

**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale in
BIOLOGIA MARINA**



**NUOVI MANGIMI ECOSOSTENIBILI IN ACQUACOLTURA:
DETERMINAZIONE DI METALLI TOSSICI IN RELAZIONE
ALL'INCLUSIONE DI HERMETIA ILLUCENS ALLEVATA SU SCARTI
DI CAFFÈ E MICROALGHE**

**NEW ECO-SUSTAINABLE FEED IN AQUACULTURE:
DETERMINATION OF TOXIC METALS IN RELATION TO THE
INCLUSION OF HERMETIA ILLUCENS REARED ON COFFEE WASTE
AND MICROALGAE**

Tesi di Laurea Magistrale
di: Leonardo Giovannini

Relatore:
Dott.ssa Cristina Truzzi

Primo Correlatore:
Dott.ssa Anna Annibaldi

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

1. Introduzione.....	1
1.1 Alimentazione in acquacoltura.....	4
1.2 <i>Hermetia Illucens</i>	8
1.3 <i>Danio rerio</i>	10
1.4 Metalli come contaminanti.....	12
1.4.1 Nichel	18
1.4.2 Arsenico.....	19
1.4.3 Cadmio	20
1.4.4 Piombo.....	21
1.4.5 Mercurio	22
1.4.6 Metalli tossici e insetti.....	24
2. Scopo della tesi.....	25
3. Materiali e metodi.....	31
3.1 Allevamento di <i>Hermetia illucens</i>	32
3.2 Allevamento di <i>Danio Rerio</i>	32
3.3 Strumentazioni	37
3.3.1 Laboratorio	37
3.3.2 Reagenti e soluzioni	38
3.3.3 Omogeneizzazione dei campioni.....	39
3.3.4 Liofilizzazione dei campioni	39
3.3.5 Digestione dei campioni	40
3.4 Metodologia analitica	42

3.4.1	Spettrofotometria di assorbimento atomico.....	42
3.4.2	Assorbimento atomico e concentrazione.....	42
3.4.3	Strumentazioni.....	45
3.4.4	Bianco strumentale	54
3.5	Accuratezza della metodologia analitica.....	55
3.6	Analisi statistica	56
4.	Risultati e discussioni	57
4.1	Allevamento di insetti: determinazione di metalli pesanti in substrati, insetti e lettiere.....	57
4.1.1	Cadmio	58
4.1.2	Piombo.....	60
4.1.3	Arsenico.....	63
4.1.4	Nichel	65
4.1.5	Mercurio	67
4.2	Determinazione di metalli pesanti in mangimi, larve e giovanili di zebrafish	69
4.2.1	Cadmio	70
4.2.2	Piombo.....	72
4.2.3	Arsenico.....	73
4.2.4	Nichel	74
4.2.5	Mercurio	75
5.	Conclusioni.....	77
	Bibliografia.....	78

1. INTRODUZIONE

L'acquacoltura è l'allevamento di organismi acquatici, compresi pesci, molluschi, crostacei e piante acquatiche. Questa pratica implica determinate forme di intervento nel processo di allevamento atte a migliorarne la produzione, come lo stoccaggio regolare, l'alimentazione e la protezione dai predatori (FAO, 1996).

La produzione globale di prodotti derivanti da acquacoltura (comprese le piante acquatiche) nel 2016 è stata di 110.2 milioni di tonnellate, con un valore di vendita stimato a 243.5 miliardi di dollari. La produzione di pesci nello stesso anno derivante da questa pratica è stata di oltre 54 milioni di tonnellate, mostrando un incremento di oltre il 5 % rispetto al 2015 (Fig. 1) (FAO, 2018).

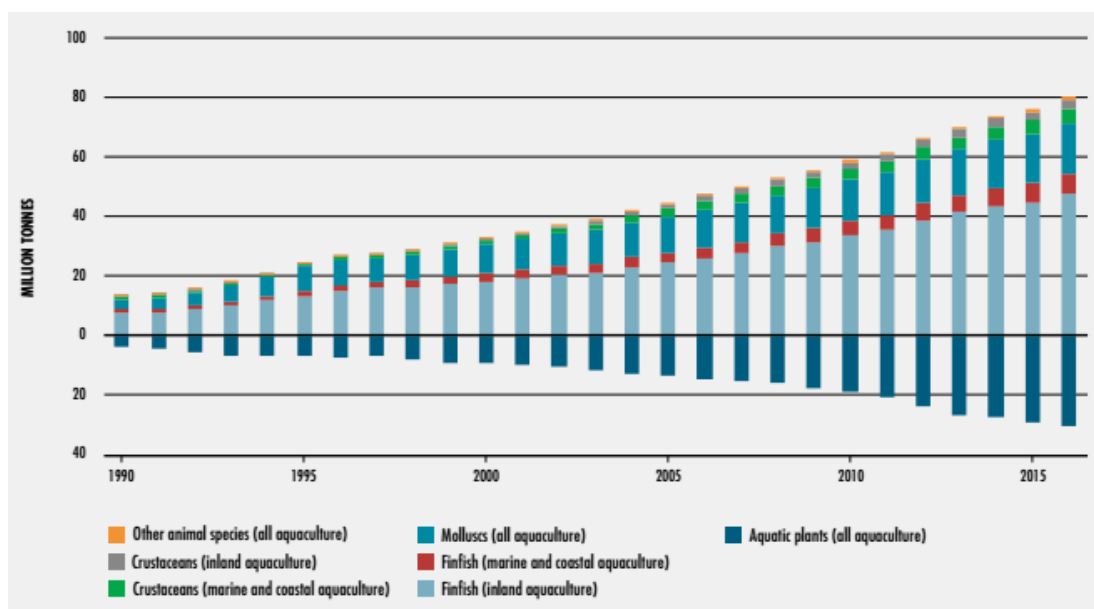


Fig. 1 - Produzione globale di prodotti derivanti da acquacoltura (FAO, 2018).

Il dataset sulle statistiche della produzione globale di acquacoltura della FAO 1950-2015, pubblicato a marzo 2017, ha registrato un totale di 591 specie acquatiche mai allevate prima in acque dolci interne, saline interne, acque salmastre costiere e in mare. Nell'anno 2015 si è registrata una produzione mondiale, derivante da questa pratica, di 106 milioni di tonnellate di peso vivo. Questa produzione comprendeva animali acquatici, piante acquatiche e prodotti non alimentari (perle e conchiglie) (FAO, 2017).

Le specie animali che dominano in acquacoltura appartengono a tutti i livelli della catena trofica (Fig. 2) (FAO, 2006; Allsopp 2008).

