presenza nel campione analizzato di inibitori della fotosintesi, come erbicidi fotosintetici[30]–[33].

I biosensori ottici misurano l'attività fotosintetica utilizzando sensori ottici in grado di misurare la variazione di parametri come colore o fluorescenza della soluzione acquosa contenete il PSII in funzione della concentrazione di erbicida. Un esempio è il biosensore a fluorescenza, esso sfrutta la capacità delle clorofille del PSII di emettere luce ad una lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella assorbita per eccitarsi. Quando la catena di trasporto elettronico è bloccata a causa del legame dell'erbicida sul sito  $Q_B$ , l'energia luminosa assorbita è in eccesso rispetto a quella effettivamente utilizzata per eccitare le clorofille, perciò una maggiore quantità di radiazione luminosa assorbita viene riemessa per fluorescenza, in maniera proporzionale alla concentrazione di erbicida[23]. Altri esempi di biosensori ottici sfruttano la proprietà dell'accettore di elettroni di cambiare colorazione in base al grado di ossidazione[34] oppure sfruttano la chemiluminescenza, che accompagna la reazione tra un enzima immobilizzato e il prodotto della reazione fotosintetica[35]. I biosensori di tipo ottico possono essere usati solo con campioni di acqua limpida, mentre i sensori elettrochimici si prestano di più ad essere impiegati con campioni reali, che possono essere più o meno torbidi[25].

Un'ulteriore distinzione riguarda la modalità in cui viene condotta la misurazione: si possono avere biosensori batch o in continuo. Un esempio di sistema batch è stato proposto in uno studio del 1999 [34] in cui le membrane tilacoidali, estratte da foglie di spinaci (*Spinacia oleracea L.*), vengono immobilizzate nei pozzetti di una piastra da microtitolazione e il campione da analizzare viene aggiunto ad ogni provetta, dopo essere stato pre-concentrato. L'accettore di elettroni utilizzato è il 2,6-diclorofenolo-indofenolo (DPIP), che passando dalla forma ossidata a quella ridotta vira il suo colore da blu a trasparente. In presenza di erbicida, la soluzione in provetta rimane di colore blu ad indicare che la riduzione del DPIP è stata inibita. Le provette vengono sottoposte a letture di assorbanza a 530 nm, picco massimo di assorbimento del DPIP in forma ossidata, da cui si può ricavare la concentrazione di erbicida nel campione. Al termine della misurazione le provette vengono svuotate e lavate. Molti esempi di biosensori con configurazione in continuo si trovano nella letteratura più recente. Lo schema generale di questi dispositivi (mostrato in Figura 3.2) è costituito da una valvola a tre vie, che permette di far fluire sul sensore alternativamente soluzione priva di erbicida o con erbicida, un insieme di condotti e di pompe peristaltiche. La soluzione da analizzare fluisce attraverso la tubatura, viene a contatto con l'elemento di riconoscimento del biosensore e, infine, viene scaricata; il liquido è movimentato grazie a pompe peristaltiche[36].



**Figura 3.2:** Schema dei componenti principali di un multi-biosensore amperometrico per la detection di erbicidi fotosintetici. La soluzione di erbicida e il tampone sono alimentati alternativamente grazie una valvola a tre vie. Pompe peristaltiche permettono il flusso sui sensori e lo scarico del liquido. Immagine tratta da [36].

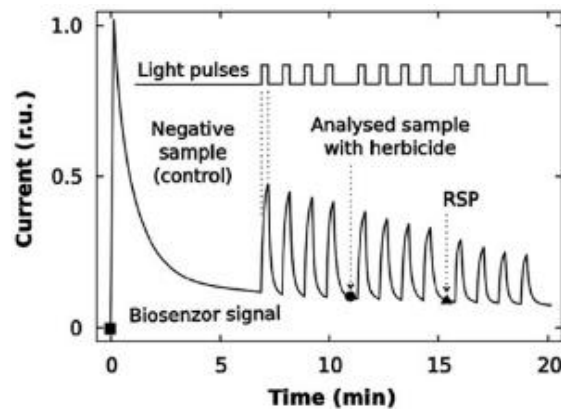
### 3.1.1 Biosensori amperometrici

Un biosensore amperometrico è una cella elettrochimica a tre elettrodi: l'elettrodo di lavoro, su cui è immobilizzato l'elemento di riconoscimento, il contro elettrodo e un elettrodo di riferimento. Il materiale biologico è in grado di trasferire elettroni da un donatore di elettroni ad un accettore, nel caso delle reazioni fotosintetiche mediate dalla luce la molecola donatrice di elettroni è l'acqua e l'accettore è il  $PQ_B$  o un accettore artificiale. Al contro elettrodo si realizza la riossidazione dell'accettore di elettroni precedentemente ridotto. L'elettrodo di riferimento è inserito per stabilizzare il segnale di corrente di base, questo facilita il rilevamento di erbicidi che alterano l'attività fotosintetica del materiale biologico. Inoltre, l'elettrodo di riferimento permette di applicare un potenziale costante all'elettrodo di lavoro per poter effettuare prove amperometriche[37]. La foto corrente generata dal trasporto di elettroni può essere monitorata in maniera diretta oppure attraverso l'impiego di accettori artificiali di elettroni[38].

I dispositivi necessari per svolgere una prova amperometrica, oltre al biosensore, sono: un potenziostato, che misura l'andamento della corrente nel tempo; un LED in grado di fornire radiazioni alla lunghezza d'onda di 650 nm, a cui l'efficienza del PSII è massima; una scheda elettronica di controllo per la lettura, l'elaborazione, la memorizzazione e il trasferimento dei dati su un computer. Prima di procedere con la misurazione amperometrica, generalmente si effettua una voltammetria ciclica per individuare il potenziale ottimale con cui si ottengono i massimi valori di corrente che fluisce nella cella[39]. Poiché i valori di corrente che vengono registrati spesso sono dell'ordine dei  $\mu A$ , la fase di ottimizzazione della corrente è fondamentale.

Le prove amperometriche consistono in una serie di cicli luce/buio, effettuati ad intervalli regolari, in cui viene misurata la corrente in funzione del tempo applicando un potenziale

costante all'elettrodo di lavoro. Il primo ciclo viene realizzato utilizzando un campione di riferimento in cui non è presente alcun erbicida. Dopo aver incubato al buio il biosensore fino ad ottenere una corrente di base stabile, il sistema viene illuminato e si registra un aumento della corrente che fluisce nel circuito, poi si passa alla fase di buio in cui la corrente diminuisce drasticamente poiché l'attività del PSII è nulla in assenza di illuminazione. Alla fine del primo ciclo la corrente registrata presenta un picco la cui altezza è presa come riferimento. Durante i cicli successivi vengono nuovamente realizzate le fasi di luce e buio, ma nella cella vengono alimentati campioni con concentrazione di erbicida crescente. Il sensore registra picchi di corrente ad altezza decrescente che indicano una riduzione dell'attività fotosintetica dovuta al legame dell'erbicida col PSII[40]. Un esempio delle curve di corrente che si ottengono con la prova amperometrica sono mostrate in Figura 3.3. Si osservi che la prova viene effettuata più volte con lo stesso campione, infatti, per ottenere risultati affidabili, spesso si calcola il valore del picco di corrente come la media dei picchi ottenuti in tre misurazioni.

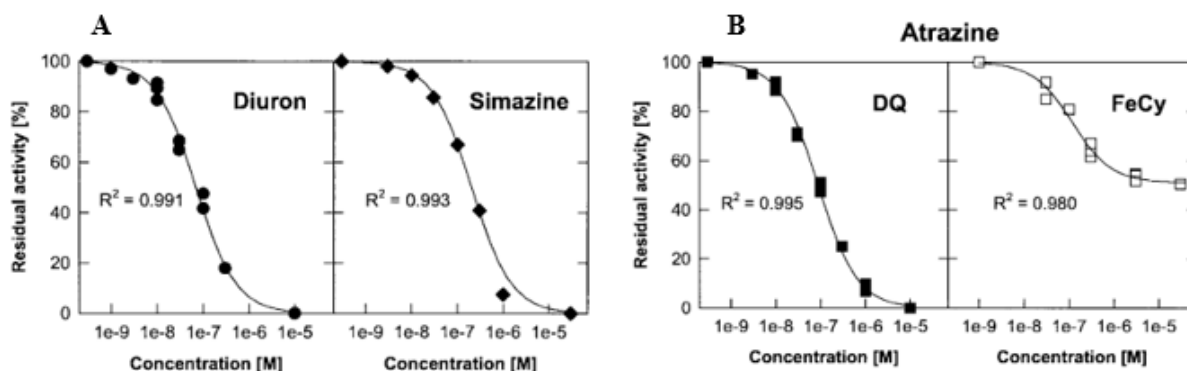


**Figura 3.3:** In alto, curve degli impulsi luminosi forniti durante la prova amperometrica su biosensore ad elettrodo serigrafato. In basso, curve di corrente registrate durante la misurazione. Immagine tratta da [40].

Il rapporto tra l'altezza del picco in presenza di erbicida e quella del picco di riferimento è indice dell'attività residua del materiale biologico immobilizzato, quindi, è legato alla concentrazione di erbicida. Effettuando più misure con soluzioni a concentrazione nota di erbicida, è possibile interpolare i risultati ottenuti con delle curve di taratura in cui la concentrazione è in funzione dell'attività fotosintetica residua. Le curve di taratura vengono costruite utilizzando la (3.1), che rappresenta l'isoterma di assorbimento di Langmuir.

$$act = 100 - 100 \frac{[H]}{I_{50} + [H]} \quad (3.1)$$

In (3.1)  $act$  è l'attività residua del biosensore in percentuale,  $[H]$  è la concentrazione molare di erbicida nella soluzione e  $I_{50}$  è la concentrazione di erbicida che causa una riduzione del 50% dell'attività rispetto al riferimento, che corrisponde alla costante di dissociazione del complesso PSII-erbicida. La curva ha un andamento sigmoidale dipendente sia dall'erbicida che dall'accettore artificiale di elettroni impiegato, alcuni esempi sono riportati in Figura 3.4[29]. Per individuare la concentrazione di erbicida in un campione non noto, si effettua la prova amperometrica e si calcola la percentuale di attività residua, poi si inserisce il valore ottenuto nella curva di taratura corrispondente e si legge la concentrazione corrispondente.

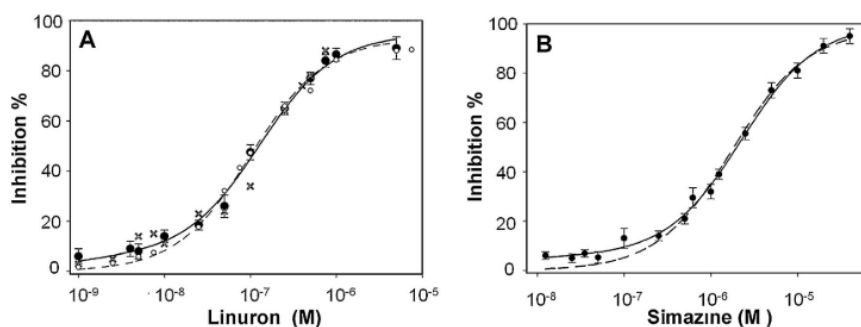


**Figura 3.4:** Curve di taratura ottenute con due diversi erbicidi fotosintetici: diuron e simazina (A). In (B) sono riportate le curve di taratura ottenute con l'erbicida atrazina utilizzando due differenti accettori di elettroni: durochinone (DQ) e ferricianuro (FeCy). Immagine tratta da [29].

In alternativa, è possibile calcolare il parametro di inibizione percentuale, che è il complemento dell'attività residua, utilizzando la (3.2)

$$inh = \left(1 - \frac{i_h}{i_0}\right) 100 \quad (3.2)$$

In cui  $i_h$  è la corrente di picco nel riferimento e  $i_0$  è la corrente di picco in presenza di erbicida. Le curve di taratura (Figura 3.5) che si ottengono interpolando i dati di concentrazione in funzione dell'inibizione sono speculari rispetto a quelle ottenute in funzione dell'attività residua[39].



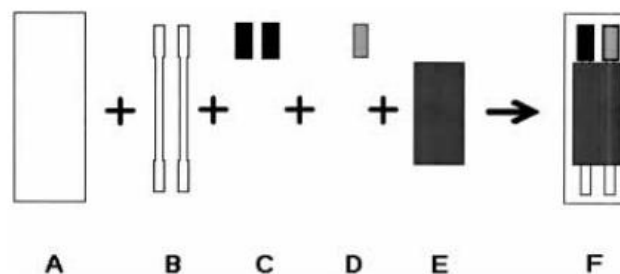
**Figura 3.5:** Curve di taratura ottenute con due diversi erbicidi fotosintetici: linuron (A) e simazina (B). L'inibizione è in funzione della concentrazione di erbicida. Immagine tratta da [39].

Il limite di rilevamento (LOD) dell'erbicida viene determinato sulla base dell'intervallo di confidenza del 99%, che, assumendo la distribuzione normale, corrisponde a 2,6 volte l'errore standard della misura ( $\sigma$ ). Quindi, utilizzando la relazione modificata per l'isoterma di adsorbimento di Langmuir, il LOD è stato calcolato con la formula (3.3).

$$LOD = \frac{2,6 \sigma I_{50}}{100 - 2,6 \sigma} \quad (3.3)$$

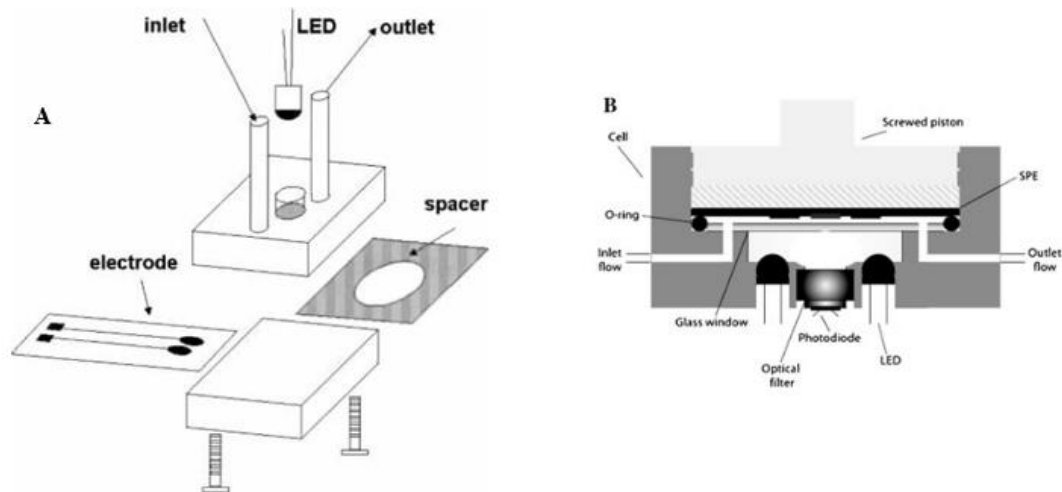
Il LOD è un parametro fondamentale per il biosensore poiché legato alla sensibilità dello stesso nei confronti degli erbicidi fotosintetici o di un singolo erbicida agenti nel sito  $Q_B$ [29].

In letteratura sono disponibili varie configurazioni di biosensori amperometrici, una delle più utilizzate nelle misure di campioni prelevati da bacini idrici è quella con elettrodo serigrafato. I biosensori elettrochimici di questo tipo sono realizzati attraverso un processo di stampa, detto serigrafia, in cui si depositano su una lastra polimerica o ceramica inchiostri di materiali differenti; il prodotto finale è un elettrodo bidimensionale. Quest'ultimo è ottenuto depositando in maniera sequenziale uno strato di un metallo conduttore, ad esempio platino, oro, argento o titanio, uno strato di isolante, come polveri di ossido di alluminio o zirconio e, infine, uno strato di pasta polimerica su un substrato inorganico (allumina) o polimerico (PVC). Il processo di stampa, schematizzato in Figura 3.6, inizia tracciando sul substrato linee conduttrici di un inchiostro a base di metalli. Il secondo strato, che forma l'elettrodo di lavoro, è in grafite, mentre l'elettrodo di riferimento è ottenuto con lo stesso inchiostro utilizzato per stampare le linee conduttrici. L'ultimo passaggio consiste nel ricoprire il dispositivo con uno strato di isolante. Dopo la stampa, l'elettrodo viene trattato ad 80° C per 20 minuti, oppure viene lasciato riposare una notte a temperatura ambiente[29].



**Figura 3.6:** Schema della preparazione di elettrodi serigrafati. La stampa inizia con la deposizione di percorsi conduttivi (B) sul substrato in PVC (A). Quindi, l'elettrodo di lavoro viene stampato utilizzando inchiostri di grafite (C) e l'elettrodo di riferimento viene realizzato utilizzando inchiostro conduttore (D). Infine, viene depositato uno strato isolante (E). Il layout finale dell'elettrodo è rappresentato in (F). Immagine tratta da [29].

L'elemento di riconoscimento biologico viene immobilizzato sull'elettrodo di lavoro in grafite utilizzando un metodo che garantisca un buon compromesso tra stabilità dell'immobilizzazione e mantenimento dell'attività del PSII. In seguito, si procede con l'assemblaggio del dispositivo che si presenta come una cella compatta in cui sono integrati materiale biologico, elettrodo e sorgente luminosa. Uno schema dei componenti del biosensore è mostrato in Figura 3.7. Una lastra spaziatrice in silicone viene posta tra due blocchi di vetro sovrapposti e fissati insieme. L'elemento spaziatore, anche detto anello ad O, presenta un foro circolare al centro che delimita il volume della camera di flusso. L'elettrodo è posizionato all'interno della camera di flusso in modo da esporre il materiale biologico per favorire l'interazione con l'erbicida. Il campione da analizzare fluisce attraverso la camera di flusso passando attraverso i canali di input e di output che si trovano su uno dei blocchi di vetro. Il blocco presenta anche un alloggiamento per la sorgente luminosa, che generalmente è un LED. Un timer collegato al LED ne determina l'accensione e lo spegnimento ad intervalli regolari[23], [29].



**Figura 3.7:** Elementi costituenti il biosensore ad elettrodo serigrafato (A) e vista in sezione del dispositivo assemblato (B). L'elemento spaziatore separa i due blocchi in vetro. Sul blocco superiore sono presenti i canali di ingresso e uscita del fluido e un alloggiamento per il LED. L'elettrodo è posizionato nella camera di flusso creata dal foro dello spaziatore. Immagini tratte da [26], [29].

### 3.1.2 Biosensori a fluorescenza

I biosensori a fluorescenza misurano l'attività fotosintetica del materiale biologico immobilizzato attraverso il fenomeno della fluorescenza delle clorofille *a* presenti nel PSII. La fluorescenza si verifica come emissione di radiazioni luminose con una lunghezza d'onda maggiore rispetto alla luce assorbita. Quando un fotone viene catturato dal cloroplasto, la sua energia eccita una speciale clorofilla *a* presente nel PSII (P680). L'energia di eccitazione può andare incontro a tre destini diversi: può essere utilizzata per attivare la catena di trasporto elettronico (quenching fotochimico), può essere dissipata sotto forma di calore (quenching non fotochimico) e infine, può essere riemessa come fluorescenza. In condizioni normali, solo l'1% dell'energia assorbita viene riemessa, la maggior parte viene impiegata nel processo fotosintetico. I tre fenomeni elencati, però, sono in competizione l'uno con l'altro, quindi, una diminuzione dell'efficienza di uno porterà all'incremento degli altri due. Le variazioni di fluorescenza della clorofilla *a* del PSII sono in relazione ai cambiamenti dell'attività fotosintetica che un'esposizione ad agenti stressogeni, come erbicidi fotosintetici, può generare. Infatti, il legame che l'erbicida instaura con il sito  $Q_B$ , bloccando la catena di trasporto elettronico nel PSII, causa una diminuzione sia del quenching fotochimico che di quello non fotochimico; di conseguenza, si verifica un aumento della fluorescenza per poter dissipare l'energia luminosa in eccesso.