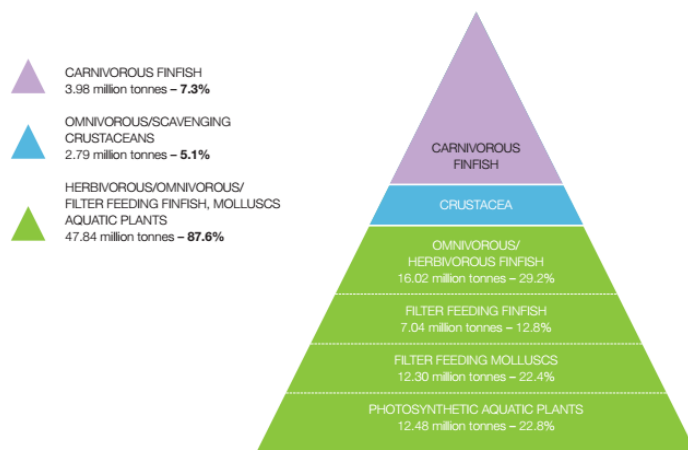


Fig. 2 - Piramide globale di produzione dell'acquacoltura (tutti gli animali e le piante) in relazione alle abitudini alimentari e all'apporto di nutrienti nel 2003 (FAO, 2006).

Gli sbarchi di pesce dall'ambiente marino globale hanno subito un forte declino negli ultimi anni, a causa di una condizione di sovrasfruttamento degli stock (Christensen, 2002). La frazione degli stock ittici sfruttati a livelli biologicamente sostenibili ha mostrato una tendenza decrescente: dal 90.0% nel 1974 al 66.9% nel 2015. Al contrario, la percentuale di stock in condizioni di overfishing è aumentata dal 10% nel 1974 al 33.1% nel 2015, con punti di massimo raggiunti alla fine degli anni '70 e '80 (Fig. 3) (FAO, 2018).

Allo stesso tempo la domanda di prodotti di origine marina è aumentata e il settore dell'acquacoltura ha visto un significativo incremento (Fig. 4) (Allsopp, 2008). Questo sviluppo genera reddito e commercio, ma comporta anche un consistente impatto ambientale in termini di inquinamento e cambiamenti di biodiversità. L'energia principale nei sistemi di coltura intensivi è l'alimentazione dei pesci, che viene in parte trasformata in biomassa e in parte rilasciata nell'acqua come materia organica sospesa o sostanze disciolte, tra cui carbonio, azoto e fosforo, provenienti da eccedenze alimentari, feci ed escrezioni tramite branchie e reni. Altri inquinanti sono residui di farmaci impiegati per la prevenzione di malattie (Tovar et al., 2000).

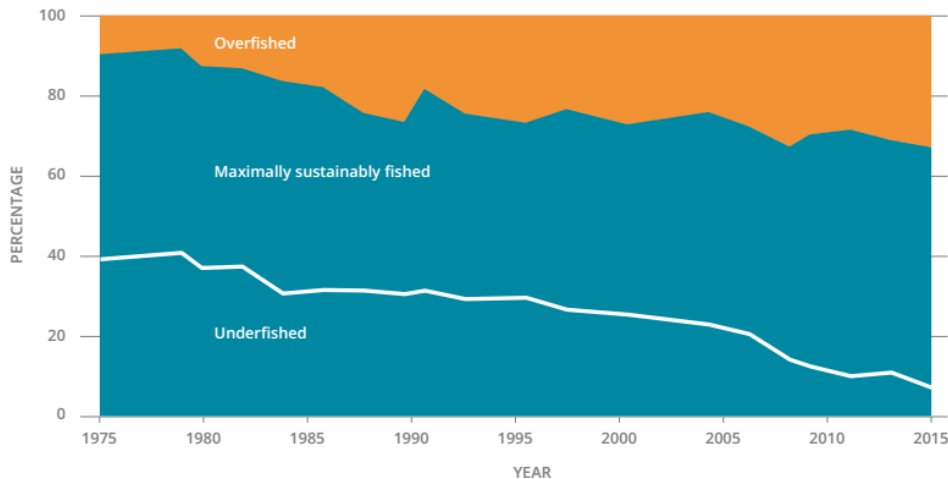


Fig. 3 - Sfruttamento mondiale di pesci e piante acquatiche alimentari, 1975-2015. La porzione blu indica la percentuale di stock sfruttata entro i livelli di sostenibilità, quella arancione rappresenta gli stock in condizioni di overfishing; la linea bianca separa gli stock sottoutilizzati da quelli sfruttati intorno al rendimento massimo sostenibile (MSY) (FAO, 2018).

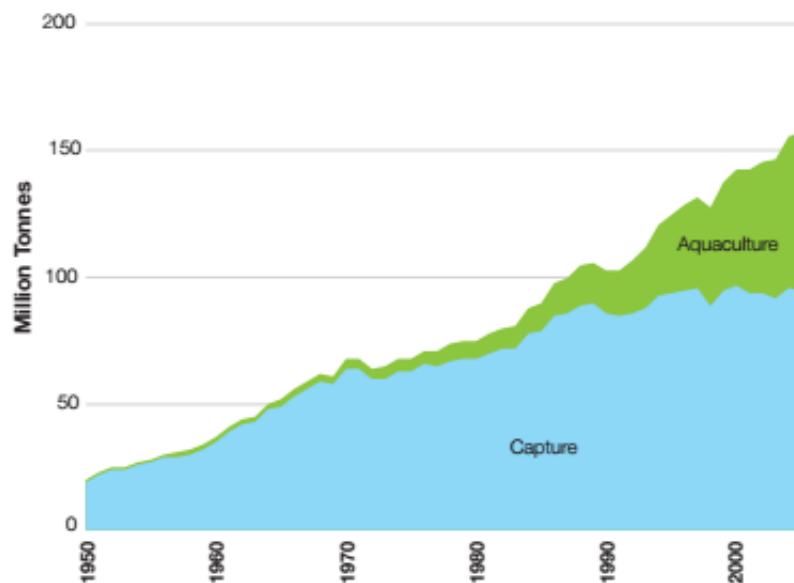


Fig. 4 - Produzione globale di pesca e acquacoltura (tutte le specie animali e vegetali), 1950-2005 (FAO Fishstat Database).

L'impatto dell'acquacoltura intensiva non è dovuto esclusivamente all'input di materia organica e inorganica nell'ambiente marino; nel 2009 circa 66 tonnellate (70%) del pesce pescato è stato impiegato direttamente per il consumo umano, mentre 23 tonnellate (30%) sono state usate per la produzione di farina e olio di pesce da usare come mangimi per allevamenti, inclusa l'acquacoltura (FAO, 2011; Olsen and Hasan, 2012).

Oltre il 46% della produzione totale di acquacoltura nel 2008 è dipeso dalla fornitura di fattori di alimentazione esterni. Affinché il settore dell'acquacoltura mantenga il suo attuale tasso di crescita medio dall'8 al 10% all'anno, l'offerta di nutrienti e mangimi dovrà crescere con lo stesso ritmo (Tacon, 2011).

Nel 1998 l'80% della farina di pesce prodotta in tutto il mondo è stata impiegata come mangime per la nutrizione di pollame e suini, il restante 10% apparteneva all'acquacoltura. Con il passare del tempo si è assistito a un'inversione di questi valori: il contributo della farina di pesce per l'acquacoltura è salito al 56%, mentre il 32% è stato usato per sostenere allevamenti di pollame e suini (Fig. 5) (Olsen and Hasan, 2012).

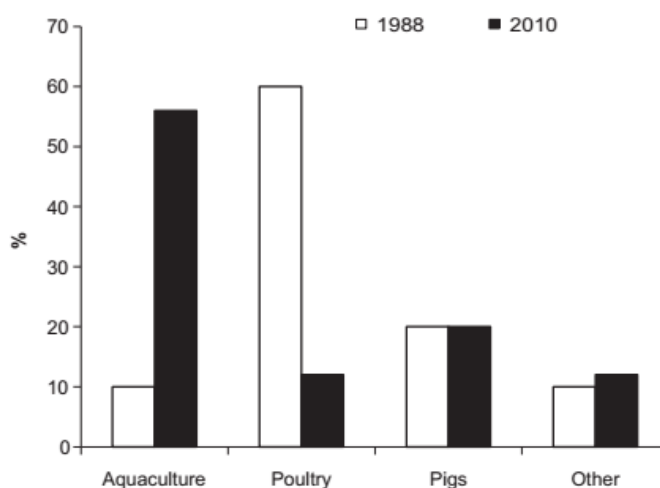


Fig. 5 - Uso di farina di pesce nei mangimi composti in diversi settori nel 1988 e 2010 (Olsen and Hasan 2012).

1.1 Alimentazione in acquacoltura

Come per l'uomo, tutti gli animali allevati necessitano di una corretta alimentazione, compresi pesci e altre specie acquatiche commerciali.

I mangimi possono essere completi o supplementari. Le diete complete forniscono tutti gli ingredienti (proteine, carboidrati, grassi, vitamine e minerali) necessari per la crescita e la salute ottimale del pesce. La maggior parte degli allevatori di pesci usa diete complete, tipicamente costituite da determinate percentuali di nutrienti: proteine 18-50 %; lipidi 10-25 %; carboidrati 15-20 %; cenere <8.5 %; fosforo <1.5 %; acqua <10 % e tracce di vitamine e minerali. Le diete supplementari, al contrario, non presentano quantità di nutrienti tali da sostenere da sole il metabolismo di animali, ma sono tipicamente utilizzate per aiutare a

fortificare la dieta naturalmente disponibile con proteine, carboidrati e/o lipidi extra (Craig 2017).

La farina di pesce, ottenuta con idonei processi industriali a partire da pescato fresco e privo di contaminanti, rappresenta la fonte proteica ideale nei mangimi per l'acquacoltura, poiché presenta un elevato tenore proteico, ottimo profilo amminoacidico, alta digeribilità ed appetibilità. Una componente fondamentale nella composizione dei mangimi è rappresentata dai lipidi. Questi svolgono un ruolo importante nella produzione di energia e sono fonte di acidi grassi essenziali. Inoltre, i lipidi sono i componenti principali delle membrane cellulari e lipoproteine di trasporto (Watanabe, 1982; Cataudella and Bronzi, 2001).

Come si può vedere dalla Tabella 1, i pesci generalmente richiedono acidi grassi ω -3 e ω -6 (n-3 e n-6); quelli marini, per una crescita e una salute ottimale, sono dipendenti da quantità di acidi grassi ω -3 che vanno dallo 0.5 al 2.0% della dieta secca. Inoltre, la maggior parte dei pesci marini non possiede il corredo enzimatico atto all'allungamento (elongasi) e desaturazione (desaturasi) degli acidi grassi, pertanto richiedono ω -3 a lunga catena nella loro dieta. Alcune specie ittiche, come la tilapia, richiedono acidi grassi della famiglia ω -6, mentre altri, come il pesce gatto, richiedono una combinazione di ω -3 e ω -6 (Craig, 2017).

Tabella 1 - Fabbisogni in acidi grassi essenziali delle principali specie ittiche allevate.

Specie	Acido grasso essenziale	Fabbisogno (% razione).
Trota iridea	18:3 n3	0.8 – 1.7
Carpa comune	18:2 n6	1.0
	18:3 n3	1.0
Anguilla europea	18:2 n6	0.5
	18:3 n3	0.5
Orata giapponese	PUFA n3	0.4

Questi studi interessano principalmente i sistemi ad acquacoltura intensiva, i quali sono caratterizzati da elevate densità di biomassa allevata per unità di superficie e di volume (sino a 20-30 kg/m³) e tutto l'alimento è somministrato dall'esterno (Cataudella and Bronzi, 2001).

La crescita demografica, che ammonterà a 9 miliardi di persone entro il 2050, ci indica che la produzione alimentare dovrà aumentare rispetto allo stato attuale. Ciò comporterà un

aumento della produzione dell'acquacoltura, con ulteriore aumento del sovrasfruttamento delle risorse marine. La sfida che si presenta al giorno d'oggi si basa quindi sulla ricerca di mangimi con adeguato profilo nutrizionale che provengano da sistemi di produzione sostenibili. Inoltre, per affrontare le sfide alimentari future, occorrerà tenere in considerazione altre problematiche come i cambiamenti climatici, la carenza di risorse idriche, lo spreco alimentare e la produzione di rifiuti (FAO, 2013).

I rifiuti rappresentano un'enorme dilapidazione di risorse sotto forma di materiali e di energia. Le discariche, ad esempio, occupano spazio e possono provocare inquinamento del suolo, dell'acqua e dell'aria, mentre l'incenerimento può diventare fonte di emissione di inquinanti atmosferici. Nel 2014, in Europa, sono state prodotte 4.9 tonnellate di rifiuti per abitante (Eurostat Statistic Explained, 2017).

Un metodo utile alla riduzione degli sprechi alimentari, stimati un terzo della produzione alimentare in Nord America ed Europa, e della produzione di rifiuti è il riciclaggio. La produzione di cibo che non viene mangiato rappresenta uno sfruttamento inutile di terra, acqua e altre risorse, oltre a peggiorare la sicurezza alimentare; negli Stati Uniti, il valore delle perdite e degli sprechi alimentari ammonta a oltre 161 milioni di dollari all'anno (Mourad, 2016).

In merito al riciclaggio dei rifiuti, si sta assistendo a una forte sensibilizzazione della popolazione, in modo particolare nell'Unione Europea. Dal 4 luglio 2018 è entrato in vigore il "Pacchetto Economia Circolare", il quale contiene quattro direttive (849/2018/UE, 850/2018/UE, 851/2018/UE, 852/2018/UE), che modificano le direttive sui rifiuti. Tra gli obiettivi è previsto il riciclaggio del 55% dei rifiuti urbani entro il 2020 e del 65% entro il 2035 (European Commission Press Release Database, 2018).