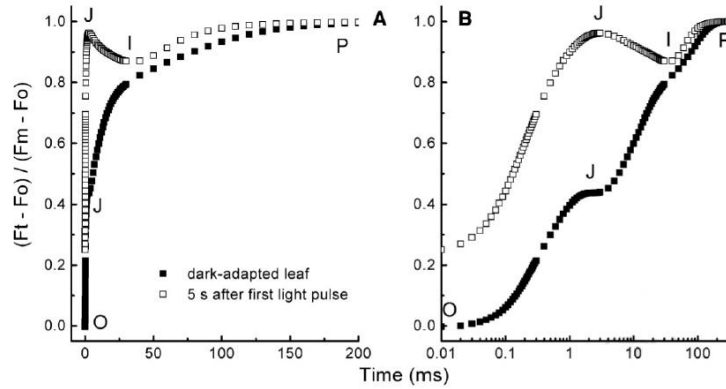
Nei biosensori per erbicidi fotosintetici, come elemento di riconoscimento biologico generalmente si impiegano cellule intere di microalghe; il trasduttore è un fluorimetro, ovvero uno strumento che misura le variazioni di fluorescenza delle clorofille *a* in risposta ad uno stimolo luminoso. Esistono quattro tipologie di fluorimetri: i PAM (Pulse Amplitude Modulation), i PEA (Plant Efficiency Analyzers), i fluorimetri a pompa e sonda e i fluorimetri FRRF (Fast Repetition Rate Fluorimeters)[23], [41]. Essi seguono differenti protocolli di illuminazione per andare a valutare diversi aspetti del fenomeno della fluorescenza. Dal punto di vista procedurale, le prove di fluorescenza possono essere raggruppate in tre tipi di analisi: misure della fluorescenza flash, misure dello stato stazionario e misure del transiente OJIP.

Le prove di fluorescenza flash sono basate sul principio di flash di singolo turnover (STF). Un STF deve avere un'intensità sufficiente ad eccitare le clorofille nel centro di reazione, ma una durata tale da indurre solo una separazione di carica in ogni centro di reazione, per questo motivo il periodo di illuminazione è estremamente breve, nell'ordine dei  $\mu\text{s}$ . Tuttavia, le condizioni ideali di singolo turnover nella realtà non sono mai perfettamente realizzate. Le reazioni che si verificano sono la riduzione a plastochinoli del plastochinone A, che ha un'emivita di circa 100-200  $\mu\text{s}$ , e del plastochinone B, che avviene con cessione di elettroni da parte del plastochinone A e ha un'emivita di 400-600  $\mu\text{s}$ . Se l'apparato fotosintetico è sottoposto a stress, come ad esempio in presenza di erbicidi fotosintetici, il plastochinone B non si trova legato al sito  $Q_B$  e il plastochinone A, non potendo donare l'elettrone acquisito, si ricombina con il donatore di elettroni del PSII oppure si accumula in forma ridotta. Le misure di fluorescenza flash diventano complicate quando il  $Q_A$  si accumula, quindi non è possibile sfruttarle per misurare la concentrazione di erbicidi.

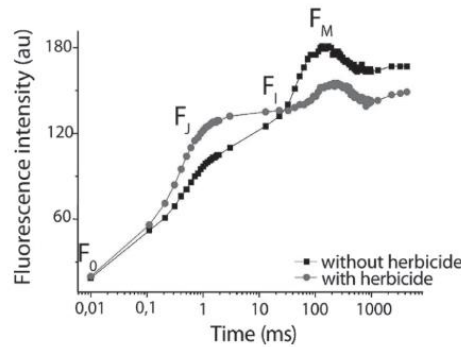
Le misure in condizioni stazionarie valutano l'attività fotosintetica dopo un lungo periodo di illuminazione, circa 5-10 min. L'intensità della fluorescenza, in condizioni stazionarie, è influenzata da due fattori: lo stato della catena di trasporto elettronico e la resa della fluorescenza, ovvero la probabilità che la luce assorbita venga emessa come fluorescenza delle clorofille *a*. L'energia luminosa viene fornita in continuo da una sorgente di luce attinica ad una determinata intensità e, ad intervalli regolari di 100 o 200 s, da un impulso saturante. Spegnendo la luce attinica sarebbe possibile seguire, grazie all'impulso saturante, l'andamento del quenching non fotochimico, che, solitamente, presenta tre differenti fasi di rilassamento. Queste prove, però, forniscono meno informazioni sull'attività fotosintetica rispetto a quelle che si possono ottenere da metodi con una risoluzione temporale maggiore, ovvero effettuando misure del transiente OJIP.

Le misure del transiente OJIP registrano l'incremento della fluorescenza che si verifica illuminando il materiale biologico, precedentemente adattato al buio, con un impulso saturante per circa 1 s. Durante la fase di transizione da buio a luce, l'intensità della fluorescenza cresce da un valore minimo ( $F_0$ ) ad un massimo ( $F_M$ ) attraverso due punti di flesso che sono visibili riportando in scala logaritmica il tempo (come mostrato in Figura 3.8). I due step sono indicati come  $F_J$  e  $F_I$ , il primo si registra dopo circa 2 ms e il secondo dopo 30 ms, mentre il massimo è in genere rilevato dopo 300 ms. Le curve registrate durante il transiente, denominate curve di Kautsky, presentano un andamento tipico caratterizzato dai quattro punti fondamentali O, J, I e P. Il transiente OJIP fornisce informazioni sullo stato della catena di trasporto elettronico, infatti, le curve registrate in presenza di erbicida (Fig. 3.9) presentano un andamento differente rispetto alle curve in condizioni di riferimento [41], [42].





**Figura 3.8:** Curve di fluorescenza del transiente OJIP mostrate in una scala temporale lineare (A) e logaritmica (B). I punti di flesso tipici della curva sono evidenti solo nel grafico su scala logaritmica (B). I punti neri sono stati registrati in condizioni di adattamento al buio e i punti bianchi dopo un primo impulso luminoso. Immagine tratta da[42].



**Figura 3.9:** Curve di fluorescenza del transiente OJIP in condizioni di riferimento (linea grigia) e in presenza di erbicida (linea nera). Immagine tratta da [23].

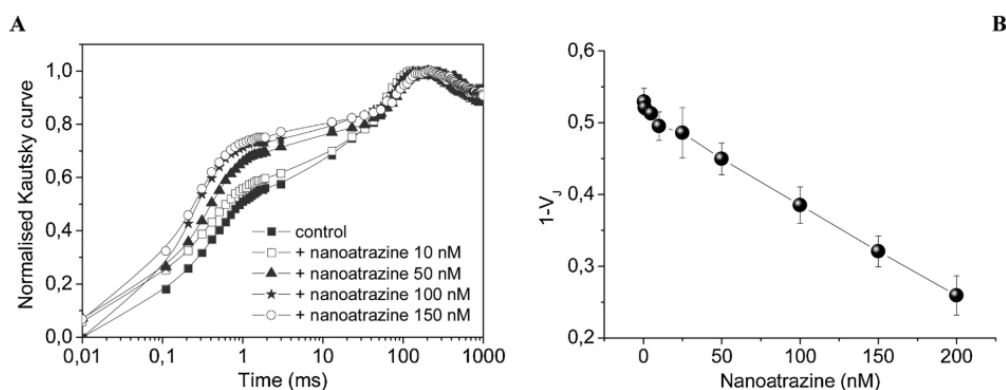
Utilizzando la differenza nel segnale di fluorescenza tra lo stato di riferimento e quello in presenza di erbicida è possibile valutare l'attività del PSII tramite il parametro  $F_V / F_M$ , che rappresenta la massima resa di fluorescenza della reazione fotochimica ed è calcolata secondo l'equazione (3.4)

$$\frac{F_V}{F_M} = \frac{F_M - F_0}{F_M} \quad (3.4)$$

$F_V$  è la massima variazione di fluorescenza ed è calcolata come la differenza tra la fluorescenza massima e quella minima che si registra in condizioni di adattamento al buio. Il rapporto  $F_V / F_M$  decresce in maniera proporzionale all'aumento di concentrazione dell'erbicida. Anche gli altri punti del transiente forniscono informazioni sullo stato di riduzione a plastochinolo del plastochinone  $PQ_B$  nel PSII, infatti, una variazione dell'attività del PSII causa una diversa intensità della fluorescenza nei punti di flesso. Per poter confrontare le due curve, si condensano tutti i punti fondamentali in un solo parametro: la fluorescenza variabile ( $1 - V_J$ ), che viene calcolato con la formula (3.5).

$$1 - V_J = 1 - \frac{F_J - F_0}{F_M - F_0} \quad (3.5)$$

Questo parametro permette di osservare direttamente l'effetto della concentrazione di erbicida sul fenomeno della fluorescenza rispetto al campione di riferimento, come mostrato in Figura 3.10[43].



**Figura 3.10:** (A) Curve di Kautsky registrate a concentrazione crescente di atrazina. (B) variazione della fluorescenza calcolata per ogni prova e riportata in funzione della concentrazione di erbicida. Immagine tratta da [43].

### 3.2 Immobilizzazione

In un biosensore, l'immobilizzazione dell'elemento di riconoscimento su un supporto deve soddisfare alcune richieste:

- ritenere il materiale biologico, le perdite durante il funzionamento devono essere ridotte al minimo;
- preservare l'attività fotosintetica del materiale biologico;
- favorire il contatto tra elemento biologico e trasduttore;
- ridurre il più possibile le resistenze al trasporto dell'analita in modo da favorire la sua diffusione verso il materiale biologico.

Nel caso in cui l'elemento biologico siano tilacoidi o PSII estratti da cellule intere, l'immobilizzazione risulta determinante anche al fine di superare le limitazioni dovute alla vita relativamente breve che queste componenti biologiche hanno al di fuori del loro ambiente nativo[44]. La scelta adeguata della procedura di immobilizzazione, quindi, è fondamentale per garantire buone prestazioni del biosensore. I parametri che determinano le prestazioni del biosensore, come sensibilità, stabilità e limite di rilevamento, sono fortemente influenzati dal metodo di immobilizzazione adottato.

L'immobilizzazione può essere di tipo fisico o chimico. Il metodo fisico consiste nell'adsorbimento del materiale biologico su un supporto specifico o nell'intrappolamento su un gel. L'adsorbimento e l'intrappolamento sono tecniche economiche, semplici e in grado di garantire una minima perdita dell'attività fotosintetica. L'unico difetto che le caratterizza è la possibilità di desorbimento dell'elemento biologico a causa delle interazioni deboli che si instaurano tra l'elemento di riconoscimento e il supporto. Il metodo chimico assicura un legame stabile tra materiale biologico e supporto poiché si instaurano legami covalenti. Tuttavia, il legame che si forma deve essere studiato con attenzione, in quanto potrebbe denaturare il PSII o comunque ridurre l'attività catalitica [23]. Le principali tecniche di immobilizzazione per materiale fotosintetico sono schematizzate in Tabella 3.1.

L'adsorbimento del materiale biologico è un metodo di immobilizzazione di tipo fisico che si basa su interazioni deboli che si instaurano tra adsorbente e adsorbito. I supporti più utilizzati per l'immobilizzazione di materiale fotosintetico sono: filtri di microfibre di vetro, dischi di filtri di carta, dischi di filtri di allumina e colonne contenenti

dietilamminoetilcellulosa (DEAE-cellulosa)[44]. Il processo di immobilizzazione consiste in una semplice filtrazione che può essere seguita da liofilizzazione del materiale biologico sul supporto. Lo svantaggio dell'adsorbimento è una elevata perdita del materiale biologico per desorbimento, per cui si preferiscono altri metodi fisici, come l'intrappolamento, o chimici. Poiché la capacità di ritenzione dell'adsorbito non è elevata, a causa delle deboli interazioni coinvolte, in alcuni casi si ricopre il filtro contenente materiale biologico con un film sottile di alginato, dando vita ad una immobilizzazione di tipo fisico-chimico[23].

L'intrappolamento in gel del materiale fotosintetico è un metodo di immobilizzazione di tipo fisico in cui l'elemento biologico è intrappolato in una rete tridimensionale formata dalle molecole che costituiscono il gel, che possono essere di origine naturale o sintetica. Tra i gel di origine naturale si distinguono quelli di tipo polisaccaridico, come agar, agarosio e alginato, e quelli di tipo proteico, tra cui la più utilizzata è la gelatina. Il gel di origine sintetica principalmente usato per l'immobilizzazione di materiale fotosintetico è il PVA-SbQ (Poly(vinilalcol) legato a gruppi stirilpiridinici)[44], che deve essere polimerizzato per generare la fitta rete di molecole in grado di intrappolare il materiale biologico. L'intrappolamento avviene depositando su una piastra Petri la miscela di PVA-SbQ con la preparazione di materiale fotosintetico ed esponendo la miscela a raggi UV (235 e 365 nm) per attivare il processo di polimerizzazione[45]. L'intrappolamento ha una capacità di ritenere il materiale biologico medio-alta, in generale la gelatina e il PVA-SbQ presentano perdite molto basse, mentre il gel di agarosio e l'agar hanno perdite maggiori[23].

L'immobilizzazione di tipo chimico prevede che vengano instaurati legami covalenti tra il supporto e il materiale biologico, questo ha come vantaggio una elevata capacità di ritenzione, ma ha il notevole svantaggio di inibire l'attività catalitica dell'elemento immobilizzato[46]. L'immobilizzazione attraverso la formazione di legami covalenti non è una tecnica particolarmente indicata per elementi fotosintetici in quanto i legami causano la perdita dell'attività. L'unica eccezione è la glutaraldeide (GA) che non inibisce le reazioni fotosintetiche e perciò viene utilizzata come cross-linker per l'immobilizzazione di materiale fotosintetico. Essa forma una fitta rete di legami covalenti con le estremità  $NH_2$  libere delle proteine di membrana immerse nelle membrane tilacoidali o cellulari. Insieme alla glutaraldeide viene spesso aggiunta anche la siero albumina bovina (BSA), una proteina che ha funzione protettiva nei confronti del materiale fotosintetico (la BSA legandosi alla glutaraldeide evita che il materiale biologico sia coinvolto in troppi legami che ne ridurrebbero l'attività catalitica)[44]. L'immobilizzazione viene realizzata miscelando GA e BSA al materiale biologico in soluzione tampone, depositando poi la miscela su piastre Petri e portando i campioni a  $-20^{\circ}C$  per 2 ore[45].

**Tabella 3.1:** Schema dei principali metodi di immobilizzazione utilizzati per materiale fotosintetico in biosensori per il rilevamento di erbicidi fotosintetici.[23], [44]

Metodo di immobilizzazione	Perdite
<i>Metodi Fisici</i>	
<i>Adsorbimento</i>	
Dischi di filtri di carta	Alte
Dischi di filtri di allumina	Alte
Filtro con microfibre di vetro	Alte

DEAE cellulosa	Alte
Intrappolamento su gel	
<i>Gel polisaccaridico</i>	
Agar	Medie
Agarosio	Medie
Alginato	Basse
<i>Gel proteico</i>	
Gelatina	Basse
<i>Gel sintetico</i>	
PVA-SbQ	Basse
<b>Metodo chimico</b>	
<i>Reticolazione</i>	
Glutaraldeide	Basse
<i>Co-reticolazione</i>	
Glutaraldeide (albumina siero bovina)	Basse

La tecnica di immobilizzazione da utilizzare nella produzione di un biosensore dipende dal tipo di materiale biologico impiegato come elemento sensibile (cellula intera es. microalghe, tilacoidi o PSII), dalle proprietà del biosensore che si intendono ottenere e dalla disponibilità economica. L'efficienza dell'immobilizzazione può essere valutata attraverso la misura di diversi parametri, come ad esempio resa dell'attività catalitica fotosintetica dopo immobilizzazione, e sua stabilità sia in condizioni operative che in condizioni di stoccaggio[47]. Il significato di questi parametri verrà analizzato in seguito insieme ad alcuni esempi di biosensori in cui l'elemento biologico è stato immobilizzato con diverse tecniche.

### 3.3 Parametri di efficienza del biosensore

I biosensori per erbicidi fotosintetici devono soddisfare alcuni requisiti per poter essere effettivamente utilizzati per il monitoraggio della qualità delle risorse idriche. Innanzitutto, le caratteristiche di un biosensore lo possono rendere più adatto a misure di pre-screening su campioni di acqua ambientale precedentemente prelevata e generalmente pre-concentrata oppure al monitoraggio in loco. Quindi, è necessario conoscere i parametri fondamentali che caratterizzano il biosensore per decidere se è possibile impiegarlo in laboratorio per selezionare i campioni di acqua ambientale più contaminati oppure nelle misure sul campo. Inoltre, prima di scegliere un biosensore come alternativa ad un metodo analitico "classico" è necessario considerare vari aspetti pratici e tecnici, tra cui qualità dei dati forniti, condizioni in cui il biosensore sia in grado di garantire misure affidabili ad un costo ridotto rispetto alle tradizionali analisi di laboratorio e inserimento del nuovo metodo di misura nel piano di monitoraggio. Conoscere le prestazioni di un biosensore è, quindi, essenziale poiché i parametri operativi possono indicare la natura dei fenomeni limitanti e facilitarne l'ottimizzazione[48].

### 3.3.1 Limite di rilevabilità

Il limite di rilevabilità è la più piccola concentrazione di analita che può essere rilevata dal biosensore. Questo parametro è estremamente importante, in quanto, affinché uno strumento di misura possa essere impiegato direttamente sul campo, deve essere in grado di rilevare una concentrazione di analita almeno uguale al massimo ammesso dai limiti di legge. Abbassare il limite di rilevabilità dei biosensori per la detection di erbicidi è un punto fondamentale per il loro sviluppo e commercializzazione.

La WFD, in Europa, impone una concentrazione massima nel bacino idrico di 0,10 µg/L per un singolo erbicida, e di 0,50 µg/L per miscele di erbicidi. Di conseguenza, i biosensori devono presentare un limite di detection (LOD) che sia almeno uguale, o inferiore, alla concentrazione massima ammessa per il singolo contaminante. Il LOD viene spesso espresso come concentrazione molare (M), quindi il corrispettivo valore in µg/L dipende dalla massa molecolare dell'erbicida. I biosensori per il rilevamento di terbutilazina dovrebbero avere un LOD inferiore a  $4,35 \cdot 10^{-10}$  mol/L, essendo il peso molare dell'erbicida di 229,71 g/mol. In Tabella 3.2 sono riportati i LOD accettabili per la detection degli alcuni erbicidi fotosintetici più diffusi.

**Tabella 3.2:** Limiti di rilevazione accettabili per diversi erbicidi secondo la WFD in mol/L

	Massa molecolare (g/mol)	Limite secondo la WFD (µg/L)	Concentrazione limite (M)
Terbutilazina	229,71	0,1	<i>4,35E-10</i>
Atrazina	215,68	0,1	<i>4,64E-10</i>
Diuron	233,10	0,1	<i>4,29E-10</i>
Simazina	201,66	0,1	<i>4,96E-10</i>

Gli articoli citati in Tabella 3.3 e 3.4 rivelano che, nonostante siano state sperimentate numerose tecniche di ottimizzazione delle prestazioni per abbassare il LOD dei biosensori per detection di erbicidi fotosintetici, i risultati ottenuti non sono ancora sufficienti per poter analizzare in maniera diretta i campioni prelevati di acqua ambientale. Sarebbe, quindi, necessaria una fase di pre-concentrazione dell'acqua che può essere effettuata solo nel caso in cui il biosensore svolga una funzione di pre-screening per le analisi di laboratorio. Nel caso di un monitoraggio in loco, invece, è più complicato pre-concentrare sul posto il campione di acqua e risulta perciò necessario individuare altre vie per migliorare il limite di detection del biosensore.

**Tabella 3.3:** LOD di biosensori per la detection di terbutilazina

Elemento sensibile	Trasduttore	Procedura di immobilizzazione	LOD (M)	Riferimento
Tilacoidi da <i>S. oleracea</i>	Amperometrico	Matrice di BSA-GA	$2,5 \cdot 10^{-8}$	[36]
Tilacoidi da <i>S. oleracea</i>	Amperometrico	Matrice di BSA-GA	$1,0 \cdot 10^{-9}$	[23]

I limiti di rilevamento dei biosensori testati con la terbutilazina sono riportati in Tabella 3.3. Il LOD che il biosensore dovrebbe avere per poter rilevare il superamento della concentrazione ammissibile è almeno un ordine di grandezza inferiore rispetto alla sensibilità dei biosensori presentati negli articoli schematizzati in Tabella 3.3. I dati disponibili per la terbutilazina, però, non sono numerosi. Ampliando lo studio dei limiti di detection ai biosensori in grado di rilevare molecole simili alla terbutilazina, come l'atrazina, è possibile fornire un'immagine più rappresentativa dei valori tipici di LOD. Le due sostanze appartengono alla stessa classe di erbicidi fotosintetici, le triazine, per cui è possibile supporre che la loro affinità con il sito  $Q_B$  del PSII sia molto simile, di conseguenza, la capacità dell'elemento sensibile di rilevare le due molecole è ragionevolmente paragonabile. Come è possibile osservare in Tabella 3.4, anche per il rilevamento di atrazina il LOD dei biosensori studiati finora non risulta ancora sufficiente a rilevare la concentrazione massima ammissibile dal limite di legge.