L'economia circolare è quindi un modello di produzione e consumo che implica condivisione, prestito, riutilizzo, riparazione, ricondizionamento e riciclo dei materiali e prodotti esistenti il più a lungo possibile. In questo modo si estende il ciclo di vita dei prodotti, contribuendo a ridurre i rifiuti al minimo. Una volta che il prodotto ha terminato la sua funzione, i materiali di cui è composto vengono reintrodotti, laddove possibile, nel ciclo economico. Così si possono continuamente riutilizzare all'interno del ciclo produttivo generando ulteriore valore (European Parliament, 2018).

Da questo punto di vista gli insetti rappresentano un'interessante risorsa capace di essere inserita all'interno dell'economia circolare. Sono infatti una valida alternativa ad alcuni

prodotti alimentari e hanno dimostrato di essere estremamente efficienti nel riutilizzo dei rifiuti organici emettendo bassi livelli di gas serra (FAO, 2013).

Gli insetti possono essere alimentati da rifiuti organici e alimentari, convertendoli in biomassa ricca di proteine e grassi. Questo processo aiuta a ridurre le problematiche ambientali legate alla rivalutazione dei rifiuti alimentari (Makkar et al., 2014). Un caso interessante è quello della “Mosca Soldato Nera” (BSF) *Hermetia illucens*, la quale, come altri insetti, può essere usata per riciclare i rifiuti prodotti da allevamenti di bestiame. È stato osservato che questo dittero trasforma circa il 50% di sostanza secca di questi rifiuti organici in biomassa di insetto con alto valore proteico (Tomberlin et al., 2015). Studi condotti su *Musca domestica* hanno dimostrato l’abilità di questo insetto nella rielaborazione di letame, trasformandolo in composti ad elevato valore nutrizionale. Inoltre, è stata osservata una consistente riduzione della massa di letame e conversione di quest’ultimo in materiale granulare inodore (Čičková et al., 2015).

Negli ultimi anni, è cresciuto l’interesse nei confronti degli insetti come alternativa praticabile ai mangimi. In molti casi gli insetti fanno parte della dieta principale dei pesci d'acqua dolce e molti pesci marini si nutrono anche di crostacei, che sono anche artropodi, condividendo quindi alcune delle loro caratteristiche con gli insetti (Ferrer et al., 2019).

Secondo studi condotti su trote alimentate con farina di insetto di BSF si può concludere che questa potrebbe sostituire la farina di pesce senza importanti perdite di peso corporeo, inoltre non sono stati osservati segni di carenze nutrizionali o eventi di mortalità relativi a questa alimentazione. Il fattore che limita una migliore efficacia di questa dieta potrebbe essere il contenuto di chitina, poiché questo componente dell'esoscheletro, comune a molti invertebrati, potrebbe avere effetti negativi sulla digeribilità dei nutrienti (Stamer et al., 2014).

La grande varietà di specie di insetti, habitat, fasi di sviluppo, abitudini alimentari e altre caratteristiche influiscono molto sul valore nutrizionale degli insetti stessi e li rendono interessanti da studiare come alimento alternativo per i pesci. Anche se gli insetti presentano generalmente caratteristiche che non corrispondono ai valori nutritivi adeguati alle specie ittiche, il profilo amminoacidico dei ditteri mostra che questo gruppo di insetti potrebbe essere una possibile fonte alternativa di proteine da usare in acquacoltura (Barroso et al., 2015).

Il progetto NUTRIFISH (codice 2017.0571) si basa sullo sviluppo di mangimi per acquacoltura derivanti da farine di insetto partendo dalla ricerca di substrati alternativi a basso costo ed ecosostenibili per l'allevamento e la crescita del dittero *Hermetia illucens* (Stratiomyidae, stadio di prepupa). A questo scopo, sono stati testati substrati di alimentazione degli insetti basati sul riutilizzo del silverskin, il principale prodotto di scarto dell'industria della torrefazione del caffè, arricchito con diverse percentuali di microalga *Schizochytrium* sp o *Isochrysis* sp (Truzzi et al., 2019).

1.2 *Hermetia illucens*

Comunemente chiamata “mosca soldato nera” (Black Soldier Fly), *Hermetia illucens* (HI) è un dittero appartenente alla famiglia Stratiomyidae originario delle Americhe e dell'Asia del sud. Questo insetto, a causa delle proprie caratteristiche morfologiche e fisiologiche, riveste particolare interesse in ambito scientifico, tanto da essere impiegato come modello in numerosi studi. HI può raggiungere i 27 mm di lunghezza, anche se le femmine sono più piccole dei maschi. Il dimorfismo sessuale è accentuato da altri caratteri: le femmine hanno un addome più lungo, quantità maggiore di peli bianchi sul capo e dimensioni delle ali più grandi. Per arrivare alla maturità sessuale le larve impiegano 14 giorni e passano attraverso sei stadi, da adulti perdono l'apparato boccale: l'energia ottenuta nella fase di larva è quella che impiegano nella riproduzione e per il resto della vita (Marzouk, 2016).

Lo stadio di prepupa di HI è un ingrediente alimentare comune per molti animali, compresi pesci e suini. In Corea, la mosca soldato nera ha attratto interesse come possibile soluzione per lo smaltimento di materiale organico, per esempio lo spreco di cibo. La fattibilità di questa proposta risiede nella capacità di produrre continuamente numerose larve in grado di elaborare elevati volumi di rifiuti organici (Park, 2016).

Studi riguardanti le caratteristiche istologiche dell'apparato digerente di storioni siberiani (*Acipenser baerii*) alimentati con diete contenenti farine proteiche di pesce, vegetali e di *Hermetia illucens* hanno messo in evidenza come l'uso della farina di *Hermetia illucens* in sostituzione al 25% della farina di pesce possa essere una valida alternativa per l'alimentazione dello storione siberiano (Cami et al., 2017).

È stato valutato l'effetto della farina e olio di insetti di *Hermetia illucens* sulla performance della crescita, composizione corporea e digeribilità dei nutrienti nel salmone

atlantico allevato in acqua dolce. I risultati hanno mostrato che è possibile aggiungere 600 g/kg di farina di insetto in combinazione con olio di insetto nelle diete del salmone atlantico d'acqua dolce senza alcun effetto negativo sulle prestazioni di crescita, uso di mangimi, apparente digeribilità e composizione corporea. Inoltre, la farina proteica di HI sembra essere una buona fonte di aminoacidi e ha un'alta biodisponibilità per aminoacidi nel salmone atlantico (Belghit et al., 2018).

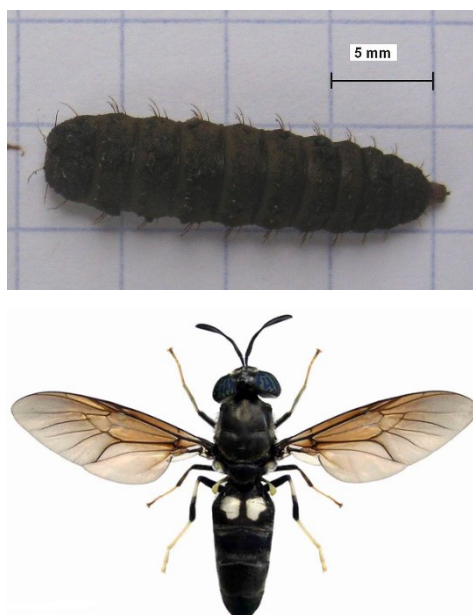


Fig. 6 – Larva (sopra). e adulto (sotto) di *Hermetia illucens*.

Un sistema di allevamento delle larve di *H. illucens* su rifiuti di origine vegetale potrebbe fornire una risorsa per l'ottenimento di insetti di alta qualità con il potenziale per essere incorporata nei mangimi per animali. La qualità di questa risorsa sarebbe costante in termini di contenuto proteico grezzo e profilo aminoacidico, indipendentemente dal tipo di materiale di rifiuto offerto dalle larve. Tuttavia, il contenuto di grassi sembra dipendere dal substrato di allevamento: le larve allevate su substrati densi di energia si trasformano in prepupe con un alto contenuto di grassi. Questo grasso potrebbe fornire un valore aggiunto alle prepupe rispetto alle risorse di alimentazione convenzionali (Spranghers et al., 2016).

Come già accennato, nell'ambito del progetto Nutrifish, le larve di *H. illucens* sono state fatte crescere su scarti industriali derivanti dalla torrefazione di caffè (silverskin), arricchiti con diverse percentuali di microalga *Schizochytrium* sp o *Isochrysis* sp. Le prepupe allevate sul substrato arricchito con *Schizochytrium* sp hanno mostrato il profilo lipidico migliore, con una diminuzione significativa della percentuale di acidi grassi saturi a favore degli

insaturi. Considerando il rapporto costi-benefici, un'inclusione del 10% di *Schizochytrium* sp nel substrato di crescita sembra essere la più conveniente per allevare *H. illucens* e ottenere una biomassa finale dall'alto valore nutrizionale (Truzzi et al., 2019).

1.3 *Danio rerio*

Lo zebrafish, *Danio rerio* (Fig 7), è uno dei più importanti organismi vertebrati impiegati come modello in genetica, biologia, neurofisiologia e biomedicina. Presenta caratteristiche che lo rendono particolarmente trattabile per la sperimentazione. Si tratta di un pesce piccolo e robusto, con alto tasso di riproduzione, cosa che lo rende un organismo adatto da impiegare come modello.



Fig. 7 – *Danio rerio*

Appartiene alla famiglia Cyprinidae. In condizioni di laboratorio un adulto di zebrafish pesa tra gli 0.5 e 0.9 g e la lunghezza varia da 22 a 38 mm; la lunghezza massima corrisponde a quella riscontrata negli individui in natura (Ribas and Piferrer, 2014).

La forma del corpo è fusiforme e compressa lateralmente, con la bocca obliqua e rivolta verso l'alto. La mascella inferiore sporge superiormente e gli occhi sono centrali e non visibili dall'alto. La pinna anale è a strisce tutte simili tra loro, mentre la pinna dorsale ha il bordo superiore blu scuro, bordata di bianco. Maschi e femmine sono di colorazione simile, sebbene i maschi tendano ad avere pinne anali più grandi con una colorazione più gialla (Spence et al., 2018).

In generale si può affermare che il dimorfismo sessuale prevalga in favore delle femmine, specialmente negli adulti. I maschi sono di solito più piccoli e hanno un corpo più

allungato con strisce blu e oro, mentre le femmine sono più grandi, più arrotondate con una pancia biancastra, strisce blu e argento e presentano una piccola papilla genitale davanti alla pinna anale (Ribas and Piferrer, 2014).

L'ambiente naturale del *Danio rerio* si trova attorno ai bacini fluviali del Gange e del Brahmaputra nell'India nord-orientale, nel Bangladesh e nel Nepal. È un pesce d'acqua dolce, vive in fiumi, piccoli corsi d'acqua, stagni e risaie.

Lo zebrafish è onnivoro, la sua dieta naturale consiste principalmente in zooplancton e insetti, anche se grazie all'analisi del contenuto intestinale sono stati rilevati fitoplancton, alghe filamentose, piante vascolari, spore e uova invertebrate, squame di pesce, aracnidi, detriti, sabbia e fango (Ribas and Piferrer, 2014; Spence et al., 2018).

Rispetto alla maggior parte delle specie d'acquacoltura, *Danio rerio* ha un ciclo vitale molto più breve, raggiungendo la competenza riproduttiva intorno al terzo mese di età. È un pesce asincrono, con follicoli in tutte le fasi dello sviluppo nelle ovaie. In condizioni di laboratorio, le uova vengono generate durante tutto l'anno (Ribas and Piferrer, 2014).

Il tasso di crescita di zebrafish è più rapido durante i primi tre mesi successivi alla schiusa, dopo di che inizia a diminuire, avvicinandosi allo zero a circa 18 mesi (Fig. 8). I tassi di crescita dei ceppi domestici in laboratorio sono stati riportati come superiori a quelli dei pesci selvatici. Questa differenza nei tassi di crescita deriva principalmente da una maggiore assunzione di cibo in cattività (Spence et al. 2018).

Non sono state osservate differenze significative nella sopravvivenza di zebrafish alimentati per sei mesi con mangimi inclusi con *Hermetia illucens* rispetto a quelli alimentati con farine di pesce. Nello specifico, gli individui alimentati con mangimi contenenti il 25% di HI hanno mostrato una sopravvivenza superiore agli altri. Inoltre, l'analisi istologica dell'intestino non ha mostrato segni di infiammazione e sia i marker di stress che i marker di risposta immunitaria non hanno mostrato differenze significative tra i gruppi sperimentali (Zarantoniello et al., 2019).

Altri studi riguardanti l'alimentazione di larve di *Danio rerio* con inclusioni di *Hermetia illucens*, non hanno riportato differenze tra i vari gruppi di studio riguardo a sopravvivenza, lunghezza massima standard e peso secco. Non sono stati osservati segni evidenti di infiammazione intestinale. Un'alta integrazione di acidi grassi a catena media, attraverso la dieta degli insetti, potrebbe evitare l'incidenza di infiammazione della mucosa intestinale nelle larve di pesce a causa del loro importante ruolo nel migliorare la salute dell'intestino.

Questi dati sono stati supportati da analisi molecolari su marcatori di stress che non hanno mostrato variazioni significative nella loro espressione durante l'esperimento (Vargas et al., 2018).