**Tabella 3.4:** LOD di biosensori per la detection di atrazina

Elemento sensibile	Trasduttore	Procedura di immobilizzazione	LOD (M)	Riferimento
Cellula <i>Scenedesmus acutus</i>	Amperometrico	Nanotubo polielettrolita-tensioattivo-carbonio	$1,36 \cdot 10^{-6}$	[25]
Cellula <i>Monoraphidium contortum</i>	Amperometrico	Nanotubo polielettrolita-tensioattivo-carbonio	$1,10 \cdot 10^{-7}$	[25]
PSII estratto da <i>Synechococcus elongatus</i>	Amperometrico	Matrice di BSA-GA	$2,00 \cdot 10^{-9}$	[29]
Tilacoidi da <i>S. oleracea</i>	Amperometrico	Matrice di BSA-GA	$1,27 \cdot 10^{-8}$	[36]
PSII estratto da <i>Synechococcus elongatus</i>	Amperometrico	Matrice di BSA-GA-glicerolo	$1,60 \cdot 10^{-9}$	[40]

Cellula <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Fluorimetrico	Idrogel di agar	$4,00 \cdot 10^{-12}$	[43]
Cellula <i>Anabaena variabilis</i>	Amperometrico	Gel di alginato	$2,30 \cdot 10^{-8}$	[38]
Cellula intera di <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Fluorimetrico	Setto di silicone	$7,30 \cdot 10^{-10}$	[23]
Tilacoidi da <i>S. oleracea</i>	Fluorimetrico	Matrice di BSA-GA	$1,60 \cdot 10^{-8}$	[23]
Tilacoidi da <i>S. oleracea</i>	Amperometrico	Matrice di BSA-GA	$1,60 \cdot 10^{-9}$	[23]
Tilacoidi da <i>S. oleracea</i>	Ottico	Palline magnetiche di amino-polistirene	$3,00 \cdot 10^{-8}$	[35]
Cellula <i>Chlorella vulgaris</i>	Elettrodo di Clark	Elettrodo serigrafato	$1,00 \cdot 10^{-6}$	[32]
Cellula <i>Chlorella vulgaris</i>	Elettrodo di Clark	Gel di alginato	$5,00 \cdot 10^{-8}$	[33]

Infine, sono stati analizzati i limiti di rilevamento di alcuni biosensori per la detection di erbicidi fotosintetici che sono già stati commercializzati dalla ditta italiana Biosensor Srl (Tabella 3.5). I dettagli sulla specie di origine dell'elemento biologico e la procedura di immobilizzazione non sono stati resi noti. I LOD forniti dal produttore sono dell'ordine di grandezza dei valori trovati in letteratura a dimostrazione del fatto che attualmente non è ancora possibile utilizzare i biosensori direttamente sul campione ambientale di acqua, ma si necessita di una fase di pre-concentrazione dell'acqua previa misura.

**Tabella 3.5:** LOD di biosensori commercializzati per la detection di triazine.

Elemento sensibile	Trasduttore	LOD (M)	Riferimento
Cellula (microalghie)	Amperometrico e fluorimetrico	Range $6,8 \cdot 10^{-7}$ - $2 \cdot 10^{-8}$	[49]
Tilacoidi	Amperometrico	Range $9,9 \cdot 10^{-6}$ - $1,7 \cdot 10^{-7}$	[49]

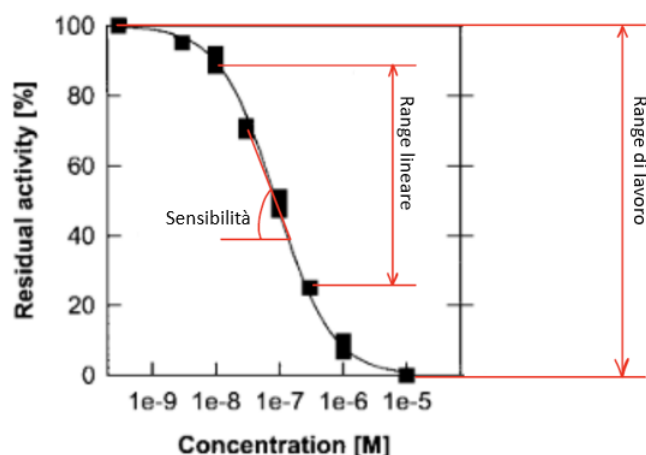
Un fattore che influenza particolarmente il limite di rilevamento del biosensore è la scelta dell'elemento di riconoscimento. Nel caso di PSII purificato ed immobilizzato, l'erbicida fotosintetico riesce ad approssimare direttamente il sito di legame del PSII e a bloccare la catena di trasporto degli elettroni. Un'elevata concentrazione superficiale di materiale

biologico permette di ottenere una risposta più efficiente del sistema all'erbicida; quindi, anche una piccola concentrazione di erbicida riesce a generare una diminuzione del flusso elettronico rilevabile. I biosensori con PSII isolato riescono a raggiungere valori di LOD inferiori rispetto a biosensori che hanno come elemento sensibile componenti biologiche di dimensioni maggiori, come le membrane tilacoidali o le cellule intere[40]. In seguito, però, verrà evidenziato come la scelta dell'elemento biologico influenzi anche altri parametri del biosensore, tra cui soprattutto la stabilità.

### 3.3.2 Caratteristiche di calibrazione: range di lavoro e sensibilità

La calibrazione di un biosensore viene effettuata aggiungendo soluzioni standard di analita al campione da analizzare e riportando su un grafico la risposta del sistema in funzione della concentrazione di analita. Come già visto in precedenza, nel caso di biosensori amperometrici le curve di taratura permettono di misurare l'attività residua del campione, esposto ad erbicida, in funzione della sua concentrazione, mentre nel caso di biosensori a fluorescenza, le curve riportano la fluorescenza variabile in funzione della concentrazione di erbicida. Dalle curve di taratura è possibile ricavare il range di lavoro (Fig. 3.11) che identifica i limiti entro i quali il biosensore è in grado di misurare la concentrazione di erbicida nel campione. Il range di lavoro è il range di concentrazioni delimitato dal limite inferiore di rilevamento e da quello superiore.

Nell'intervallo di lavoro è possibile identificare un range lineare in cui la risposta del biosensore è una funzione lineare della concentrazione di erbicida. Questa zona è delimitata superiormente dal limite del range lineare, che dipende dalle proprietà biocatalitiche dell'elemento biologico di riconoscimento. Il limite potrebbe essere alzato riducendo la resistenza al trasporto di materia tra campione e materiale biologico, ma questo andrebbe a compromettere la sensibilità del biosensore. La sensibilità del biosensore corrisponde alla pendenza della curva di calibrazione nella zona lineare. La sensibilità, che è la differenza minima rilevata tra due valori di concentrazione rappresenta un concetto differente dal limite di detection, che invece è il più piccolo valore di concentrazione percepibile dal biosensore[27]. Nonostante questo, spesso il termine sensibilità viene utilizzato come sinonimo di LOD.



**Figura 3.11:** Curva di taratura di un biosensore in cui sono indicati i principali parametri di taratura. Immagine rielaborata da [29].



### 3.3.3 Selettività e affinità

La selettività è la capacità di un sensore di fornire un segnale in uscita che sia il meno possibile influenzato dalla variazione delle condizioni ambientali o da altri parametri. La selettività del biosensore nei confronti della molecola target è particolarmente importante nel caso di misure su campioni “reali”, cioè prelevati direttamente dai bacini idrici superficiali o sotterranei. I campioni di acqua presentano grande variabilità, infatti la loro composizione varia sia nel tempo, ovvero è diversa tra campioni prelevati nello stesso punto ma in momenti differenti, sia nello spazio, cioè tra campioni prelevati nello stesso momento, ma in luoghi differenti. Inoltre, il numero di contaminanti nell’acqua campionata può essere elevato ed è quindi fondamentale che il biosensore riesca ad effettuare misure affidabili della concentrazione della sola molecola o classe di molecole target ricercate.

La selettività dipende sia dalla scelta dell’elemento biologico sia dal trasduttore. Il PSII è selettivo per una classe di sostanze, gli erbicidi fotosintetici, che lo inibiscono bloccando la catena di trasporto degli elettroni. Tuttavia, nonostante tutti questi erbicidi competano con il plastochinone per occupare il sito  $Q_B$ , il legame che si instaura tra erbicida e PSII differisce da una molecola all’altra di erbicida fotosintetico. L’affinità dell’enzima con l’erbicida differisce tra classi diverse di erbicidi fotosintetici anche tra erbicidi appartenenti alla stessa tipologia di classe[27].

L’affinità tra erbicida e PSII viene stimata attraverso il parametro  $I_{50}$ , che viene utilizzato anche per calcolare il LOD. L’ $I_{50}$  è la concentrazione di erbicida che causa un decremento dell’attività del PSII del 50%. Esso corrisponde alla costante di dissociazione del complesso erbicida-PSII[29].

In alcuni casi, mutazioni casuali che avvengono naturalmente nel sito di legame per l’erbicida dell’elemento biologico (es. cellula fotosintetica) favoriscono il fenomeno della resistenza dell’elemento sensibile ad un particolare erbicida o ad un’intera classe di erbicidi fotosintetici. Mutazioni nel sito di legame possono anche causare, all’opposto, una ipersensibilità nei confronti di alcuni erbicidi. Per questo motivo, una delle possibili vie per migliorare l’affinità del biosensore nei confronti dell’erbicida di interesse è utilizzare un elemento sensibile il cui sito di legame sia stato mutato geneticamente a tal fine[27], [50]. Questo e altri metodi per migliorare le prestazioni del biosensore verranno analizzati in seguito.

### 3.3.4 Stabilità

La stabilità è la capacità del biosensore di conservare inalterate le sue caratteristiche di funzionamento per un intervallo di tempo relativamente lungo. La stabilità è uno dei parametri più problematici per quanto riguarda i biosensori per la detection di erbicidi fotosintetici, poiché è strettamente correlata alle caratteristiche intrinseche dell’elemento biologico di riconoscimento. Il materiale fotosintetico, infatti, è limitato da una durata dell’attività catalitica relativamente breve; per questo motivo, sono state ottimizzate molte tecniche di immobilizzazione al fine di migliorare la stabilità del biosensore.

La stabilità del biosensore può variare molto a seconda della geometria del sensore, della procedura di preparazione e, ovviamente, del materiale biologico e del trasduttore. Per esempio, un sensore il cui elemento sensibile consiste in PSII estratto e immobilizzato avrà una stabilità ridotta rispetto ad un sensore con cellule intere perché l’enzima è stato estratto dall’ambiente nativo cellulare per essere esposto direttamente alla soluzione da analizzare. La stabilità è influenzata anche dalle condizioni operative, per cui, durante test di stabilità effettuati in laboratorio si monitora la concentrazione di analita, il tempo

di contatto del sensore con l'analita, il pH, la temperatura, la composizione della soluzione. Un parametro differente è, invece, la durata o lifetime ( $t_L$ ) del biosensore, che fa riferimento alle condizioni di utilizzo e che non può essere conosciuta a priori. La durata è collegata al tempo in cui la sensibilità del biosensore decresce di una certa entità, generalmente, può essere indicata come  $t_{L10}$  nel caso in cui la sensibilità diminuisca di un fattore 10, oppure come  $t_{L50}$  (emivita) quando la sensibilità viene dimezzata [26], [27].

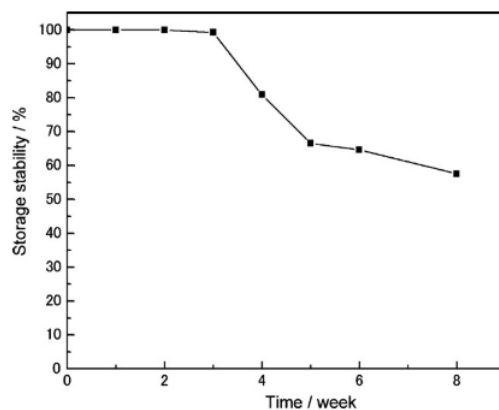
In generale, si può affermare che i biosensori con PSII isolato come elemento sensibile hanno una durata molto ridotta (Tab. 3.6). In aggiunta, se il metodo di immobilizzazione scelto è di tipo fisico, come, per esempio, intrappolamento su alginato o agarosio, il sistema presenta emivita così ridotta da non poter neanche essere testato in laboratorio. I biosensori con tilacoidi (Tab. 3.7), invece, presentano valori di emivita più elevati che permettono di utilizzare il sensore almeno per un turno di lavoro, ipotizzato di 8 ore, dopo la fase di immobilizzazione. Per quanto riguarda i biosensori basati su cellule intere, come prevedibile, la durata è maggiore e può arrivare fino ad alcune settimane. In Figura 3.12 è mostrato l'andamento nel tempo dell'emivita del biosensore che ha come elemento di riconoscimento cellule microalgali di *Chlorella vulgaris*. Per le prime 3 settimane dall'immobilizzazione la stabilità del biosensore resta quasi inalterata, ovvero le prestazioni del sensore non diminuiscono nel tempo.

**Tabella 3.6:** Stabilità del PSII isolato e immobilizzato con diverse tecniche. Dati ricavati da [29].

Procedura di immobilizzazione	Emivita (h)
Alginato	<1
Agarosio	<1
Gelatina	7,5
Matrice di BSA-GA	8

**Tabella 3.7:** Stabilità di diverse preparazioni di tilacoidi immobilizzati con diverse tecniche. Dati ricavati da [36].

Pianta di origine	Procedura di immobilizzazione	Emivita (h)
<i>Spinacia oleracea</i>	Matrice di BSA-GA	16,67
<i>Spinacia oleracea</i>	Gelatina	10,20
<i>Senecio vulgaris</i>	Matrice di BSA-GA	8,30
<i>Senecio vulgaris</i>	Gelatina	8,10



**Figura 3.12:** Stabilità residua di un biosensore con cellule di *Chlorella vulgaris* in condizioni di stoccaggio. Immagine tratta da [32].

### 3.4 Confronto di biosensori per il rilevamento di terbutilazina

Il primo passo per la progettazione di un biosensore che misuri la concentrazione di terbutilazina in maniera efficiente è definire lo scopo per cui esso verrà utilizzato. Come già visto, i biosensori possono essere impiegati nel monitoraggio sul campo oppure in laboratorio per effettuare un pre-screening dei campioni di acqua.

Nel caso del monitoraggio sul campo le caratteristiche desiderate per il biosensore sono:

- portabilità, compattezza e piccole dimensioni;
- limite di rilevamento al di sotto della massima concentrazione ammessa dalla WFD;
- stabilità elevata.

La portabilità e le dimensioni ridotte del biosensore permettono di trasportarlo senza eccessive difficoltà nel punto in cui deve essere effettuata la misura. Il limite di rilevamento deve essere abbastanza basso da rilevare la terbutilazina senza richiedere una fase di pre-concentrazione del campione di acqua ambientale, che non è realizzabile agevolmente sul campo. Infine, la stabilità elevata è richiesta soprattutto nel caso in cui il biosensore effettui un monitoraggio continuo del bacino idrico; in questo caso dovrà essere in grado di effettuare più misure e sarà collegato ad una rete per la raccolta e la memorizzazione dei dati acquisiti.

Dei biosensori citati nei paragrafi precedenti, quello che presenta le migliori prestazioni per la detection di terbutilazina sul campo è quello proposto da Buonasera et al. 2010 [23] (riga 8 Tabella 3.4). Il limite di rilevamento è  $7,3 \cdot 10^{-10}$  M. Questo valore non è ancora al di sotto della concentrazione massima ammissibile per legge per la terbutilazina ( $4,35 \cdot 10^{-10}$  M), ma è il più basso LOD tra quelli dei biosensori analizzati, inoltre, l'ordine di grandezza dei due limiti è lo stesso. L'elemento sensibile del biosensore sono cellule intere di *Chlamydomonas reinhardtii*, che conferiscono una stabilità e una durata maggiore rispetto ai tilacoidi e i PSII estratti. Come riportato in Figura 3.12, biosensori con cellule intere hanno una stabilità che arriva anche ad alcune settimane. Il biosensore ha un trasduttore a fluorescenza che può prestarsi ad essere trasportato per effettuare misure sul campo. La tecnica di immobilizzazione adottata nel biosensore di interesse consiste nell'adsorbimento su setto poroso, che può risultare non molto vantaggiosa dal punto di vista della capacità di ritenzione[23]. Il biosensore è stato testato con atrazina, ma considerato che terbutilazina e triazina due molecole molto simili e che l'affinità degli elementi sensibili verso entrambe sarà paragonabile, si può ipotizzare che il biosensore, seppur con una selettività minore, sia in grado di rilevare anche terbutilazina.

Nel caso di biosensore utilizzato in laboratorio per un pre-screening dei campioni d'acqua ambientale, invece, le caratteristiche desiderate sono:

- selettività nei confronti della terbutilazina;
- sensibilità;
- stabilità accettabile.

La selettività permette di misurare con precisione la concentrazione effettiva di terbutilazina anche in una matrice complessa. La sensibilità è importante per ottenere misure precise. Mentre la stabilità deve permettere di poter conservare il biosensore o trasportarlo senza eccessive perdite di efficienza. Anche il limite di rilevamento sarebbe un parametro molto importante, infatti, per quanto in laboratorio sia possibile effettuare una pre-concentrazione dei campioni, evitare questo passaggio consentirebbe di risparmiare tempo e denaro.

Il biosensore più adatto al rilevamento di terbutilazina in laboratorio è quello riportato da Buonasera et al. 2010 [23] (riga 2 Tabella 3.3). Il biosensore ha un LOD di  $1,0 \cdot 10^{-9}$  M che, confrontando con i LOD degli altri biosensori riportati nelle Tabelle 3.3 e 3.4, è tra i più bassi. L'elemento sensibile è costituito da tilacoidi estratti da *S. oleracea* immobilizzati su una matrice di BSA-GA. I tilacoidi presentano una stabilità inferiore rispetto alle cellule intere, ma poiché il metodo di immobilizzazione utilizzato ha la capacità di mantenere l'attività fotosintetica dei tilacoidi per tempi relativamente lunghi, il biosensore ha un'emivita di circa 16 ore (Tabella 3.7). Questo tempo permetterebbe di conservare in laboratorio il biosensore per almeno un giorno prima di rimuovere e sostituire l'elemento biologico, se possibile, oppure prima di utilizzare un nuovo biosensore. Infine, il biosensore ha mostrato una buona selettività nei confronti della terbutilazina[23].

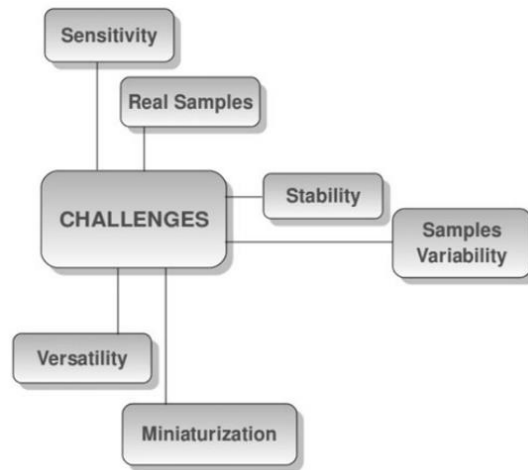
In alternativa, solo nel caso in cui i campioni di acqua debbano comunque essere pre-concentrati, si potrebbe optare per i biosensori già in commercio prodotti da Biosensors SRL. Un esempio è il biosensore amperometrico presentato da Biosensor SRL [49] (riga 2 Tabella 3.5), che ha come elemento sensibile tilacoidi immobilizzati. La scelta di questo biosensore può essere dettata dalla praticità di acquistare un biosensore già in commercio. Il limite di rilevamento del biosensore (Range  $9,9 \cdot 10^{-6}$ - $1,7 \cdot 10^{-7}$  M), però, è tre ordini di grandezza inferiore al limite imposto dalla WFD per la terbutilazina, quindi sarà necessaria una pre-concentrazione del campione di acqua ambientale, che sarebbe sconveniente. Il biosensore rileva la terbutilazina, ma non è selettivo solo per questo erbicida.

I biosensori per il rilevamento di terbutilazina, come tutti quelli per il rilevamento di erbicidi fotosintetici in generale, devono essere ottimizzati ulteriormente per poter superare alcune limitazioni che li rendono poco efficienti. Gli obiettivi ancora da raggiungere sono: abbassamento del LOD, maggiore stabilità e selettività e miniaturizzazione per migliorarne la portabilità.

### **3.5 Ottimizzazione del biosensore: nuove sfide per il futuro**

Il rilevamento di erbicidi fotosintetici in acque superficiali o sotterranee è una sfida complessa sotto vari aspetti, che sono riassunti in Figura 3.13. I biosensori, che vengono progettati in laboratorio e testati con soluzioni di erbicida a concentrazioni note in condizioni controllate, devono poi essere ottimizzati per fornire buone prestazioni anche in campo. La complessità e la variabilità dei campioni da analizzare sono le principali sfide legate alle misure sul campo. Gli erbicidi, infatti, rappresentano solo una piccola parte dei numerosi contaminanti presenti in acqua e spesso sono presenti a concentrazioni molto basse. Di conseguenza, i biosensori devono essere progettati per rilevare solo le sostanze

desiderate e fornire misure non influenzate dalla presenza di altre sostanze. Facendo riferimento ai parametri che caratterizzano il biosensore, questo deve essere ottimizzato in termini di limite di rilevabilità, stabilità e versatilità, ovvero capacità di supportare elementi riconoscimento intercambiabili progettati e costruiti con le caratteristiche desiderate e quindi in grado di rilevare un ampio spettro di classi di composti[26].



**Figura 3.13:** Schema delle sfide da affrontare per l'ottimizzazione dei biosensori per la detection di erbicidi fotosintetici. Immagine tratta da [26].

Come spiegato precedentemente, le caratteristiche del biosensore dipendono fortemente dalla scelta dell'elemento sensibile, dal trasduttore e dalla tecnica di immobilizzazione scelta. La progettazione del dispositivo consiste principalmente nel trovare la combinazione di elementi che fornisca le migliori prestazioni del biosensore nel suo campo di utilizzo. Alcune limitazioni del biosensore, però, sono intrinsecamente legate alla natura del PSII e possono essere superate solo grazie all'utilizzo di organismi fotosintetici geneticamente modificati per questo scopo.

Un altro aspetto da migliorare è la portabilità del biosensore che si deve presentare come uno strumento compatto e di piccole dimensioni. La crescente disponibilità di nanomateriali e micro-dispositivi ad un prezzo competitivo rappresenta una risorsa fondamentale per la realizzazione di biosensori miniaturizzati e versatili.

### 3.5.1 Modifiche genetiche

Nel 1970, a distanza di circa 15 anni dall'introduzione in agricoltura degli erbicidi fotosintetici, è stato pubblicato il primo report sulla resistenza o tolleranza di alcune piante nei confronti di uno specifico erbicida o nei confronti di un'intera classe. Ciò significa che la pianta in questione era in grado di resistere alle dosi applicate di erbicida e che solo una dose molto superiore a quella considerata letale sortiva effetti sulla pianta. Nel 1983 si scoprì che la resistenza agli erbicidi era dovuta alla selezione di una modifica casuale nella struttura della proteina D1 e, precisamente, nel sito di legame dell'erbicida. Alla resistenza ad un erbicida o ad una classe si affiancava, inoltre, una maggiore sensibilità nei confronti di erbicidi di altri gruppi. In seguito, l'idea e la possibilità di progettare modifiche alla struttura della proteina D1 hanno permesso di realizzare biosensori con prestazioni migliori rispetto ai tradizionali biosensori con elemento biologico wild type[50].

La proteina D1, nelle piante superiori, nelle alghe e nei cianobatteri è codificata dal gene *psbA*. Una mutazione nel gene *psbA*, che induce una specifica modifica strutturale alla proteina D1, può conferire resistenza ad un erbicida nell'organismo fotosintetico modificato. Il sito di legame Q<sub>B</sub>, infatti, è una nicchia che si genera in seguito al corretto ripiegamento della proteina D1, la sostituzione di un singolo amminoacido nella catena polipeptidica della proteina D1 genera un differente ripiegamento e una struttura tridimensionale modificata che può sfavorire o favorire il legame con una molecola o una classe di molecole. La conoscenza della struttura tridimensionale ad alta risoluzione della proteina D1, combinata con tecniche di ingegneria genetica, permette di progettare modifiche per aumentare l'affinità tra il PSII e un erbicida. L'utilizzo di questo elemento sensibile modificato permette di poter rilevare con maggiore facilità lo specifico erbicida per cui è stato progettato. Questo significa che il biosensore con elemento sensibile mutante avrà un limite di detection più basso e una selettività maggiore nei confronti dell'erbicida d'interesse[51], [52].

*Chlamydomonas reinhardtii* è il microrganismo prevalentemente utilizzato per la produzione di mutanti che possano essere impiegati in biosensori per il rilevamento di erbicidi fotosintetici. Si tratta di una microalga verde, quindi di una cellula eucariotica in grado di effettuare modifiche post-traduzionali alle proteine che sintetizza. L'elevato tasso di crescita, la semplicità di coltivazione e il completo sequenziamento del suo patrimonio genetico rappresentano i principali vantaggi che hanno reso questo microrganismo un solido punto di riferimento per gli studi di ingegneria genetica. La linea cellulare di *C. reinhardtii* presa come riferimento è denominata IL e corrisponde alla cellula wild type con il gene *psbA* non mutato[53].

L'introduzione di modifiche avviene generalmente al fine di sostituire uno o più aminoacidi che compongono la struttura primaria della proteina D1. I mutanti di *C. reinhardtii* possono essere prodotti con la tecnica della mutagenesi casuale[53], oppure con il metodo del rational design[54],[55].

La mutagenesi casuale o evoluzione diretta in vitro è uno strumento molecolare utilizzato per generare diversità genetica in un punto specifico, imitando e accelerando il processo di evoluzione naturale. La mutagenesi casuale viene eseguita mediante ep-PCR in una sequenza nucleotidica di 400 bps del gene *psbA*. Questa sequenza codifica una regione funzionalmente importante della proteina D1 (Ala153-Ala294). I mutanti casuali così ottenuti vengono poi sottoposti a radiazioni ionizzanti per selezionare i microrganismi che portano una mutazione che aumenti la resistenza a stress ossidativi. Dopo la selezione si procede con una successiva analisi dei mutanti che sono risultati più resistenti alla condizione di stress dovuta ad un'eccessiva illuminazione[53].

La tecnica del rational design, invece, consiste nello studio della struttura tridimensionale della proteina che si vuole modificare e nella simulazione di sostituzioni di aminoacidi per prevedere gli effetti che queste potrebbero avere sulla capacità della proteina di interagire con una molecola di erbicida o con un'intera classe di erbicidi. In Rea et al., 2009[54] e Giardi et al., 2009[55], per esempio, sono stati ottenuti mutanti di *C. reinhardtii* al fine di migliorare l'affinità dell'elemento biologico verso l'atrazina e altri erbicidi fotosintetici. Inizialmente, è stata confrontata la sequenza di aminoacidi della proteina D1 di *C. reinhardtii* con quella di *T. elongatus* ed è stato osservato che le sequenze sono conservate all'87%. Non disponendo di un modello della struttura tridimensionale della proteina D1 di *C. reinhardtii*, è stata sfruttata l'omologia con *T. elongatus* ed è stato usato il modello atomico del PSII di questo cianobatterio per simulare le possibili mutazioni da introdurre nella proteina D1. La struttura tridimensionale di D1 di *C. reinhardtii* è stata ottenuta

attraverso la tecnica della modellazione omologa con lo strumento Basic Local Alignment Search Tool, che usa come punto di partenza la struttura di D1 di *T. elongatus*. Per individuare solo le mutazioni che possono aumentare l'affinità dell'atrazina con il sito di legame  $Q_B$ , sono state simulate sostituzioni solo di aminoacidi che si trovano entro una distanza di 4,5 Å dalla nicchia  $Q_B$ . La simulazione è stata effettuata utilizzando il programma di simulazione molecolare GRAMM, che individua l'area del minimo globale di energia intermolecolare per strutture di diversa accuratezza. Utilizzando GRAMM è stata ottenuta, provando varie sostituzioni di aminoacidi, la struttura a più bassa energia per la proteina D1 legata con l'atrazina e questa è stata utilizzata come modello per la classe di erbicidi delle triazine. Dopo la fase di simulazione, i mutanti sono stati ottenuti con la tecnica di mutagenesi sito-diretta. Nel plasmide pSH5 è stato inserito il gene *psbA* di *C. reinhardtii* con la mutazione che permetta di ottenere la sostituzione aminoacidica desiderata. Il plasmide è stato inserito attraverso micro-porazione in cellule di *C. reinhardtii*, che erano state precedentemente private del gene *psbA*. La selezione dei mutanti è possibile poiché solo le cellule con il plasmide al loro interno possiedono il gene per la produzione della proteina D1 e quindi presentano un apparato fotosintetico attivo.

Le proteine modificate per sostituzione di aminoacidi vengono indicate con una sigla in cui la prima lettera indica l'aminoacido che è stato sostituito, il numero che segue indica la posizione nella catena polipeptidica in cui è avvenuta la mutazione e la seconda lettera indica l'aminoacido che si trova in quella posizione dopo la mutazione. Un esempio di mutante è L275F, in cui la leucina (L) in posizione 275 è stata sostituita con una fenilalanina (F). Esso presenta un'energia di legame con l'atrazina più bassa rispetto alla proteina wild type, come riportato in Tabella 3.8, quindi il mutante ha una maggiore affinità verso l'erbicida d'interesse. Al contrario, il mutante F255Y, nel quale la fenilalanina (F) in posizione 255 è stata sostituita con una tirosina (Y), ha un'affinità inferiore poiché l'energia di legame con l'atrazina risulta maggiore rispetto alla proteina wild type [54], [56].

**Tabella 3.8:** Energia di legame con atrazina di D1 di cellule di *C. reinhardtii* mutanti e wild type. Dati ricavati da [54].

	$E_{bind}$ (Kcal/mol)
Wild type	-49,2
F255Y	-39,6
L275F	-53,3

L'utilizzo nei biosensori di elementi sensibili estratti da mutanti potrebbe permettere di progettare multi-biosensori selettivi per il rilevamento di un solo erbicida o di una classe di erbicidi. La selettività deriva dal confronto della risposta di due biosensori di cui uno ha elemento di riconoscimento sensibile alla sostanza che si desidera selezionare, mentre l'altro ha elemento sensibile resistente. Per esempio, si consideri un mutante resistente alle triazine, poiché l'apparato fotosintetico mutato non è inibito da questa classe di sostanze, la risposta di questo elemento sensibile non sarà influenzata dalla presenza di triazine nel campione da analizzare. Un qualsiasi erbicida fotosintetico appartenente ad un'altra classe, però, verrà rilevato dal mutante. Accoppiando in un multi-biosensore un biosensore con il mutante e uno con un elemento biologico wild type, sarà possibile rilevare selettivamente la presenza di triazine nel campione grazie al confronto della risposta dei

due biosensori. Nel caso specifico, le triazine saranno rilevate selettivamente quando l'elemento wild type presenta inibizione da erbicidi fotosintetici, mentre il mutante no[57].

Per il rilevamento di terbutilazina sono stati individuati alcuni mutanti di *C. reinhardtii* molto promettenti. Le cellule intere di alga modificata sono state utilizzate come elemento di riconoscimento in biosensori a fluorescenza[55], [56]. In Tibuzzi et al. 2007 [56], per esempio, è stato selezionato il mutante di *C. reinhardtii* A251C, che presenta un'elevata affinità nei confronti della terbutilazina. In A251C l'alanina (A) in posizione 251 è stata sostituita con una cisteina (C). Il biosensore è stato realizzato immobilizzando la cellula intera su un supporto di vetro poroso con adsorbimento fisico; il limite di rilevamento nei confronti della terbutilazina è risultato essere di  $1 \cdot 10^{-9}$  M. Questo valore di LOD non è ancora sufficiente ad effettuare misure in campo senza pre-concentrare il campione di acqua. Inoltre, lo stesso limite di rilevamento per la terbutilazina può essere ottenuto immobilizzando tilacoidi di *Spinacia oleracea* su una matrice di BSA-GA, come riportato in Buonasera et al. 2010 [23], per cui l'utilizzo di organismi mutanti in questo caso non fornisce vantaggi tali da rendere accettabile la spesa necessaria alla produzione e coltura di cellule mutanti.

Un risultato più interessante è stato ottenuto in Giardi et al. 2009 [55], in cui è stato selezionato il mutante S268C a causa della sua forte affinità nei confronti della terbutilazina. S268C è un mutante di *C. reinhardtii* in cui un solo aminoacido della proteina D1 è stato sostituito: la serina (S) in posizione 268 è stata sostituita da una cisteina (C). La cellula intera del mutante è stata utilizzata come elemento sensibile di un biosensore per il rilevamento di erbicidi fotosintetici della classe delle triazine e delle uree. Le cellule sono state immobilizzate su un setto di silicone e la presenza di erbicidi è stata rilevata attraverso misure della fluorescenza nel transiente OJIP. Il biosensore ha mostrato un'ottima capacità di rilevare erbicidi della classe delle triazine e delle uree a concentrazioni molto basse, come mostrato in Tabella 3.9. Il limite di rilevamento per questo biosensore nei confronti della terbutilazina è di  $2,5 \cdot 10^{-10}$  M. Considerando che la massa molecolare di questo erbicida è 229,71 g/mol, il limite di rilevamento del biosensore in  $\mu\text{g/L}$  è 0,06, che è quasi la metà del LOD accettabile per rilevare la terbutilazina entro i limiti di legge (0,1  $\mu\text{g/L}$ ). Questo risultato è estremamente importante poiché un biosensore con questo LOD può essere utilizzato nelle misure in campo ed è in grado di discriminare se la concentrazione di terbutilazina in acqua è al di sopra o al di sotto dei limiti imposti dalla legge.

**Tabella 3.9:** Confronto dei limiti di rilevamento in concentrazione molare (M) di S268C e IL nei confronti di alcuni dei più utilizzati erbicidi fotosintetici. Dati tratti da [55].

Erbicida	LOD di S268C (M)	LOD di IL wild type (M)
Atrazina	$6,8 \cdot 10^{-10}$	$2,4 \cdot 10^{-9}$
Terbutilazina	$2,5 \cdot 10^{-10}$	$3,0 \cdot 10^{-9}$
Diuron	$0,8 \cdot 10^{-11}$	$1,0 \cdot 10^{-9}$

Il mutante di *C. reinhardtii* S268C rappresenta un elemento fondamentale da cui partire per avanzare nuove proposte al fine di ottimizzare i biosensori per detection di erbicidi fotosintetici, in particolare per il rilevamento di terbutilazina. La forte affinità che questo mutante ha nei confronti della terbutilazina permette di progettare biosensori che non



necessitano di pre-concentrazione. Questo significa che i biosensori potranno essere usati direttamente sul campo, oppure potranno essere impiegati nella fase di pre-screening, ma con un notevole risparmio di tempo e denaro. S268C è stato impiegato nei biosensori solo come cellula intera, ma la possibilità di estrarre le membrane tilacoidali ed utilizzarle come elemento sensibile è decisamente interessante ed è un'opzione che andrebbe certamente investigata.

### 3.5.2 Nanomateriali

I nanomateriali sono materiali che in scala nanometrica presentano delle diverse caratteristiche chimico-fisiche che non potrebbero essere estrapolate dalle proprietà del bulk dello stesso materiale[58]. Quando i nanomateriali sono impiegati nella costruzione di biosensori, allora si parla di nanobiosensori i cui componenti fondamentali sono: elemento di riconoscimento biologico, trasduttore e nanomateriale, che non devono necessariamente essere distinti l'uno dall'altro[59]. I nanomateriali hanno consentito progressi nella progettazione dei biosensori come la miniaturizzazione, la portabilità e tempi di risposta rapidi. L'elevato rapporto tra superficie e volume e la facile funzionalizzazione della superficie rendono i nanomateriali altamente sensibili consentendo così ai nanobiosensori di raggiungere limiti di rilevamento estremamente bassi. Uno dei principali vantaggi offerti dai nanobiosensori è la possibilità di monitoraggio continuo in loco[60]. I nanobiosensori per il rilevamento di erbicidi offrono altri vantaggi, tra cui sensibilità e selettività elevata.

I nanomateriali che possono essere utilizzati per produrre biosensori vengono classificati in quattro gruppi in base alla loro composizione:

- Materiali a base di carbonio, come grafene, fullereni e nanotubi di carbonio (CNT);
- Materiali formati da metalli, come nanoparticelle di oro, argento e ossidi di metalli;
- Polimeri di dimensioni nanometriche;
- Compositi di nanomateriali o di nanomateriali accoppiati con materiali di dimensioni maggiori.

I nanotubi, le nanoparticelle o i nanocristalli vengono utilizzati principalmente come trasduttori del segnale poiché hanno caratteristiche termiche, elettriche e ottiche distintive e sono utili per aumentare la sensibilità e diminuire il tempo di risposta[60].

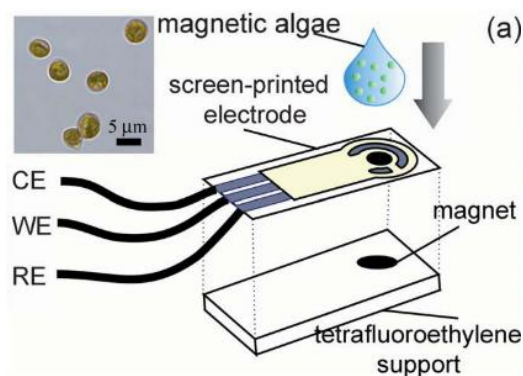
I nanomateriali a base di carbonio hanno elevata conducibilità elettrica e termica, una buona resistenza meccanica e un rapporto superficie/volume molto elevato, queste proprietà rendono questi materiali adatti ad essere impiegati nella costruzione di biosensori[59]. I nanotubi di carbonio sono fogli di grafene ripiegati in modo tale da formare tubi con un diametro che va da 1 a 100 nm. Essi sono costituiti da molecole di carbonio  $sp^2$ . Esistono due tipi di nanotubi di carbonio, quelli formati da un singolo strato (SWCNT) e quelli formati da più tubi di carbonio legati tra di loro da forze di Van der Waals (MWCNT). La disposizione dei tubi che formano i MWCNT può essere a "matrioska", ovvero tubi con diametro diverso sono posizionati in maniera concentrica, oppure si può avere disposizione a "pergamena", in cui un solo foglio è arrotolato più volte su sé stesso a spirale. Nonostante i nanotubi di carbonio siano sostanzialmente fogli di grafene arrotolati, hanno proprietà diverse da questo materiale poiché la curvatura introduce un disallineamento degli orbitali  $\pi$ . I nanotubi di carbonio sono un buon materiale per l'immobilizzazione del materiale biologico[61].

Nei biosensori amperometrici, i CNT svolgono la funzione di trasduttori grazie alla loro elevata conducibilità elettrica, la biocompatibilità e l'elevata area superficiale. Il materiale fotosintetico viene immobilizzato sulla superficie dei CNT attraverso legami covalenti e

non. Per effettuare un'immobilizzazione di tipo chimico, con la formazione di legami covalenti, si modifica la superficie dei nanotubi aggiungendo gruppi funzionali in grado di legarsi con residui liberi dell'elemento biologico. Un esempio molto utilizzato è la funzionalizzazione della superficie dei nanotubi con glutaraldeide, che, come visto in precedenza, si lega ai residui  $\text{NH}_2$  delle proteine di membrana costituenti l'elemento biologico sensibile. Questa tecnica di immobilizzazione ha le proprietà di elevata ritenzione, ma possibile inattivazione dell'attività fotosintetica, in aggiunta, i legami covalenti potrebbero influenzare anche la struttura  $\text{sp}^2$  dei nanotubi. L'immobilizzazione non covalente avviene per adsorbimento diretto del materiale biologico sul CNT, in questo modo il trasporto elettronico avviene in maniera diretta senza la necessità di introdurre mediatori[61].