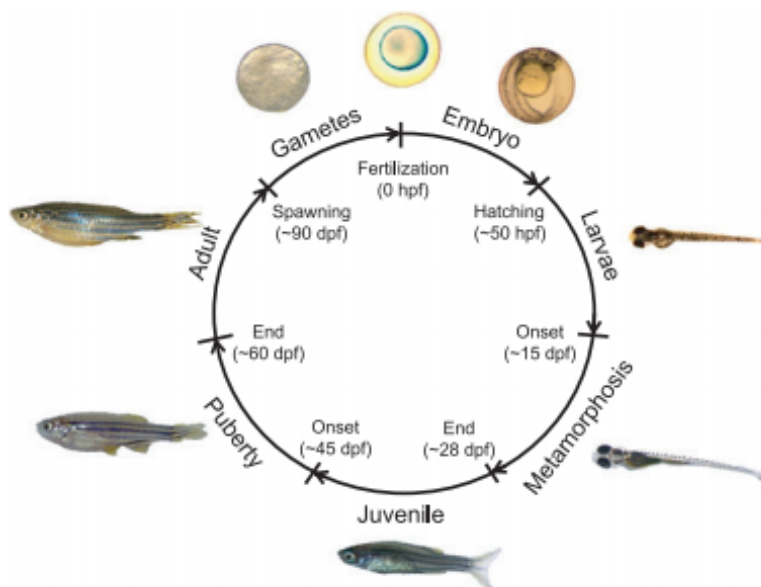


Fig. 8 - Ciclo vitale di *Danio rerio* (hpf: ore dopo fecondazione; dpf: giorni dopo fecondazione) (Ribas and Piferrer, 2014).

1.4 Metalli come contaminanti

Dei 94 elementi presenti in natura 70 sono metalli, definiti come elementi di buona conducibilità elettrica e di calore, che formano cationi per perdita di elettroni e che producono ossidi e idrossidi basici. Il termine "metallo pesante" (considerato generalmente in una accezione negativa) è, al giorno d'oggi, obsoleto e chimicamente privo di senso (Wood et al., 2012). "Metallo" si riferisce all'elemento puro o a una lega di elementi metallici, mentre "pesante" nell'uso convenzionale implica alta densità. La conoscenza della densità non è così rilevante riguardo alla previsione degli effetti biologici dei metalli, poiché gli elementi metallici o le loro leghe non sono, nella maggior parte dei casi, le specie che interagiscono con i sistemi biologici. Oltre a "metallo pesante" vi sono altri termini o espressioni impiegati in letteratura che non presentano definizioni precise:

1. Metallo leggero: termine usato raramente in riferimento sia a un determinato elemento che ai suoi composti. Bjerrum, creatore del termine, lo ha applicato a metalli di densità inferiore a 4 g/cm^3 .

2. Metallo essenziale: metallo richiesto per l'intero ciclo di vita di un organismo, la cui assenza produce specifici sintomi di carenza alleviati solo da quel metallo e il cui effetto dovrebbe essere riferito a una curva dose-risposta. Spesso viene usato in modo approssimativo per riferirsi sia all'elemento che ai suoi composti.
3. Metallo benefico: termine antiquato ormai largamente in disuso, il quale implicava che un metallo non essenziale potesse migliorare la salute. Un altro termine che è stato usato in riferimento sia all'elemento che ai suoi composti.
4. Metallo tossico: termine impreciso. Tutte le sostanze, incluso il carbonio, sono tossiche se somministrate in determinate dosi. Il grado di tossicità dei metalli varia molto da metallo a metallo e da organismo a organismo. I metalli puri sono raramente molto tossici (tranne che in polveri molto fini, le quali possono essere dannose per i polmoni). La tossicità, come l'essenzialità, dovrebbe essere definita in riferimento a una curva dose-risposta per la specie in esame.
5. Metallo abbondante: solitamente si riferisce alla proporzione dell'elemento nella crosta terrestre, sebbene possa essere definito in termini di altri ambienti, ad esempio oceani, acque dolci, ecc.
6. Metallo disponibile: metallo che si trova in una forma assimilabile
7. Metallo in traccia: metallo trovato in bassa concentrazione (ppm o meno), in una certa sorgente specifica, ad esempio terreno, pianta, tessuto, acqua freatica, ecc.
8. Micronutrienti: termine più recente per descrivere più accuratamente il significato di “metallo in tracce” (Duffus, 2002).

In riferimento alla salute umana, i metalli sono classificabili in essenziali e non essenziali. Tra i primi troviamo calcio, magnesio, manganese, selenio, zinco, ferro e rame, mentre tra i non essenziali sono presenti nichel, cromo esavalente, arsenico, cadmio, piombo e mercurio. (Mudipalli and Zelikoff, 2017).

La Fig. 9 mostra la relazione tra intake di un elemento, concentrazione dell'elemento nel tessuto e indice di salute. La curva I rappresenta un elemento in traccia essenziale, il quale può produrre effetti avversi in condizioni di ridotta o eccessiva esposizione. La curva II rappresenta invece un elemento non essenziale, i cui effetti avversi sono associati solo a condizioni di eccessiva esposizione. Gli intake A e B rappresentano gli assorbimenti di elementi che producono significativi cambiamenti dai valori di norma per uno o più indici di salute dovuti rispettivamente a deficienza o tossicità (Spivey Fox and Tao, 1981).

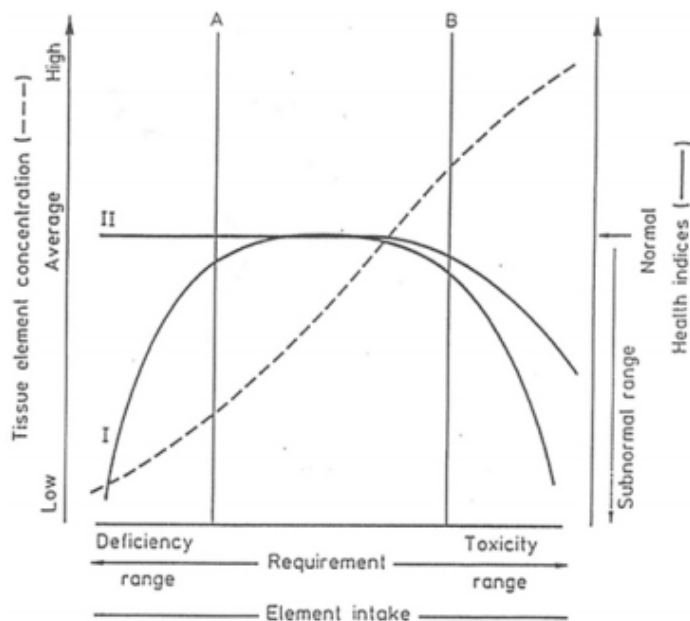


Fig. 9 - Relazione tra intake di un elemento, concentrazione dell'elemento nel tessuto e indice di salute. (Spivey Fox and Tao 1981).