Le nanoparticelle di metalli nobili, principalmente oro (AuNP) e argento (AgNP) sono state impiegate nella costruzione di vari sensori. Le soluzioni colloidali di AuNP e AgNP hanno una proprietà estremamente particolare, il loro colore, infatti, dipende dalla dimensione delle particelle in sospensione. Queste variazioni di colore possono essere sfruttate in biosensori di tipo ottico. Le nanoparticelle di ossidi metallici, come la magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), rappresentano un altro esempio di nanomateriali contenenti metalli. Queste nanoparticelle hanno una bassa tossicità e sono economiche e possono essere utilizzate come supporto per l'immobilizzazione di materiale biologico[59].

Le nanoparticelle magnetiche (MNP) rappresentano una nuova tecnologia per l'immobilizzazione del materiale biologico. Le cellule, o le altre componenti biologiche fotosintetiche, vengono immobilizzate su MNP stabilizzate con polimeri biocompatibili e poi vengono fissate nel biosensore utilizzando dei magneti che attraggono le MNP. L'immobilizzazione viene realizzata agitando vigorosamente il materiale biologico con una soluzione di MNP in PAH, in seguito, viene usato un magnete per separare il materiale non immobilizzato da quello legato alle MNP. Nella costruzione del biosensore, un magnete viene posto in corrispondenza del punto in cui dovrebbe posizionarsi il materiale fotosintetico, le MNP legate al materiale biologico vengono depositate sul magnete rimanendo in posizione. In Figura 3.14. È mostrato lo schema di un biosensore amperometrico per la detection di triazine in cui cellule di *Chlorella pyrenoidosa* sono state immobilizzate utilizzando delle MNP. Questa tecnica offre il vantaggio di poter rilasciare l'elemento sensibile, una volta che questo ha perso la sua attività, semplicemente rimuovendo il magnete e sostituirlo con nuovo materiale fotosintetico[62].



**Figura 3.14:** Schema di un biosensore amperometrico per il rilevamento di triazine in cui cellule della microalga *Chlorella pyrenoidosa* sono state immobilizzate sull'elettrodo con la tecnica delle MNP. Immagine tratta da [62].

## **4. PROGETTO: REALIZZAZIONE DI UN BIOSENSORE PER IL RILEVAMENTO DI TERBUTILAZINA IN ACQUA AMBIENTALE E VALIDAZIONE ATTRAVERSO SPERIMENTAZIONE SUL CAMPO.**

### **4.1 Abstract**

La proposta progettuale si inserisce in un contesto di sostanziale limitata disponibilità di dati sulla contaminazione da erbicidi fotosintetici delle risorse idriche italiane e propone la sperimentazione e validazione di un nuovo biosensore per la detection di terbutilazina, uno degli erbicidi più diffusi, in campioni di acqua ambientale, al fine di aumentare l'acquisizione di dati di monitoraggio.

I biosensori rappresentano una valida alternativa alle tecniche analitiche "classiche" in quanto sono economici, compatti e relativamente semplici da utilizzare. I biosensori sono costituiti da un elemento biologico, che consente il rilevamento di un analita, e da un trasduttore. Le componenti biologiche dei biosensori per il rilevamento di erbicidi fotosintetici in acqua sono a base di fotosistema II, l'enzima che catalizza le reazioni fotochimiche indotte dalla luce, la cui attività catalitica è inibita dagli erbicidi fotosintetici. Il biosensore proposto è in grado di rilevare la presenza di terbutilazina in acqua e misurarne la concentrazione, rendendo possibile determinare se la concentrazione di tale erbicida supera o meno il valore limite ammesso dalla legge.

Il progetto, sviluppato su un arco temporale di 3 anni, prevede la costruzione di un biosensore amperometrico con elettrodi serigrafati che abbia come elemento sensibile cellule mutate di *C. reinhardtii*, che presentano una spiccata affinità nei confronti della terbutilazina. Se le prove sperimentali, volte a determinare i parametri che caratterizzano il biosensore, verificano l'effettiva possibilità di utilizzare il biosensore in campo, si procederà poi con una fase di sperimentazione sul campo e validazione del biosensore tramite un confronto tra i risultati ottenuti con il biosensore e quelli ottenuti attraverso misurazioni con una tecnica analitica cromatografica sugli stessi campioni.

La realizzazione del progetto prevede la collaborazione di più gruppi di ricerca del Politecnico di Torino, con il coinvolgimento di altre università, ditte ed enti pubblici. In particolare, il ruolo fondamentale di costruzione e caratterizzazione del biosensore viene svolto dal gruppo di ricerca che vede la collaborazione del Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia (DISAT) del Politecnico di Torino con l'Istituto Italiano di Tecnologia (IIT).

L'obiettivo del progetto non è solamente realizzare un biosensore per la detection di erbicidi fotosintetici che possa essere agilmente utilizzato sul campo, ma soprattutto dimostrare che utilizzando biosensori di questo tipo si ha la possibilità di monitorare la contaminazione delle risorse idriche in maniera più efficiente e relativamente meno costosa rispetto alle tecniche attualmente impiegate.

### **4.2 Descrizione dettagliata della proposta progettuale**

#### **4.2.1 Stato dell'arte**

L'utilizzo massivo di pesticidi in agricoltura rappresenta un grande problema ambientale. Numerosi bacini idrici superficiali e sotterranei vengono contaminati da pesticidi, tra i quali gli erbicidi fotosintetici rappresentano un pericolo notevole per l'ecosistema e per la salute umana a causa della loro tossicità e della loro diffusione[3], [5], [6]. La Water

Framework Directive (WFD)[2] stabilisce che in Europa la concentrazione massima in acqua debba essere di 0,1 µg/L per singolo erbicida e di 0,5 µg/L per miscele di erbicidi; inoltre gli Stati europei si impegnano a realizzare un piano di monitoraggio. I rapporti biennali dell'ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale)[7], tuttavia, evidenziano come in Italia il monitoraggio sia estremamente limitato, soprattutto nelle regioni del centro-sud, sia per numero di siti analizzati sia per numero di sostanze ricercate. In aggiunta, un numero non trascurabile di bacini idrici presenta concentrazione di erbicidi fotosintetici superiore ai limiti di legge. La terbutilazina, appartenente alla classe delle triazine, è uno degli erbicidi fotosintetici più frequentemente rilevati in concentrazioni elevate.

Una delle motivazioni per cui le analisi sui campioni d'acqua vengono effettuate con così scarsa efficienza risiede nella complessità dei metodi di misura attualmente utilizzati. La concentrazione di erbicidi nei campioni d'acqua viene misurata in laboratorio con tecniche cromatografiche, che richiedono una strumentazione complessa e costosa, personale specializzato e varie fasi di pretrattamento del campione[23]. In questo contesto, i biosensori per il rilevamento di erbicidi fotosintetici rappresentano una valida alternativa in quanto sono economici, compatti e relativamente semplici da utilizzare. Essi possono essere impiegati per misure di pre-screening oppure di monitoraggio sul campo[26], [28].

Un biosensore è un dispositivo in grado di fornire informazioni analitiche quantitative impiegando un elemento di riconoscimento biologico collegato ad un sistema di trasduzione. Gli elementi costituenti il biosensore sono: l'elemento sensibile, che rileva la concentrazione di analita, e il trasduttore, che traduce il segnale dell'elemento sensibile in uno di tipo ottico o elettrico[27]. La detection di erbicidi fotosintetici sfrutta come elemento di riconoscimento biologico componenti biologiche in cui è presente il fotosistema II (PSII), un complesso enzimatico che si trova nelle membrane tilacoidali di organismi fotosintetici e che catalizza le reazioni fotochimiche di fotolisi dell'acqua attraverso le quali l'energia solare viene trasformata in energia chimica. L'energia luminosa favorisce una serie di reazioni a cascata in cui gli elettroni donati dall'acqua vengono trasportati fino all'accettore finale, che nel PSII è il plastochinone legato al sito  $Q_B$  del PSII[12], [19]. Gli erbicidi fotosintetici si legano al sito  $Q_B$  nel PSII inibendo le reazioni fotosintetiche attraverso il blocco della catena di trasporto degli elettroni[22]. L'elemento sensibile viene inibito in maniera proporzionale alla concentrazione di analita e il trasduttore traduce il segnale di inibizione in un segnale di altra natura[25].

I biosensori per il rilevamento di erbicidi fotosintetici sono principalmente di tipo amperometrico o a fluorescenza. Con i biosensori di tipo amperometrico vengono effettuate prove amperometriche in cui si misura una corrente a tensione costante[37]. Il flusso elettronico delle reazioni fotosintetiche attivate dalla luce e catalizzate dal PSII viene tradotto in un segnale di corrente, che viene misurato da un potenziostato. L'erbicida legandosi al PSII blocca la catena di trasporto elettronico e la corrente misurata diminuisce proporzionalmente all'entità di questo blocco fornendo informazioni sulla concentrazione dell'erbicida[39]. La risposta di questi biosensori è relativamente semplice da interpretare, il potenziostato viene collegato ad un calcolatore su cui deve essere installato un programma in grado di rappresentare graficamente le variazioni di corrente misurate nel tempo[40]. Il valore della corrente in assenza di erbicida viene confrontato con quello rilevato con soluzioni a concentrazione nota di erbicida e si costruiscono delle curve di inibizione in funzione della concentrazione[40]. I biosensori amperometrici con elettrodo serigrafato sono semplici da realizzare e compatti, questa configurazione è molto utilizzata con elementi sensibili di varia natura[23], [25], [29], [32].

Nei biosensori a fluorescenza, invece, il fenomeno della fluorescenza delle clorofille del PSII viene sfruttato per risalire alla concentrazione di erbicida in acqua. In presenza di analita, essendo bloccata la catena di trasporto elettronico nel PSII, l'energia solare assorbita è incanalata in processi non fotochimici, tra cui l'emissione di fluorescenza[41]. Le prove di fluorescenza possono essere realizzate seguendo vari protocolli, il metodo del transiente OJIP è il più utilizzato. Le curve di induzione della fluorescenza in funzione del tempo presentano quattro punti fondamentali, indicati come O, J, I e P, registrati dopo intervalli prestabiliti. Confrontando la posizione dei punti in una prova in assenza di erbicida e in una con una soluzione a concentrazione nota di erbicida si ricava la fluorescenza variabile, un parametro che ha andamento lineare in funzione della concentrazione di erbicida[42].

L'individuazione dell'elemento di riconoscimento biologico è il primo passo nella progettazione del biosensore. È possibile utilizzare preparati puri di PSII, tilacoidi estratti da differenti organismi oppure cellule intere di microalghe o cianobatteri. Componenti biologiche più complesse presentano una maggiore resistenza al trasporto di materia attraverso le membrane, per cui possono fornire una risposta lenta, ma, allo stesso tempo, essendo l'enzima conservato nel suo ambiente nativo, l'attività fotosintetica delle strutture più complesse è tendenzialmente conservata più a lungo[37]. In aggiunta, i processi di purificazione del PSII o dei tilacoidi sono complessi e costosi[38]. I range di stabilità vanno da meno di un'ora a 8 ore per il PSII purificato, da 8 a 16 ore per i tilacoidi isolati e fino a 3 settimane per cellule microalgali come *Chlorella vulgaris*, in condizioni di stoccaggio a 4°C[32].

Nel biosensore il materiale biologico viene immobilizzato su un supporto per favorire il contatto con il trasduttore. La tecnica di immobilizzazione utilizzata può essere di tipo fisico o chimico[23]. I metodi fisici che possono essere adottati sono adsorbimento e intrappolamento, queste strategie sono poco costose, semplici, ma con una capacità di ritenzione limitata. La tecnica dell'intrappolamento è da preferirsi all'adsorbimento per garantire una maggiore ritenzione del materiale biologico, in particolare, l'intrappolamento su alginato, gelatina oppure PVA-SbQ ha perdite basse. L'immobilizzazione di tipo chimico ha elevata capacità di ritenzione, ma i legami covalenti che vengono instaurati rischiano di ridurre l'attività fotosintetica dell'elemento biologico. L'immobilizzazione su matrice di glutaraldeide (GA) garantisce minima perdita dell'attività fotosintetica e basse perdite del materiale immobilizzato. Spesso si aggiunge anche siero albumina bovina (BSA) come agente protettivo dell'attività dell'elemento immobilizzato[44], [45], [47]. Recentemente, i nanomateriali sono stati impiegati come supporti di immobilizzazione di materiale fotosintetico per biosensori. Un'applicazione promettente è l'immobilizzazione su magnetite attraverso la funzionalizzazione delle cellule con nanoparticelle magnetiche (MNP). Una volta persa la loro attività, le cellule possono essere eliminate dal biosensore rimuovendo il magnete[62].

La progettazione di elemento sensibile, metodo di immobilizzazione e trasduttore determina le caratteristiche del biosensore, che vengono selezionate in base allo scopo finale per cui il biosensore viene costruito. I parametri principali per la valutazione delle prestazioni del biosensore sono limite di rilevamento e stabilità[27]. I biosensori più promettenti hanno tutti un limite di detection di uguale ordine di grandezza, ovvero  $10^{-9}$  M. In Masojídek et al. 2011[40], per esempio, è stato costruito un biosensore amperometrico immobilizzando un preparato di PSII estratto da cianobatterio *Synechococcus elongatus* su una matrice di GA-BSA-glicerolo; il limite di detection ottenuto per l'atrazina, una molecola simile alla terbutilazina, è di  $1,6 \cdot 10^{-9}$  M. In Buonasera et al. 2010 [23] un biosensore amperometrico con tilacoidi isolati da *Spinacia*

*oleracea* immobilizzati su una matrice di GA-BSA ha fornito per la stessa molecola un limite di rilevamento di  $1,0 \cdot 10^{-9}$  M. Le cellule dell'alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* immobilizzate per adsorbimento in un biosensore a fluorescenza hanno mostrato risultati interessanti, raggiungendo un limite di detection di  $7,30 \cdot 10^{-10}$  M[23].

Una soluzione spesso adottata recentemente è l'immobilizzazione di cellule intere di cianobatteri o microalghe. Nel 2019 Tucci et al.[38] hanno realizzato un biosensore amperometrico per la detection di erbicidi fotosintetici immobilizzando cellule di cianobatterio *Anabaena variabilis* su alginato, il mediatore artificiale p-benzochinone è stato immobilizzato sullo stesso supporto per favorire il trasporto di elettroni tra gli elettrodi. In questo biosensore la stabilità e la semplicità operativa legate all'impiego di cellule intere sono accoppiate alla rilevazione rapida e precisa del trasduttore amperometrico[38]. Il limite di rilevamento ottenuto è  $6,4 \cdot 10^{-8}$  M per l'atrazina, ma le ricerche sulla stabilità a lungo termine non sono state ancora realizzate. In uno studio pubblicato nel 2020 Boron et al.[25] hanno costruito un biosensore portatile per la detection di erbicidi fotosintetici testando due diverse microalghe. Il dispositivo è stato costruito con elettrodi serigrafati inseriti in una cella di flusso, il risultato è un biosensore compatto e portatile. Il limite di rilevamento per l'atrazina ottenuto utilizzando come elemento sensibile *Scenedesmus acutus* è  $1,4 \cdot 10^{-6}$  M, mentre con *Monoraphidium contortum* è  $1,1 \cdot 10^{-7}$  M.

Un altro aspetto di particolare interesse è la possibilità di modificare l'elemento biologico nel sito di legame dell'erbicida per ottenere elementi di riconoscimento con caratteristiche di selettività e sensibilità maggiori[51]–[53]. Risultati promettenti sono stati ottenuti utilizzando come elemento sensibile cellule mutate dell'alga *C. reinhardtii*. Il mutante S268C ha mostrato una sensibilità verso la terbutilazina di  $2,5 \cdot 10^{-10}$  M e, in generale, una buona selettività nei confronti di tutta la classe delle triazine. In aggiunta, il biosensore, in cui le cellule sono state immobilizzate per adsorbimento, ha mantenuto per 4 settimane quasi inalterata l'attività fotosintetica. Le prove di stabilità sono state effettuate bagnando continuamente il materiale biologico con medium Tris-Acetato-Fosfato a temperatura ambiente[55].

I biosensori per il rilevamento di erbicidi fotosintetici hanno fornito misure apprezzabili con soluzioni a concentrazione nota di erbicida e anche con campioni di acqua da bacini idrici fluviali[25], [36], [57]. L'utilizzo di biosensori come strumento di misura permette di ottenere misure affidabili con un risparmio di tempo e di denaro rispetto ai protocolli di misura attualmente utilizzati, poiché si può impiegare personale relativamente meno specializzato e non sono necessarie apparecchiature complesse e costose. Le limitazioni sono principalmente legate alla stabilità dell'elemento sensibile e la sensibilità necessarie per effettuare misure su campioni da bacini idrici superficiali o sotterranei[26].

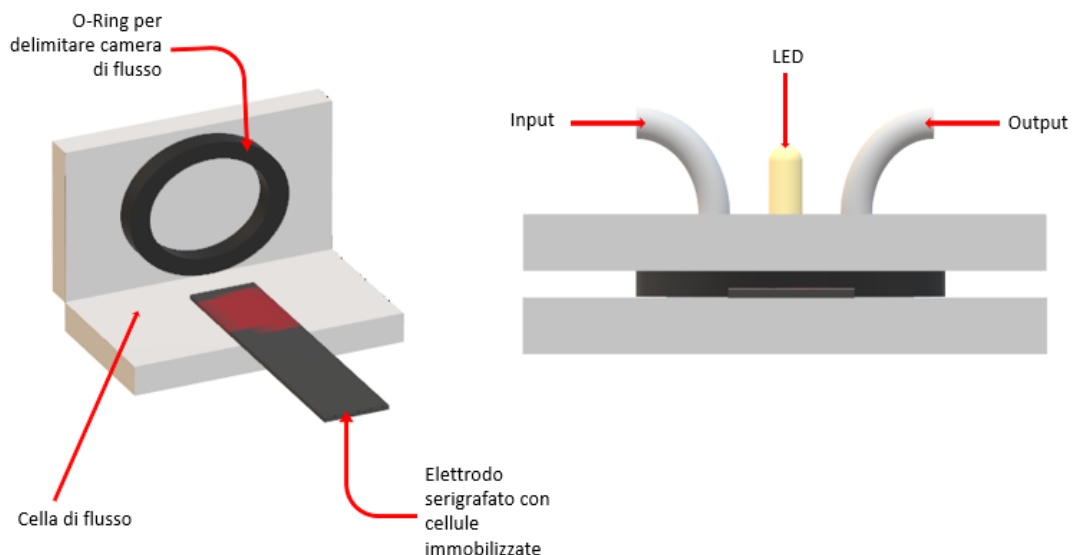
#### **4.2.2 Obiettivi e metodologie della proposta**

Con particolare riferimento alla situazione italiana, in cui il monitoraggio delle acque è estremamente limitato e la conoscenza dell'effettivo stato di contaminazione è molto ridotta, se non quasi assente in alcune regioni, il progetto si ripropone di dimostrare che i biosensori per la detection di erbicidi fotosintetici possono essere utilizzati efficacemente nelle misure sul campo per estendere il numero di bacini idrici controllati e per determinare se in essi i limiti di concentrazione imposti dalla legge per erbicidi fotosintetici sono superati o meno. Il principio che anima il progetto è la necessità di ampliare le conoscenze sull'effettivo stato di inquinamento dovuto ad erbicidi fotosintetici delle risorse idriche italiane. La causa principale di questa mancanza di dati è la scarsa disponibilità di risorse economiche per le attrezzature di laboratorio, i reagenti, il

personale specializzato e la necessità di inviare in laboratori specializzati i campioni di acqua ambientale prelevati. Di conseguenza, l'obiettivo principale del progetto è individuare un metodo di misura semplice, affidabile ed economico.