I metalli, in modo particolare quelli essenziali, sono presenti nel corpo umano in concentrazioni molto basse, nell'ordine di ppb (parti per miliardo), sono pertanto definiti oligoelementi o elementi in traccia. Gli oligoelementi essenziali devono essere presenti nei tessuti in concentrazioni costanti, carenze alimentari possono provocare alterazioni strutturali e fisiologiche analoghe in più specie animali. Le funzioni svolte dagli elementi in traccia sono varie: stabiliscono le differenze di potenziale attraverso le membrane, consentono reazioni enzimatiche di ossidoriduzione, agiscono come cofattori di reazioni enzimatiche e mantengono la struttura di proteine e ormoni (Costantini et al., 2016).

Per valutare la reattività fisica, la biodisponibilità e la tossicità degli elementi in tracce, quindi dei metalli, è essenziale studiare la speciazione degli elementi stessi. Il termine "speciazione chimica" è stato definito nelle "Raccomandazioni IUPAC 2000" come la forma specifica di un elemento: composizione isotopica, stato di ossidazione e struttura complessa o molecolare. Si può affermare che la formazione di complessi del metallo svolge un ruolo significativo nei confronti dei comportamenti biogeochimici negli ambienti marini (Hirose, 2006).

Un esempio della tossicità in relazione alla forma dell'elemento è rappresentato dallo stagno, in particolare dai composti del tributilstagno (TBT), generalmente usati come biocidi nelle vernici antifouling. Questi inducono (a concentrazioni molto basse, nell'ordine di ppb)

anomalie nell'apparato sessuale femminile. Questo fenomeno, chiamato imposex, è essenzialmente una malattia genitale causata da uno squilibrio ormonale in cui le femmine di gasteropodi gonocorici sviluppano organi sessuali maschili, in particolare pene e dotto deferente. Tutti gli studi approfonditi su questo argomento dimostrano che l'imposex è strettamente legato al livello di esposizione al TBT e che la sua incidenza varia a seconda della diversa sensibilità delle specie considerate. Inoltre, poiché nessun altro composto è noto per indurre l'imposex, è stato ampiamente impiegato come strumento di biomonitoraggio della contaminazione da TBT (Terlizzi et al., 1999).

Un altro esempio della differenza di tossicità tra le varie forme di un elemento è rappresentato dall'arsenico, che verrà descritto nell'omonima sezione.

I metalli sono in grado di interagire e interferire con numerosi processi cellulari. Le "heat shock protein" (Hps), in modo particolare le Hps70, sono una famiglia di proteine incluse nel gruppo dei chaperoni, la cui funzione è facilitare il processo di ripiegamento di altre proteine. Queste proteine abbondano nelle cellule che hanno subito uno stress termico da alte temperature (Lehninger, 2012). Sebbene queste ultime siano gli induttori classici di queste proteine, è stato osservato che una varietà di altri stress, tra cui i metalli pesanti, possono indurre le Hsp. Nello specifico l'esposizione di metalli pesanti può causare uno stress ossidativo con conseguente aumento della generazione di ROS (specie reattive dell'ossigeno) e quindi induzione della proteotossicità. Le proteine sintetizzate in risposta a questo stress possono mantenere l'omeostasi cellulare promuovendo il corretto ripiegamento delle proteine mal ripiegate dallo stress, prevenendo la formazione di aggregati proteici e promuovendo la degradazione delle proteine mal ripiegate o denaturate (Fig. 10) (Gupta et al., 2010).

Numerosi studi hanno documentato la rapida espressione di Hsp negli organismi acquatici dopo l'esposizione a metalli pesanti. Ad esempio, livelli maggiori della famiglia Hsp70 sono stati misurati in tessuti di pesci esposti a metalli pesanti come rame, zinco e mercurio (Harrison et al., 2000).

Inoltre, è stato osservato che i chaperoni svolgono altri ruoli oltre al ripiegamento cellulare. Nel caso del rame esistono delle proteine altamente specifiche chiamate appunto "chaperoni del rame". Questi hanno una funzione preventiva: evitano che il rame abbia interazioni inappropriate con altri componenti cellulari (Harrison et al., 2000).

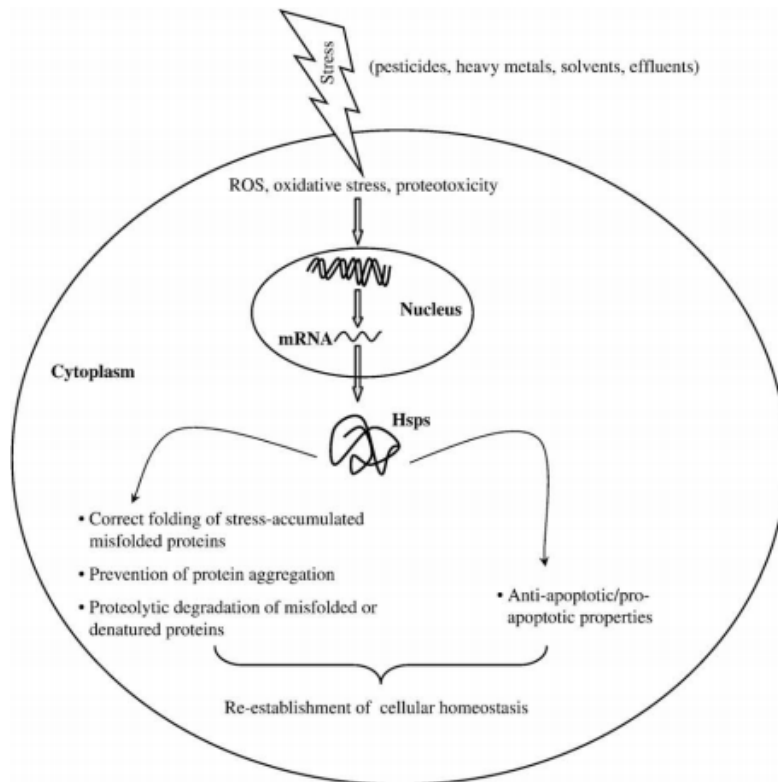


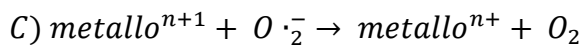
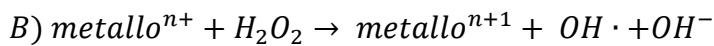
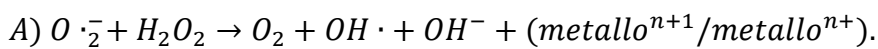
Fig. 10 - Rappresentazione schematica dell'induzione di Hsp in condizioni di stress ambientale (Harrison et al., 2000).

Altre molecole interessate al metabolismo dei metalli sono le metallotioneine (MT). Queste sono proteine a basso peso molecolare caratterizzate da un elevato contenuto di cisteina (30%). La maggior parte delle MT ha due gruppi metallici contenenti rispettivamente tre e quattro ioni metallici bivalenti. La famiglia di geni codificanti per le MT nei mammiferi consiste in quattro sottofamiglie designate da MT-1 a MT-4. MT-3 è espresso prevalentemente nel cervello e MT-4 nel differenziare le cellule epiteliali squamose stratificate (Carpenè et al., 2007).