Il progetto si compone di due fasi, di cui la prima si svolge in laboratorio e la seconda si realizza in parte sul campo e in parte in laboratorio. Nella prima parte del progetto si ambisce a costruire un biosensore in grado di rilevare in campioni di acqua la terbutilazina a concentrazioni inferiori ai limiti di legge. Durante la seconda fase, si verifica, attraverso misure sul campo, che il biosensore possieda le caratteristiche di affidabilità desiderate. L'obiettivo è quello di effettuare un numero statisticamente significativo di misure in campo per validare l'utilizzo del biosensore volto ad ottenere un'immagine più dettagliata dell'entità dell'inquinamento da erbicidi e validarne l'applicabilità su scala nazionale.

Durante la prima fase del progetto, si procede inizialmente con l'acquisto degli elementi fondamentali per la costruzione del biosensore e con la propagazione del mutante utilizzato come elemento sensibile. Il biosensore sarà di tipo amperometrico con elettrodi serigrafati in grafite e Ag/AgCl, le cellule intere del mutante S268C di *C. reinhardtii* saranno immobilizzate su alginato per intrappolamento con il p-benzochinone, usato come mediatore nel trasporto di elettroni. Recentemente è stato dimostrato che il p-benzochinone migliora il trasferimento extracellulare di elettroni[38], per cui è stato ritenuto opportuno aggiungerlo come mediatore nel biosensore. L'aggiunta di carboni attivi è necessaria per l'immobilizzazione del mediatore. L'elettrodo è inserito in una cella di flusso realizzata appositamente, come schematizzato in Figura 4.1. Dopo essere stato utilizzato, l'elettrodo viene rimosso dalla camera di flusso e sostituito con uno su cui il materiale biologico è stato appena immobilizzato. Nella cella si inserisce anche un LED necessario ad attivare i processi fotosintetici. Si procede, quindi, con l'assemblaggio del biosensore e con la realizzazione dell'apparato sperimentale per effettuare le misure.



**Figura 4.1:** Schema dei componenti fondamentali del biosensore.

Il sistema di misura necessita di una pompa peristaltica dotata di tubazioni, un contenitore per la soluzione di erbicida e uno per la soluzione tampone, con cui si lava il biosensore, un potenziostato, che viene collegato al biosensore e ad un computer. Sarà necessario uno switch per l'alimentazione al biosensore.

Lo step successivo consiste nella misura della concentrazione di terbutilazina in soluzioni a concentrazione nota e, dopo aver ottenuto un numero statisticamente significativo di dati, si costruiscono le curve di taratura e si identificano i parametri che determinano le prestazioni del biosensore. Dovranno quindi essere effettuate delle prove di stabilità in condizioni di stoccaggio. Per agevolare le misura da parte di personale meno specializzato, si procede con la stesura di un codice che, basandosi sulle curve di taratura ottenute in laboratorio, traduca i picchi di corrente misurati con il biosensore in un messaggio in cui viene indicato se il limite di legge di concentrazione è superato o meno.

La seconda fase del progetto ha l'obiettivo di provare che il biosensore fornisce misure affidabili quando utilizzato sul campo. Il primo passo è l'acquisto di un filtro idoneo per eliminare eventuale particolato che potrebbe provocare torbidità dell'acqua prelevata. Segue la costruzione dell'apparato di misura che verrà utilizzato sul campo. Infine, il personale di laboratorio dovrà testare il funzionamento del biosensore sul campo e inviare i campioni prelevati in laboratorio per poter confrontare i risultati ottenuti in campo con il biosensore con quelli ottenuti attraverso tecniche analitiche di laboratorio consolidate. Lo scopo di questo confronto è di validare ulteriormente l'affidabilità del biosensore.

Nel caso in cui durante la realizzazione del progetto si riscontrino che il biosensore non presenti le caratteristiche desiderate o che non sia possibile utilizzarlo per misure in campo, invece di procedere con la metodologia sopra esposta, si seguirà una via alternativa. La proposta alternativa consiste nel prelevare campioni d'acqua ambientale, filtrarli e pre-concentrarli in laboratorio e analizzarli con il biosensore. In questo caso, si verificherebbe se il biosensore potrebbe essere utilizzato per effettuare un pre-screening sui campioni di acqua ambientale. In caso positivo, il biosensore garantirebbe un risparmio in termini di denaro e tempo riducendo il numero di campioni da analizzare con tecniche analitiche classiche, attraverso una selezione dei soli campioni che risultano contaminati già nelle prove di pre-screening. Le metodologie di questa possibile soluzione non verranno approfondite nel dettaglio, ma garantirebbero di portare a termine il progetto e di ottenere risultati interessanti anche nel caso in cui la realizzazione della proposta principale presenti problemi non previsti e insormontabili.

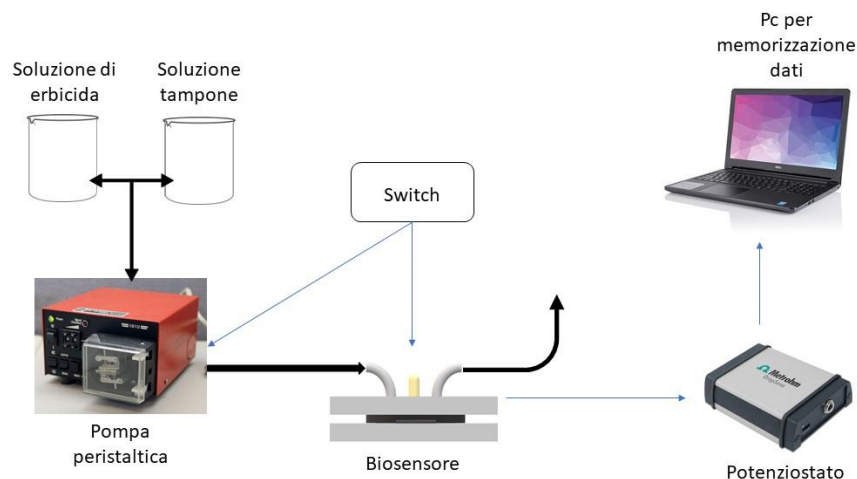
Di seguito, si presentano schematicamente informazioni più dettagliate riguardo la metodologia di svolgimento del progetto.

#### Obiettivo 1: Costruzione e caratterizzazione del biosensore

- Rigenerazione e propagazione del mutante S268C in laboratorio seguendo il metodo riportato in [54].
- Mantenimento del mutante in tampone Tris-Acetato-Fosfato (TAP) addizionato di 10 mM NaHCO<sub>3</sub> in luce bianca a temperatura di 24° C e agitazione a 150 rpm, come riportato in [54].
- Acquisto di alginato, CaCl<sub>2</sub> e p-Benzochinone da Sigma Aldrich[IV], acquisto di carboni attivi da Fisher Scientific[38].
- Acquisto elettrodo serigrafato in grafite e Ag/AgCl (Screen-Printed Carbon Electrode BE2180206D1/001) da Gwent UK[V][25].
- Acquisto LED e camera di flusso su misura oppure costruzione di camera di flusso in Delrin®[55].
- Acquisto pompa peristaltica da Watson Marlow 101U/R[VI][55], potenziostato portatile da Metrohm[29].
- Assemblaggio del biosensore



- Immobilizzazione di S268C e p-benzochinone in soluzione di alginato e carboni attivi con metodo descritto in [38]
- Deposizione del preparato su elettrodo
- Immersione dell'elettrodo in soluzione di  $\text{CaCl}_2$  per 1 s come descritto in [38]
- Posizionamento dell'elettrodo nella cella di flusso.
- Assemblaggio apparato di misura in laboratorio come descritto in Figura 4.2.
- Misure con soluzioni a concentrazione nota di terbutilazina (acquistata da Sigma Aldrich) in soluzione con tampone Tris/HCl 0,5 M (pH 7,1) a temperatura ambiente [38].  
Le concentrazioni testate saranno:  $1 \cdot 10^{-11}$ ,  $5 \cdot 10^{-11}$ ,  $1 \cdot 10^{-10}$ ,  $2.5 \cdot 10^{-10}$ ,  $5 \cdot 10^{-10}$ ,  $1 \cdot 10^{-9}$ ,  $5 \cdot 10^{-9}$ ,  $1 \cdot 10^{-8}$ ,  $5 \cdot 10^{-8}$  M.  
Repliche statisticamente significative verranno raccolte per ogni concentrazione.
- Costruzione di curve di taratura, determinazione LOD, range di lavoro e sensibilità, utilizzando metodo descritto in [29].
- Scrittura di un programma di lettura del superamento o meno del limite di legge di concentrazione dell'erbicida in base alla risposta in corrente.
- Prove di stabilità per 4 settimane a temperatura ambiente con biosensore immerso nel medium TAP, come riportato in [55].



**Figura 4.2:** Schema dell'apparato di misura.

## Obiettivo 2: Validazione del biosensore nelle misure in campo

- Acquisto pre-filtro Whatman® glass microfiber filter Grade 934-AH® RTU da Sigma Aldrich e filtro Cellulose Nitrate Membrane Filters / Type 11306, 0.45  $\mu\text{m}$  pore size, 142 mm diameter da Sartorius[VII][36].
- Definizione sistema di misura da usare in campo.
- Definizione protocollo di misura.
- Definizione di una mappa dei siti da analizzare e di un calendario delle misure.
- Misure con biosensore sul campo per determinare superamento o meno dei limiti di concentrazione e memorizzazione risultati.

- Invio campioni al laboratorio.
- Analisi per misure di concentrazione della terbutilazina con metodo analitico classico.
- Confronto dei risultati ottenuti con i due metodi di misura per validare biosensore.
- Pubblicazione risultati ottenuti.

Lo svolgimento della seconda fase del progetto si realizza solo nel caso in cui nella prima fase si siano raggiunti risultati soddisfacenti per le prestazioni del biosensore in termini di limite di rilevamento, che deve risultare inferiore ai limiti di legge per la terbutilazina, in termini di stabilità che deve permettere agli operatori di giungere sul campo ed effettuare una misura nel sito scelto, e in termini di affidabilità, ovvero di veridicità dei valori rilevati dal biosensore.

### 4.3 Articolazione del progetto in work-package

#### 4.3.1 Unità di ricerca ed enti coinvolti, modalità di collaborazione

La realizzazione del progetto attraverso il raggiungimento dei due obiettivi principali, stabiliti nel paragrafo precedente, richiede la collaborazione di più gruppi di ricerca con competenze specifiche, aziende ed enti pubblici. I criteri principali di scelta delle unità di ricerca coinvolte sono competenza ed esperienza nell'ambito delle mansioni assegnate. Inoltre, i laboratori che svolgono un ruolo sostanziale nel progetto sono tutti situati a Torino e lavorano abitualmente con o per il Politecnico di Torino. La vicinanza fisica dei vari laboratori coinvolti ha lo scopo di favorire la cooperazione e la comunicazione. La coordinazione del progetto è affidata al gruppo di ricerca del Center for Sustainable Future Technologies CSFT-DISAT PoliTo.

Le unità di ricerca e gli enti coinvolti nella realizzazione del progetto sono:

- **Center for Sustainable Future Technologies CSFT-DISAT PoliTo, Torino**  
Il laboratorio dell'Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), che ha l'obiettivo di promuovere l'eccellenza nella ricerca di base e in quella applicata, in collaborazione con personale DISAT PoliTo conduce una ricerca basata sulla sostenibilità e improntata sulla tutela ambientale [VIII].
- **Institute for Plant Physiology, Martin-Luther University, Weinbergweg, Germania**  
Istituto di ricerca universitario in cui uno dei principali ambiti di ricerca è lo studio del processo fotosintetico attraverso l'indagine degli effetti indotti dalla mutazione di geni fotosintetici [IX].
- **System Biology Group (DAUIN, PoliTo), Torino**  
Gruppo di ricerca del Politecnico di Torino che studia algoritmi legati a problemi biologici [X].
- **Biosensor SRL, Roma**  
Azienda che offre soluzioni tecnologiche per lo sviluppo di biosensori e servizi per l'analisi delle acque e degli alimenti [XI].
- **Laboratorio Cartografia Tematica e Idrogeologia Applicata (DIATI, PoliTo), Torino**  
Laboratorio del Politecnico di Torino che si occupa di monitoraggio di sorgenti e acquiferi e delle ispezioni di pozzi; dispone di strumenti per il campionamento delle risorse idriche [XII].
- **Laboratorio Ricerche Idrogeologiche (DIATI, PoliTo), Torino**

Laboratorio del Politecnico di Torino che si occupa di analisi su acque sotterranee e superficiali [XIII].

**Arpa Piemonte, Struttura Semplice Sistema Informativo Ambientale e Geografico, Comunicazione e Educazione Ambientale**

Ente pubblico che si occupa di analisi, informazione, formazione e educazione ambientale [XIV].

In Tabella 4.1 si riportano le informazioni principali dei gruppi di ricerca coinvolti nel progetto.

**Tabella 4.1:** Lista delle unità partecipanti al progetto

Numero	Nome dell'unità (Sigla)	Tipologia	Nazione
1 (Coord.)	Center for Sustainable Future Technologies (CSFT-DISAT)	HES	Italia
2	Institute for Plant Physiology (IPP)	HES	Germania
3	System Biology Group (SBG)	HES	Italia
4	Biosensor SRL (Bio)	SME	Italia
5	Laboratorio Cartografia Tematica e Idrogeologia Applicata (LCTIA)	HES	Italia
6	Laboratorio Ricerche Idrogeologiche (LRI)	HES	Italia
7	Arpa Piemonte (ARPA)	PA	Italia

Nella categoria 'Tipologia': HES (High Education School)=Università, SME (Small Medium Enterprise)=Piccola media impresa, PA (Public Authority)=Ente pubblico.

Il gruppo di ricerca dell'**Institute for Plant Physiology (IPP)** ha collaborato alla produzione di mutanti di *C. reinhardtii* al fine di migliorarne l'affinità verso gli erbicidi fotosintetici in Rea et al. 2009[54] e in Giardi et al. 2009[55]. È stato selezionato per il progetto in quanto, avendo già generato la linea cellulare mutante S268C di *C. reinhardtii*, possiede il ceppo di alga mutata stoccato in maniera idonea a lunghe conservazioni. Il compito assegnato a questa unità di ricerca è rigenerare i mutanti, riadattando le cellule mutanti alle condizioni di laboratorio e verificarne la stabilità genetica (tramite PCR) e fenotipica. Successivamente, il ceppo mutato dovrà essere inviato al Center for Sustainable Future Technologies di Torino insieme al protocollo per la propagazione e il mantenimento nel tempo della linea cellulare. All'inizio della seconda fase del progetto, il ceppo mutante dovrà essere inviato alla ditta Biosensor SRL (Bio).

L'unità operativa costituita da **Center for Sustainable Future Technologies** e **DISAT** del Politecnico di Torino (CSTF-DISAT), è stata selezionata per il progetto sulla base del lavoro svolto nell'ambito dei biosensori per la detection di erbicidi fotosintetici in acqua. Il gruppo di ricerca, che è composto da personale dell'Istituto Italiano di Tecnologia in collaborazione con ricercatori del Dipartimento di Scienza Applicata (DISAT) del Politecnico di Torino, svolge un ruolo fondamentale nella prima fase del progetto. La missione dell'unità di ricerca è coordinare i gruppi partecipanti e gestire le tempistiche di svolgimento delle attività e le collaborazioni tra parti. Periodicamente dovranno essere organizzati meeting che coinvolgano tutti i gruppi di ricerca per verificare che il progetto proceda come programmato e, in caso contrario, per individuare una nuova strategia per

raggiungere gli obiettivi proposti. Le riunioni potrebbero essere semestrali, o più ravvicinate, anche in dipendenza degli eventuali ostacoli incontrati dai vari gruppi di lavoro durante il progetto. Al termine di ogni meeting il Center for Sustainable Future Technologies-DISAT provvederà alla scrittura di un report.

Oltre al coordinamento e management, il **Center for Sustainable Future Technologies-DISAT** gioca un ruolo fondamentale nella prima parte del progetto. Innanzitutto, la linea cellulare di mutante verrà propagata da questo gruppo di ricerca grazie alla collaborazione dei biologi che fanno parte dell'unità operativa. Inoltre, il Center for Sustainable Future Technologies-DISAT si occuperà di raggiungere il primo obiettivo del progetto seguendo la metodologia descritta nel paragrafo precedente. Dovrà quindi essere costruito il biosensore e dovranno essere effettuate tutte le prove sperimentali necessarie alla definizione delle sue prestazioni.

Il **System Biology Group (SBG)**, che fa parte del Dipartimento di Automatica e Informatica del Politecnico di Torino, è coinvolto nel progetto sulla base delle precedenti collaborazioni con gruppi di biologi volte a sviluppare strumenti computazionali utili nell'ambito della genomica e proteomica. Nel contesto del progetto, il compito di questo gruppo di lavoro è scrivere un codice che permetta di tradurre il valore di corrente dei picchi registrati dal biosensore in un semplice messaggio di superamento o meno del limite di legge della concentrazione di erbicida, basandosi sulle curve di taratura ottenute sperimentalmente.

Una volta terminata la prima fase del progetto, se il prototipo del biosensore realizzato dal CSFT-DISAT presenterà caratteristiche sufficienti per la sperimentazione sul campo, si procederà con la seconda fase. Per il raggiungimento dell'obiettivo 2 sarà necessaria la collaborazione di più unità di lavoro.

La ditta **Biosensor SRL** di Roma viene coinvolta nel progetto poiché ha già collaborato alla realizzazione del biosensore utilizzato in Giardi et al. 2009[55] e, in aggiunta, attualmente produce biosensori per il rilevamento di inquinanti in acqua simili al biosensore proposto in questo progetto. Il compito di Biosensor è produrre un numero di biosensori sufficiente a realizzare la campagna di misure sul campo e inviarli al Laboratorio di Cartografia Tematica e Idrogeologia Applicata di Torino. Il mutante usato come elemento sensibile del biosensore verrà fornito dall'Institute for Plant Physiology e verrà propagato dal gruppo di ricerca della ditta.

Il **Laboratorio di Cartografia Tematica e Idrogeologia Applicata** appartiene al Dipartimento di Ingegneria dell'Ambiente, del Territorio e delle Infrastrutture del Politecnico di Torino ed è stato selezionato per il progetto per l'esperienza nel monitoraggio di risorse idriche della Regione Piemonte e Val d'Aosta. Inizialmente, questa unità di ricerca collabora con il CSFT-DISAT per definire il protocollo di misura da applicare sul campo. In secondo luogo, la mansione del gruppo di ricerca consiste nella definizione di una mappa dei siti da analizzare e di un calendario dello svolgimento delle misure. Inoltre, sarà l'unità di ricerca di questo laboratorio ad effettuare le misure in campo e inviare i risultati delle misurazioni al CSFT-DISAT e i campioni di acqua ambientale prelevati al laboratorio che effettuerà le analisi di controllo con metodo cromatografico.

Il **Laboratorio Ricerche Idrogeologiche**, anch'esso appartenente al Dipartimento di Ingegneria dell'Ambiente, del Territorio e delle Infrastrutture del Politecnico di Torino, è stato coinvolto nel progetto poiché si occupa di analizzare campioni di acqua ambientale tramite prove cromatografiche. Il compito del gruppo di ricerca è misurare tramite cromatografia la concentrazione di terbutilazina nei campioni di acqua ambientale precedentemente prelevata e inviare i valori ottenuti al CSFT-DISAT.

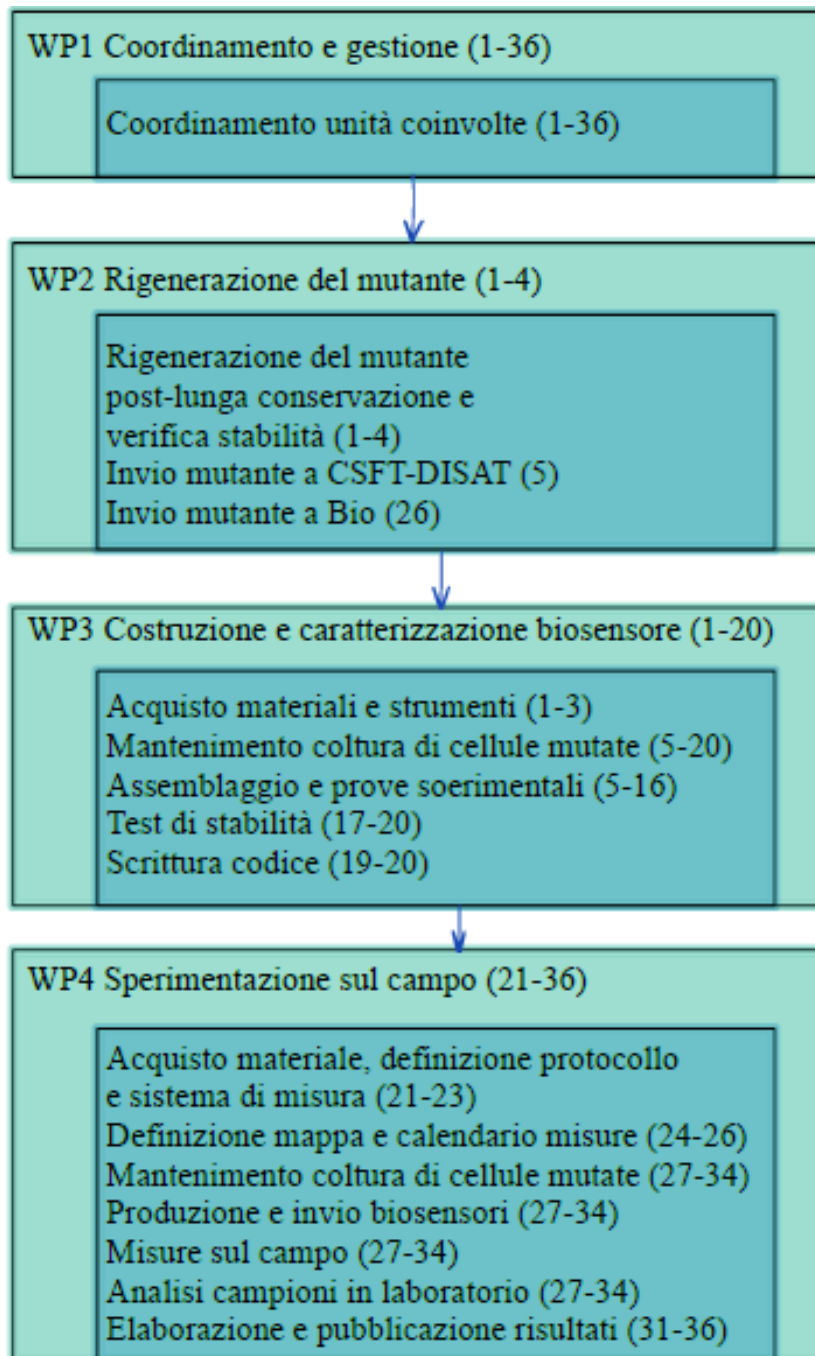
In ultimo, il progetto prevede una collaborazione tra CSFT-DISAT e **ARPA Piemonte** per un lavoro di raccolta, elaborazione e presentazione dei risultati ottenuti dalle prove in laboratorio con il biosensore e dalle misure sul campo confrontate con i valori misurati analiticamente. La pubblicazione dell'esito del progetto ha il fine di sensibilizzare sulla problematica della limitata disponibilità di misure della contaminazione da pesticidi nei bacini idrici sul territorio italiano e lo scopo di aprire la strada per l'uso del biosensore come strumento alternativo per il monitoraggio della contaminazione da erbicidi fotosintetici. In particolare, viene coinvolta la sezione Comunicazione ed Educazione Ambientale dell'ARPA Piemonte.

#### **4.3.2 Pianificazione delle attività di progetto**

Il progetto si svolge su un arco temporale di 3 anni. La prima fase, in cui l'obiettivo è quello di costruire e caratterizzare il biosensore, termina dopo 20 mesi di sperimentazione. La maggior parte delle attività, come preventivato, viene realizzata dal CSFT-DISAT. I primi 3 mesi sono dedicati all'organizzazione delle attività e acquisto del materiale necessario, i seguenti 12 mesi vedono svolgersi uno dei task fondamentali del progetto, ovvero la costruzione del biosensore, il suo inserimento nell'apparato di misura e le prove sperimentali per la determinazione dei parametri del biosensore. I 4 mesi successivi sono spesi per i test di stabilità.

La seconda fase, che invece si ripropone di validare il biosensore sul campo, si realizza nella seconda metà dei 3 anni con la collaborazione di più unità di lavoro. Il task più importante della seconda fase è la sperimentazione sul campo, che si protrae per un periodo di 8 mesi. In contemporanea, avviene la produzione di nuovi biosensori che vengono continuamente forniti al Laboratorio Cartografia e Idrogeologia che realizza le misure. In aggiunta, nello stesso periodo il Laboratorio Ricerche Idrogeologiche effettua misure con metodo analitico "classico" dei campioni prelevati. Per quanto il calendario delle misure verrà stabilito in corso d'opera da personale specializzato, è fondamentale che l'arco temporale in cui si svolgono le misure sul campo vada da febbraio ad agosto/settembre, poiché è stato osservato che in questi mesi, a causa dell'intensificarsi dell'attività agricola, la concentrazione di terbutilazina è massima nelle risorse idriche superficiali[63].

In Figura 4.3 sono schematizzati i work-packages in cui è suddiviso il progetto con i principali task di ogni sezione. In Tabella 4.2 sono schematizzate le tempistiche di svolgimento di ogni task indicando il mese di inizio e di fine previsti e il gruppo di lavoro che si occuperà di ogni task. In Tabella 4.3, infine, viene proposta una rappresentazione di immediata lettura delle tempistiche con cui verranno svolti i vari task del progetto. Inoltre, sono evidenziate eventuali sovrapposizioni di più attività durante il progetto.



**Figura 4.3:** Schema dei work-packages e dei task principali del progetto.

**Tabella 4.2:** Schema riassuntivo di date di inizio e fine dei task del progetto e delle unità di lavoro coinvolte

		Inizio (mese)	Fine (mese)	Durata (mesi)	Gruppo di ricerca o Ente responsabile
<b>WP1</b>	<b>Coordinamento e gestione</b>				
<b>T1.1</b>	Coordinamento unità coinvolte	1	36	36	CSFT-DISAT
<b>WP2</b>	<b>Rigenerazione del mutante</b>				
<b>T2.1</b>	Rigenerazione del mutante post-lunga conservazione e verifica stabilità	1	4	4	IPP
<b>T2.2</b>	Invio mutante a CSFT-DISAT	5	5	0,5	IPP
<b>T2.3</b>	Invio mutante a Bio	26	26	0,5	IPP
<b>WP3</b>	<b>Costruzione e caratterizzazione biosensore</b>				
<b>T3.1</b>	Acquisto materiali e strumenti	1	3	3	CSFT-DISAT
<b>T3.2</b>	Mantenimento coltura di cellule mutate	5	20	16	CSFT-DISAT
<b>T3.3</b>	Assemblaggio e prove sperimentali	5	16	12	CSFT-DISAT
<b>T3.4</b>	Test di stabilità	17	20	4	CSFT-DISAT
<b>T3.5</b>	Scrittura codice	19	20	2	SBG
<b>WP4</b>	<b>Sperimentazione sul campo</b>				
<b>T4.1</b>	Acquisto materiale, definizione protocollo e sistema di misura	21	23	3	CSFT-DISAT/LCTIA
<b>T4.2</b>	Definizione mappa e calendario misure	24	26	3	LCTIA
<b>T4.3</b>	Mantenimento coltura di cellule mutate	27	34	8	Bio
<b>T4.4</b>	Produzione e invio biosensori	27	34	8	Bio
<b>T4.5</b>	Misure sul campo	27	34	8	LCTIA
<b>T4.6</b>	Analisi campioni in laboratorio	27	34	8	LRI
<b>T4.7</b>	Elaborazione e pubblicazione risultati	31	36	6	CSFT-DISAT/ARPA





T4.5	Misure sul campo					←→					✓		
T4.6	Analisi campioni in laboratorio					←→						✓	
T4.7	Elaborazione e pubblicazione risultati					←→	✓						✓

#### 4.4 Potenzialità applicative

Il biosensore presentato nel progetto permette di rilevare in campo il superamento della concentrazione massima ammissibile per legge di terbutilazina in campioni di acqua ambientale, senza dover inviare i campioni in laboratorio. Se avrà esito positivo, questo progetto dimostrerà innanzitutto che è possibile implementare biosensori per misure in campo che siano selettivi anche verso altre molecole, e, in secondo luogo, che il biosensore può essere utilizzato anche da personale relativamente non qualificato e quindi potrebbe essere impiegato in campagne di acquisizione dati sulla contaminazione delle acque anche su larga scala a livello regionale o nazionale.

Il biosensore proposto è ottimizzato per cercare in acqua l'erbicida fotosintetico che più frequentemente e con concentrazioni elevate contamina le risorse idriche, la terbutilazina. Nel momento in cui venga dimostrata l'efficacia e affidabilità di questo metodo di misura, si potrebbe estendere l'utilizzo di biosensori fotosintetici per la ricerca di altre molecole contaminanti. Un esempio sono i metalli pesanti che, come gli erbicidi fotosintetici, svolgono un'azione di inibizione dell'attività fotosintetica inibendo il PSII, ma in un sito differente rispetto al Q<sub>B</sub>. Il progetto potrebbe quindi dare il via allo sviluppo di biosensori specifici per altre classi di molecole basati sullo stesso elemento biologico sensibile, il PSII. Si potrebbe progettare un multi-biosensore che contemporaneamente rilevi più sostanze contaminanti nel campione di acqua ambientale.

Oltre allo sviluppo di un biosensore per la terbutilazina che possa essere impiegato nelle misure sul campo, il progetto si ripropone anche di sviluppare un metodo efficiente di raccolta dati capillare per valutare se un bacino idrico presenta una contaminazione da erbicidi fotosintetici superiore ai limiti consentiti dalla legge. Il sistema di misura sul campo messo a punto nel progetto potrebbe essere adottato da enti pubblici locali e nazionali per compiere un primo passo verso la risoluzione della problematica della limitata disponibilità di informazioni sullo stato di contaminazione da erbicidi delle risorse idriche italiane. La questione è di fondamentale importanza soprattutto in alcune regioni in cui è stata evidenziata la totale assenza di monitoraggio dei bacini idrici. Il progetto punta, quindi, a proporre una modalità con cui iniziare ad intervenire in alcune zone d'Italia per riuscire almeno ad identificare i siti in cui la presenza di erbicidi di tipo fotosintetico è così elevata da essere al di fuori dei limiti accettati dalla legge. Una futura collaborazione tra i gruppi di ricerca coinvolti, le ditte produttrici di biosensori e gli enti preposti alla salvaguardia dell'ambiente e delle risorse idriche potrebbe prendere spunto dal progetto presentato per sviluppare una fitta rete di monitoraggio delle risorse idriche su tutto il territorio nazionale esteso anche alla detection di altre molecole.

Un altro aspetto che va evidenziato è la mancanza quasi totale di sensibilizzazione riguardo all'inquinamento dei bacini idrici da erbicidi; alcune risorse idriche, in particolare quelle situate in zone agricole, come ad esempio pozzi o sorgenti, potrebbero essere utilizzate a scopo alimentare in modo incurante del rischio legato alla presenza di erbicidi.

Il progetto proposto mira ad evidenziare la necessità di analizzare l'acqua ambientale e sensibilizzare sia gli enti pubblici, sia i privati sul rischio legato alla presenza di erbicidi in acqua. Un possibile risvolto futuro potrebbe essere l'impiego di biosensori per il rilevamento di erbicidi fotosintetici anche per l'analisi di risorse idriche private, su richiesta esplicita del singolo e con l'intervento di enti preposti, utilizzando un metodo veloce e affidabile.

#### **4.5 Sostenibilità economica**

La fattibilità del progetto da un punto di vista economico viene valutata solo qualitativamente. Nel complesso, il progetto può essere considerato economicamente sostenibile sulla base di tre considerazioni fondamentali.

Innanzitutto, i laboratori che partecipano al progetto, avendo già esperienza nell'ambito delle mansioni assegnate, possiedono già l'attrezzatura necessaria allo svolgimento delle prove sperimentali. Le spese iniziali per l'acquisto di strumenti di laboratorio sono esigue poiché i laboratori sono per la maggior parte già equipaggiati. Si ritiene, quindi, che l'investimento iniziale sia accettabile e sostenibile.

In secondo luogo, il progetto prevede, per la realizzazione dell'apparato di misura del biosensore in laboratorio e in campo, l'acquisto di alcuni strumenti, i quali sono facili da reperire e di comune impiego. Di conseguenza, questa parte del progetto è fattibile dal punto di vista della spesa prevista.

In ultimo, si considera che l'investimento più oneroso derivi dall'acquisto dei reagenti e dei componenti per i biosensori, spesa inevitabile per la realizzazione del progetto stesso. È vero che le spese per produrre un numero di biosensori sufficienti ad effettuare prove sperimentali per 12 mesi e misure sul campo per 8 mesi saranno notevoli, anche perché ogni biosensore viene utilizzato per una sola misurazione. Tuttavia, non è da sottovalutare che la tecnologia scelta per il biosensore, per quanto sia promettente in termini di prestazioni, è estremamente semplice ed economica. Il fatto di utilizzare cellule come elemento sensibile permette di risparmiare evitando le fasi di estrazione e centrifugazione a 4° C, che sarebbero state necessarie se si fossero scelti come elemento sensibile tilacoidi estratti o preparati a base di PSII purificato. Inoltre, gli elettrodi utilizzati non sono estremamente costosi poiché non sono costituiti da metalli preziosi, come ad esempio oro o platino. Infine, la tecnica di immobilizzazione non prevede un processo o materiali costosi. Ne consegue che, nonostante la produzione dei biosensori rappresenti l'investimento più oneroso del progetto, è inevitabile ai fini della ricerca stessa ed è comunque sostenibile rispetto ad altre tecnologie più complesse e, quindi, costose.

## 5. CONCLUSIONI

Il lavoro svolto si è dapprima concentrato sull'analisi del problema dell'inquinamento delle risorse idriche, con particolare attenzione alla contaminazione dovuta agli erbicidi fotosintetici, per poi riunire ed organizzare in uno stato dell'arte aggiornato ed esaustivo numerosi articoli di letteratura sui biosensori per la detection di erbicidi fotosintetici. Infine, è stato scritto un progetto di ricerca innovativo in cui si imposta una proposta lavoro di ricerca volta a costruire e testare un nuovo biosensore per il monitoraggio di terbutilazina in campioni di acqua ambientale.

L'analisi della problematica ambientale ha permesso di individuare gli aspetti che devono ancora essere migliorati nell'ambito del monitoraggio delle acque. Tra le problematiche emerse in questa prima fase, la scarsa disponibilità di dati sulla contaminazione dei bacini idrici è stata presa come spunto per il progetto, che si ripropone di avere un risvolto applicativo.

La successiva analisi comparativa dei dati presenti in letteratura sui biosensori per il rilevamento di erbicidi fotosintetici ha permesso di delineare un quadro completo ed esaustivo delle possibili configurazioni del biosensore. Inoltre, sono state individuate le caratteristiche migliori in termini di prestazioni dei vari biosensori descritti in letteratura, che potrebbero risultare interessanti dal punto di vista applicativo. In questa parte del lavoro è stato individuato il punto di partenza per la progettazione di un nuovo biosensore.

Il progetto proposto ambisce a definire un metodo innovativo per misurare la contaminazione dovuta ad erbicidi fotosintetici nelle risorse idriche. Il principio alla base della proposta è quello di unire un solo biosensore gli elementi più promettenti, e allo stesso tempo economici, dei biosensori presentati in letteratura. La proposta di realizzare un biosensore per la detection di terbutilazina e testarlo in campioni di acqua ambientale è del tutto innovativa ed è frutto di un attento lavoro di studio dei biosensori già esistenti e progettazione di un prototipo che possa avere prestazioni migliori. Il progetto è stato strutturato secondo i canoni e gli standard dei progetti proposti in ambito europeo finalizzati ad ottenere finanziamenti per la ricerca.

Questo lavoro di tesi affronta sotto vari aspetti una problematica ambientale estremamente rilevante, ma probabilmente non sufficientemente considerata. I rischi legati alla contaminazione da pesticidi delle risorse idriche sono un argomento attuale e sul quale è necessario intervenire. Il risultato più importante raggiunto con questa tesi è aver mostrato che è possibile ottimizzare i biosensori per la detection di erbicidi fotosintetici al fine di contribuire a trovare una risoluzione a questo problema ambientale. Infine, un ulteriore risultato raggiunto è l'aver acquisito familiarità con la scrittura di progetti di ricerca scientifica.



## Lista Abbreviazioni

BSA	Bovine Serum Albumin
CEC	Contaminants of Emerging Concern
CNT	Carbon Nano Tubes
DPIP	2,6-diclorofenolo-indofenolo
EQS	Environmental Quality Standards
GA	Glutaraldeide
ISPRA	Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
ISTAT	Istituto nazionale di Statistica
LHCs	Light Harvesting Centres
LOD	Limit of Detection
MNP	Magnetic Nano Particles
MWCNT	Multi Wall Carbon Nano Tubes
OEC	Oxygen Evolving Centre
PQ <sub>A</sub>	Plastochinone A
PQ <sub>B</sub>	Plastochinone B
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
RC	Reaction Centre
ROS	Reactive Oxygen Species
STF	Single Turnover Flash
SWCNT	Single Wall Carbon Nano Tubes
TAP	Tris-Acetato-Fosfato
WFD	Water Framework Directive

## Riferimenti Bibliografici

- [1] European Parliament and Consilium, “Trattato sul funzionamento dell’Unione europea (Versione consolidata),” *Gazz. Uff. dell’Unione Eur.*, pp. 1–344, 2012.
- [2] European Parliament and Consilium, “DIRETTIVA 2000/60/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO,” *Off. J. Eur. Union*, no. 7, 2000.
- [3] EEA, “Chemicals in European waters Knowledge developments,” no. 18. pp. 1–80, 2018, doi: 10.2800/265080.
- [4] ERA-NET Cofund, “Call Announcement. Risks posed to human health and the environment by pollutants and pathogens present in water resources.” 2020.
- [5] Eurostat, “Agri-environmental indicator - pesticide pollution of water,” *Stat. Explain.*, 2017, [Online]. Available: [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Archive:Agri-environmental\\_indicator\\_-\\_pesticide\\_pollution\\_of\\_water](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Archive:Agri-environmental_indicator_-_pesticide_pollution_of_water).
- [6] R. Meffe and I. de Bustamante, “Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: A first overview of the situation in Italy,” *Sci. Total Environ.*, vol. 481, no. 1, pp. 280–295, 2014, doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.02.053.
- [7] ISPRA, “Rapporto nazionale pesticidi nelle acque.” p. 100, 2018.
- [8] R. L. Zimdahl, “Properties and Uses of Herbicides,” in *Fundamentals of Weed Science*, no. 13, 2007, pp. 509–536.
- [9] P. L. Rani, “Inhibition of Photosynthesis.” pp. 1–4, 2010.
- [10] Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, “Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano,” 2001, [Online]. Available: [http://www.arpal.gov.it/images/stories/testi\\_normative/DLgs\\_31-2001.pdf](http://www.arpal.gov.it/images/stories/testi_normative/DLgs_31-2001.pdf).
- [11] ISTAT, “Prelievi di acqua potabile sul territorio italiano.” 2015.
- [12] E. P. Fuerst and M. a Norman, “Interactions of Herbicides with Photosynthetic Electron Transport,” *Weed Sci. Soc. Am.*, vol. 39, no. 3, pp. 458–464, 1991.
- [13] H. Kirchhoff, “Chloroplast ultrastructure in plants,” *New Phytol.*, vol. 223, no. 2, pp. 565–574, 2019, doi: 10.1111/nph.15730.
- [14] S. C. Bhatla and M. A. Lal, *Plant Physiology, Development and Metabolism*. 2018.
- [15] S. Merchant and M. R. Sawaya, “The light reactions: A guide to recent acquisitions for the picture gallery,” *Plant Cell*, vol. 17, no. 3, pp. 648–663, 2005, doi: 10.1105/tpc.105.030676.
- [16] ISTAT, “Prodotti fitosanitari utilizzati in Italia nelle colture di mais.” 2018.
- [17] ISTAT, “Prodotti fitosanitari utilizzati in Italia nelle colture di frumento.” 2018.
- [18] L. Fava *et al.*, “Pesticides and their metabolites in selected Italian groundwater and surface water used for drinking,” *Ann Ist Super Sanità*, vol. 46, no. 3, pp. 309–316, 2010, doi: 10.4415/ANN.
- [19] X. Wei *et al.*, “Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution,” *Nature*, vol. 534, no. 7605, pp. 69–74, 2016, doi: 10.1038/nature18020.
- [20] R. Croce and P. Xu, “A photo shoot of plant photosystem II,” *Nature*, vol. 534, pp. 42–43, 2016.
- [21] J. Barber and W. Kühlbrandt, “Photosystem II,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 9, no.

- 4, pp. 469–475, 1999, doi: 10.1016/S0959-440X(99)80066-9.
- [22] M. D. Lambrea *et al.*, “Structure/Function/Dynamics of Photosystem II Plastoquinone Binding Sites,” pp. 285–295, 2014, [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4030317/pdf/CPPS-15-285.pdf>.
- [23] K. Buonasera, G. Pezzotti, V. Scognamiglio, A. Tibuzzi, and M. T. Giardi, “New platform of biosensors for prescreening of pesticide residues to support laboratory analyses,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 10, pp. 5982–5990, 2010, doi: 10.1021/jf9027602.
- [24] I. J. Allan, B. Vrana, R. Greenwood, G. A. Mills, B. Roig, and C. Gonzalez, “A ‘toolbox’ for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive,” *Talanta*, vol. 69, pp. 302–322, 2006, doi: 10.1016/j.talanta.2005.09.043.
- [25] I. Boron, A. Juárez, and F. Battaglini, “Portable Microalgal Biosensor for Herbicide Monitoring,” *ChemElectroChem*, vol. 7, no. 7, pp. 1623–1630, 2020, doi: 10.1002/celec.202000210.
- [26] V. Scognamiglio *et al.*, “Biosensors for effective environmental and agrifood protection and commercialization: From research to market,” *Microchim. Acta*, vol. 170, no. 3, pp. 215–225, 2010, doi: 10.1007/s00604-010-0313-5.
- [27] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson, “Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, no. 1–2, pp. 121–131, 2001, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00115-4.
- [28] S. Rodriguez-Mozaz, M. J. Lopez De Alda, and D. Barceló, “Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 386, no. 4, pp. 1025–1041, 2006, doi: 10.1007/s00216-006-0574-3.
- [29] M. Koblížek *et al.*, “A biosensor for the detection of triazine and phenylurea herbicides designed using Photosystem II coupled to a screen-printed electrode,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 78, no. 1, pp. 110–116, 2002, doi: 10.1002/bit.10190.
- [30] M. T. Giardi, M. Koblizek, and J. Masojidek, “Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants,” vol. 16, pp. 1027–1033, 2001.
- [31] A. Tsopela *et al.*, “Development of a lab-on-chip electrochemical biosensor for water quality analysis based on microalgal photosynthesis,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 79, pp. 568–573, 2016, doi: 10.1016/j.bios.2015.12.050.
- [32] I. Shitanda, S. Takamatsu, K. Watanabe, and M. Itagaki, “Amperometric screen-printed algal biosensor with flow injection analysis system for detection of environmental toxic compounds,” *Electrochim. Acta J.*, vol. 54, pp. 4933–4936, 2009, doi: 10.1016/j.electacta.2009.04.005.
- [33] I. Shitanda, K. Takada, Y. Sakai, and T. Tatsuma, “Compact amperometric algal biosensors for the evaluation of water toxicity,” vol. 530, pp. 191–197, 2005, doi: 10.1016/j.aca.2004.09.073.
- [34] E. V. Piletskaya *et al.*, “Thylakoid membranes-based test-system for detecting of trace quantities of the photosynthesis-inhibiting herbicides in drinking water,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 391, no. 1, pp. 1–7, 1999, doi: 10.1016/S0003-2670(99)00233-0.
- [35] D. G. Varsamis, E. Touloupakis, P. Morlacchi, D. F. Ghanotakis, M. T. Giardi, and D. C. Cullen, “Development of a photosystem II-based optical microfluidic sensor for herbicide detection,” *Talanta*, vol. 77, no. 1, pp. 42–47, 2008, doi:

- 10.1016/j.talanta.2008.05.060.
- [36] E. Touloupakis, L. Giannoudi, S. A. Piletsky, L. Guzzella, F. Pozzoni, and M. T. Giardi, "A multi-biosensor based on immobilized Photosystem II on screen-printed electrodes for the detection of herbicides in river water," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, no. 10 SPEC. ISS., pp. 1984–1992, 2005, doi: 10.1016/j.bios.2004.08.035.
- [37] M. Grattieri, K. Hasan, and S. D. Minter, "Bio-Electrochemical Systems as A Multipurpose Biosensing Tool: Present Perspective and Future Outlook," *ChemElectroChem*, vol. 10, 2016, doi: 10.1002/chem.201801764.
- [38] M. Tucci, M. Grattieri, A. Schievano, P. Cristiani, and S. D. Minter, "Microbial amperometric biosensor for online herbicide detection: Photocurrent inhibition of *Anabaena variabilis*," *Electrochim. Acta*, vol. 302, no. 2019, pp. 102–108, 2019, doi: 10.1016/j.electacta.2019.02.007.
- [39] I. Husu *et al.*, "Insights into photo-electrochemical sensing of herbicides driven by *Chlamydomonas reinhardtii* cells," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 185, pp. 321–330, 2013, doi: 10.1016/j.snb.2013.05.013.
- [40] J. Masojídek, P. Souček, J. Máchová, J. Frolík, K. Klem, and J. Malý, "Detection of photosynthetic herbicides: Algal growth inhibition test vs. electrochemical photosystem II biosensor," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 74, no. 1, pp. 117–122, 2011, doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.08.028.
- [41] P. J. Ralph, R. A. Smith, C. M. O. MacInnis-Ng, and C. R. Seery, "Use of fluorescence-based ecotoxicological bioassays in monitoring toxicants and pollution in aquatic systems: Review," *Toxicol. Environ. Chem.*, vol. 89, no. 4, pp. 589–607, 2007, doi: 10.1080/02772240701561593.
- [42] H. M. Kalaji *et al.*, "Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: Practical issues," *Photosynth. Res.*, vol. 122, no. 2, pp. 121–158, 2014, doi: 10.1007/s11120-014-0024-6.
- [43] V. Scognamiglio *et al.*, "An eco-designed paper-based algal biosensor for nanoformulated herbicide optical detection," *J. Hazard. Mater.*, vol. 373, no. February, pp. 483–492, 2019, doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.03.082.
- [44] L. Barthelmebs, R. Carpentier, and R. Rouillon, "Physical and Chemical Immobilization Methods of Photosynthetic Materials," *Methods Mol. Biol.*, vol. 684, pp. 363–374, 2011, doi: 10.1007/978-1-60761-925-3.
- [45] D. Laberge, R. Rouillon, and R. Carpentier, "Comparative study of thylakoid membranes sensitivity for herbicide detection after physical or chemical immobilization," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 26, no. 5–6, pp. 332–336, 2000, doi: 10.1016/S0141-0229(99)00174-X.
- [46] J. Daniel N. Tran and Kenneth J. Balkus, "Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes," *ACS Catal.*, vol. 71, no. 1, pp. 956–968, 2011, doi: 10.1163/1568525X-12342362.
- [47] V. Larreta Garde, B. Thomasset, A. Tanaka, G. Gellf, and D. Thomas, "Comparative stabilization of biological photosystems by several immobilization procedures," *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 11, no. 3, pp. 133–138, 1981, doi: 10.1007/bf00511250.
- [48] K. R. Rogers and R. Williams, "Biosensors for environmental monitoring: a regulatory perspective," vol. 14, no. 7, pp. 289–294, 1995.
- [49] Biosensor, "Biomediators and Analytes." 2020.



- [50] W. Oettmeier, “Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 55, no. 10, pp. 1255–1277, 1999, doi: 10.1007/s000180050370.
- [51] E. Przibilla, S. Heiss, U. Johanningmeier, and A. Trebst, “Site-specific mutagenesis of the D1 subunit of photosystem II in wild-type *Chlamydomonas*,” *Plant Cell*, vol. 3, no. 2, pp. 169–174, 1991, doi: 10.1105/tpc.3.2.169.
- [52] R. Bochum, “*Chlamydomonas reinhardtii* mutant with an intronless,” pp. 91–99, 1993.
- [53] M. D. Lambreva *et al.*, “A Powerful Molecular Engineering Tool Provided Efficient *Chlamydomonas* Mutants as Bio-Sensing Elements for Herbicides Detection,” vol. 8, no. 4, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0061851.
- [54] G. Rea *et al.*, “Structure-based design of novel *Chlamydomonas reinhardtii* D1-D2 photosynthetic proteins for herbicide monitoring,” *Protein Sci.*, vol. 18, no. 10, pp. 2139–2151, 2009, doi: 10.1002/pro.228.
- [55] M. T. Giardi *et al.*, “Optical biosensors for environmental monitoring based on computational and biotechnological tools for engineering the photosynthetic D1 protein of *Chlamydomonas reinhardtii*,” vol. 25, pp. 294–300, 2009, doi: 10.1016/j.bios.2009.07.003.
- [56] A. Tibuzzi, G. Rea, G. Pezzotti, D. Esposito, U. Johanningmeier, and M. T. Giardi, “A new miniaturized multiarray biosensor system for fluorescence detection,” *J. Phys. Condens. MATTER*, vol. 395006, 2007, doi: 10.1088/0953-8984/19/39/395006.
- [57] D. Esposito, “Detection of Herbicide Subclasses by an Optical Multibiosensor Based on an Array of Photosystem II Mutants,” vol. 39, no. 14, pp. 5378–5384, 2005.
- [58] X. Zhang, Q. Guo, and D. Cui, “Recent advances in nanotechnology applied to biosensors,” *Sensors*, vol. 9, no. 2, pp. 1033–1053, 2009, doi: 10.3390/s90201033.
- [59] M. R. Willner and P. J. Vikesland, “Nanomaterial enabled sensors for environmental contaminants,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 16, no. 1, pp. 1–16, 2018, doi: 10.1186/s12951-018-0419-1.
- [60] S. Mojtaba and F. Khadivi, *Biosensors and Nanobiosensors in Environmental Applications*. 2020.
- [61] Y. Zhou, Y. Fang, and R. P. Ramasamy, “Non-Covalent Functionalization of Carbon Nanotubes for Electrochemical Biosensor Development,” 2019, doi: 10.3390/s19020392.
- [62] A. I. Zamaleeva *et al.*, “A whole-cell amperometric herbicide biosensor based on magnetically functionalised microalgae and screen-printed electrodes,” pp. 509–513, 2011, doi: 10.1039/c0ay00627k.
- [63] ISPRA, “Problematiche emerse.” 2005.

## Sitografia

- [I] <https://www.livescience.com/51720-photosynthesis.html>, ultimo accesso 10/05/2020
- [II] <http://www.life.illinois.edu/govindjee/ZSchemeG.html>, ultimo accesso 10/05/2020
- [III] <http://www.life.illinois.edu/govindjee/textzsch.htm>, ultimo accesso 10/05/2020
- [IV] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/wha9907024?lang=it&region=IT>, ultimo accesso 14/10/2020
- [V] [http://www.gwent.org/gem\\_standard\\_electrodes.html](http://www.gwent.org/gem_standard_electrodes.html), ultimo accesso 12/10/2020
- [VI] <https://it.gilson.com/ITSV/minipuls-3-peristaltic-pumps.html>, ultimo accesso 12/10/2020
- [VII] <https://www.sartorius.com/shop/ww/en/usd/applications-laboratory-filtration/cellulose-nitrate-%28mixed-cellulose-ester%29-membrane-filters-type-11306%2C-0-45-%C2%B5m-pore-size%2C-142-mm-diameter%2C-25-pieces-per-pack/p/11306-142-----G>, ultimo accesso 14/10/2020
- [VIII] <https://www.iit.it/it/centers/csft-polito> , ultimo accesso 7/12/2020
- [IX] [https://www.biologie.uni-alle.de/institutsbereich\\_pflanzenphys/ag\\_pflanzenphysiologie/forschung/](https://www.biologie.uni-alle.de/institutsbereich_pflanzenphys/ag_pflanzenphysiologie/forschung/), ultimo accesso 19/10/2020
- [X] [https://www.dauin.polito.it/it/la\\_ricerca/gruppi\\_di\\_ricerca/sbg\\_system\\_biology\\_group](https://www.dauin.polito.it/it/la_ricerca/gruppi_di_ricerca/sbg_system_biology_group), ultimo accesso 21/10/2020
- [XI] <https://www.biosensor.it/>, ultimo accesso 19/10/2020
- [XII] [https://www.diati.polito.it/il\\_dipartimento/strutture\\_interne/laboratori/cartografia\\_tematica\\_e\\_idrogeologia\\_applicata](https://www.diati.polito.it/il_dipartimento/strutture_interne/laboratori/cartografia_tematica_e_idrogeologia_applicata), ultimo accesso 19/10/2020
- [XIII] [https://www.diati.polito.it/il\\_dipartimento/strutture\\_interne/laboratori/ricerche\\_idrogeologiche](https://www.diati.polito.it/il_dipartimento/strutture_interne/laboratori/ricerche_idrogeologiche), ultimo accesso 19/10/2020
- [XIV] <http://www.arpa.piemonte.it/approfondimenti/educazione-ambientale>, ultimo accesso 19/10/2020

## Appendice A

Dataset: Prelievo di acqua per uso potabile

Fonte: ISTAT

Tipo dato		volume di acqua prelevata per uso potabile - migliaia di metri cubi						
Selezione periodo		2015						
Tipologia di fonte		sorgente	pozzo	corso d'acqua	lago naturale	bacino artificiale	acque marine o salmastre	totale
<b>Territorio</b>								
Italia		3444269	4549498	456036	86172	940471	11245	9487692
Nord-ovest		515655	1718065	88718	42989	97341	..	2462766
Piemonte		160684	415440	49894	58	38165	..	664241
Valle d'Aosta / Vallée d'Aoste		47131	6069	..	..	..	..	53200
Liguria		31013	130439	37992	..	58971	..	258415
Lombardia		276827	1166117	831	42931	205	..	1486911
Nord-est		458219	961033	181802	2545	58608	..	1662207
Trentino Alto Adige / Südtirol		193026	34029	3456	580	..	..	231091
Provincia Autonoma Bolzano / Bozen		64545	18882	..	..	..	..	83427
Provincia Autonoma Trento		128481	15148	3456	580	..	..	147664
Veneto		179518	472852	64833	1965	..	..	719168
Friuli-Venezia Giulia		53182	163606	6307	..	1268	..	224363
Emilia-Romagna		32493	290546	107207	..	57340	..	487586
Centro		1092200	634824	121437	39924	39896	960	1929242
Toscana		106841	226331	115363	1275	14819	960	465589
Umbria		44689	69988	..	..	..	..	114677
Marche		117345	29458	2314	..	24998	..	174115
Lazio		823325	309048	3760	38649	79	..	1174860
Sud		1174225	748882	60821	714	375648	..	2360291
Abruzzo		229131	44725	7972	..	..	..	281828
Molise		117933	46100	..	72	13854	..	177960
Campania		577330	397612	2	..	367	..	975310
Puglia		414	71954	..	12	101379	..	173758
Basilicata		57490	4755	..	..	255134	..	317379
Calabria		191925	183736	52848	631	4915	..	434055
Isole		203971	486694	3257	..	368979	10285	1073185
Sicilia		167476	455881	2430	..	124581	10285	760652
Sardegna		36495	30813	827	..	244398	..	312533

Dati estratti il 31 mar 2020 14:55 UTC (GMT) da I.Stat



# Dataset: Utilizzo erbicidi su colture di mais in Italia

Fonte: ISTAT

Cultore		Territorio																				
Italia		2007				2017				2018												
Selezione periodo		numero di aziende effettuate trattamenti	superficie di base trattata (ettari)	superficie di base trattata in percentuale	quantità di principi utilizzati in kg	quantità di principi utilizzati in kg/ettaro	numero di aziende effettuate trattamenti	superficie di base trattata (ettari)	superficie di base trattata in percentuale	quantità di principi utilizzati in kg	quantità di principi utilizzati in kg/ettaro	numero di aziende effettuate trattamenti (ASAT/BAT)	superficie di base trattata (ettari)	superficie di base trattata in percentuale	quantità di principi utilizzati in kg	quantità di principi utilizzati in kg/ettaro	numero di aziende effettuate trattamenti (ASAT/BAT)	superficie di base trattata (ettari)	superficie di base trattata in percentuale	quantità di principi utilizzati in kg	quantità di principi utilizzati in kg/ettaro	
Tipo dato		(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)	(percentuale)
<b>Prodotti fitosanitari e principi attivi</b>																						
erbicidi		214994	1163077,2	92,9	1337125,6	93,5	125344	98,7	788975,2	99,2	1859,63	98,9	2,36	84211	3,35	1	0,86	841839	4,02	1,18	1,03	1,03
(comprensivo della quota dei misti)		214994	1163077,2	92,9	1337125,6	93,5	125344	98,7	788975,2	99,2	1859,63	98,9	2,36	84211	3,35	1	0,86	841839	4,02	1,18	1,03	1,03
amidi		162420	810554,36	64,7	674902,33	47,2	57673	45,9	585740,61	73,7	907,63	48,3	1,55	84211	0,94	0,84	0,35	841839	1,06	0,8	0,44	0,44
carbammidi derivati dell'urea		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,93	1,4	0,44
nitroderivati benzotriazoli diazotiazine		40144	252897,74	20,2	128322,61	8,9	4605	3,6	141547,93	17,8	83,29	4,4	0,59	84211	0,87	0,45	0,02	841839	0,74	0,33	0,02	0,02
solfouree imidazolinoni		149861	824389,54	65,9	391772,33	27,4	5577	4,4	621881,08	78,2	551,46	29,3	0,89	84211	0,84	0,49	0,2	841839	1,05	0,45	0,24	0,24
fosforгани dipiridilici		37849	305666,92	24,4	8702,4	0,6	13376	10,6	154886,45	19,5	12,25	0,7	0,08	84211	1,01	0,05	0,01	841839	1,05	0,04	0,01	0,01
anilossifen o-propionati-cicloeseni		9090	41860,88	3,3	43518,09	3	740	0,6	13767,34	1,7	12,47	0,7	0,91	84211	0,9	0,85	0,1	841839	0,89	0,72	0,11	0,11
ormonici altri erbicidi		44061	311708,36	24,9	43127,23	2,9	4685	3,6	129044,09	16,2	30,33	1,6	0,24	84211	0,91	0,17	0,04	841839	0,82	0,15	0,03	0,03
		60861	522509,42	41,7	37516,33	2,6	38281	30,4	53111,38	66,8	222,61	11,8	0,42	84211	2,01	0,17	0,12	841839	2,07	0,21	0,16	0,16

Dati estratti il 31.mar.2020 14:44 UTC (GMT) da ISTAT

## Ringraziamenti

A conclusione di questo elaborato desidero ringraziare tutte le persone che mi hanno sostenuta in questo percorso.

Vorrei innanzitutto ringraziare la mia relatrice Cristina Pagliano che mi ha sempre seguita con pazienza e disponibilità nonostante la distanza. La ringrazio per aver reso questo progetto un'esperienza formativa ed interessante a dispetto delle difficoltà dovute alle circostanze sfavorevoli della pandemia.

Ringrazio i miei genitori e mia sorella per avermi supportata e sopportata e per aver sempre creduto in me non solo nella stesura di questo elaborato, ma durante tutto il mio percorso.

Ringrazio Leonardo per avermi sempre ascoltata con immensa pazienza e sostenuta in ogni istante, per essere riuscito a strapparmi un sorriso in ogni momento di difficoltà.

Infine, un ringraziamento speciale ai miei più cari amici, a Francesco, Jamilay, Micheal, Carol, Sabrina, Beatrice, Luisa e Chiara perché con loro ho condiviso un percorso lungo fatto di gioie e dolori, un'esperienza che lascia un ricordo indelebile nel mio cuore.