Poiché le MT legano non solo Zn e Cd, ma anche Cu, un possibile ruolo per le metallotioneine riguarda il metabolismo di metalli essenziali, trasferendo metalli legati alle MT ad altre proteine. Inoltre, le MT sono implicate nel sequestro di metalli tossici a causa delle proprietà di coordinare sia il cadmio che il mercurio nella cellula. I meccanismi delle reazioni di cattura dei metalli non sono ben noti. Si ritiene che la metallotioneina possenga alcune caratteristiche strutturali che facilitano il coordinamento degli ioni metallici in modo sequenziale (legame cooperativo) (Rigby and Stillman 2004).

Come già accennato, i metalli possono dare origine a stress ossidativo. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono state collegate a varie lesioni cellulari tra cui la perossidazione lipidica della membrana, l'alterazione del DNA, danneggiamento delle proteine e inattivazione degli enzimi (Regoli and Winston, 1999).

I metalli in tracce e gli xenobiotici organici sono classi tipiche di inquinanti ambientali con effetti proossidanti; i meccanismi più importanti per la generazione di ROS da parte di metalli in traccia dipendono dalla loro capacità di perdere elettroni e catalizzare le reazioni di Fenton e Haber Weiss (reazione 1).



Reazione 1 – Reazioni di Haber Weiss: la reazione A è scomponibile nelle reazioni B e C catalizzate da metalli; queste sono cataliticamente lente, ad eccezione della B (reazione di Fenton) (Regoli and Giuliani 2014).

Queste reazioni generano un radicale ossidrilico dopo la riduzione di un metallo ossidato da un anione superossido e reazione con perossido di idrogeno. I metalli che possono catalizzare queste reazioni sono: ferro, rame cromo, vanadio, cobalto e nichel (Regoli and Giuliani 2014).

I metalli pesanti, essendo sostanze xenobiotiche, sono riconosciuti come tali dall'organismo e possono essere soggetti a bioaccumulo e biomagnificazione.

Il bioaccumulo è definito come l'assorbimento di una sostanza chimica da parte di un organismo dall'ambiente abiotico o biotico. Una volta che i contaminanti si trovano all'interno di un organismo, possono essere metabolizzati e/o escreti in modo che la concentrazione sia in equilibrio tra assunzione ed escrezione (Diener et al., 2015).

La biomagnificazione è il processo in cui le sostanze xenobiotiche vengono trasferite dal cibo a un organismo con concentrazioni risultanti più elevate rispetto alla fonte. La biomagnificazione non è una costante negli ecosistemi marini. I metalli vengono eliminati facilmente dagli organismi, essi infatti non si accumulano. Solo Hg organico dimostra evidenze di non eliminazione (Gray, 2002).

1.4.1 Nichel

Il nichel (Ni) è un elemento naturale onnipresente e si trova al 24° posto in abbondanza nella crosta terrestre, con una concentrazione media di 75 µg/g (Wood et al., 2012).

Il nichel puro è un metallo duro, argenteo, brillante, malleabile, duttile e con elevata conduttività elettrica e termica. A causa della sua elevata resistenza alla corrosione, Ni è impiegato per la produzione di leghe con altri metalli ad esempio ferro, rame, cromo e zinco (Das et al., 2009).

L'essenzialità del nichel è tutt'oggi argomento di discussione. A causa della sua abbondanza, la carenza di nichel non si verifica. Una dieta povera di nichel è difficile da mantenere proprio a causa dell'abbondanza dell'elemento in tutti i tipi di alimenti. Negli organismi superiori non sono noti enzimi o cofattori che includono il nichel (Denkhaus et al., 2002), mentre è riconosciuta la presenza di questo metallo in numerosi fattori di batteri e piante (Drake et al., 1982; Kasprzak, 1987; Baker et al., 2000).

Alcuni studi sui topi hanno fornito risultati per i quali il nichel sembrerebbe avere ruoli importanti nei processi fisiologici. Una carenza di Ni in topi provoca: riduzione della crescita, aumento della mortalità perinatale, cattivo sviluppo di peli, inattività, cambiamenti di colore del fegato, ematocrito, diminuzione di emoglobina ed eritrociti, ridotto assorbimento di ferro e vari altri segni patologici e biochimici (Phipps et al., 2002).

L'eccessiva assunzione di nichel da parte dei ratti maschi determina un aumento del nichel testicolare, il restringimento dei tubuli seminiferi, la riduzione degli spermatozoi e la diminuzione della fertilità. Poiché sia l'eccesso che la carenza di nichel nella dieta diminuiscono le caratteristiche fisiologiche degli spermatozoi, che molto probabilmente potrebbero portare a prestazioni riproduttive compromesse, deve esserci un'assunzione ottimale di nichel per la riproduzione (Yokoi et al., 2002).

In riferimento alla salute umana, gli effetti nocivi del nichel dipendono dalla via e dal grado di esposizione. Il più comune effetto nocivo sulla salute del nichel è una reazione allergica della pelle in coloro che ne sono sensibili (Das et al., 2009). Tuttavia, questo metallo non è solo un allergene ma anche un potenziale agente immunomodulatore e immunotossico nell'uomo (Das and Buchner, 2007). Sulla base di studi su lavoratori esposti a nichel e su animali da laboratorio, tutti i composti del nichel, ad eccezione del nichel metallico, sono stati classificati come cancerogeni umani dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) (IARC, 1990).

Come già accennato, il nichel può indurre la produzione di ROS catalizzando la reazione di Fenton in presenza di agenti contenenti gruppi tiolici (Regoli and Giuliarini, 2014).

Molti composti del nichel sono cancerogeni e si accumulano nel nucleo, specialmente nella frazione nucleolare. Esso può legarsi con proteine nucleari, RNA e DNA e causare rottura dei filamenti, indurre aberrazioni cromosomiche, scambio di cromatidi fratelli, diminuzione della sintesi dell'RNA, alterazione dell'attività mitotica ed espressione genica in cellule nei mammiferi e nell'uomo (Poonkothai and Vijayavathi, 2012).

L'assunzione giornaliera media di nichel con il cibo è compresa tra 100 e 300 µg. Le dosi letali 50 (LD₅₀) orali di nichel nei topi si trovano nell'intervallo 67-139 mg/kg di peso corporeo. Questi valori si basano su studi effettuati su ratti che hanno mostrato un NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) di 5 mg/kg di peso corporeo al giorno. È stato determinato un TDI (Total Daily Intake) di 5-11 g/kg di peso corporeo. Il valore indicativo TDI nell'acqua potabile è 0.02 mg/litro, che dovrebbe fornire una protezione sufficiente alle persone sensibili al nichel (FAO, 1996).

1.4.2 *Arsenico*

L'arsenico (As) è un elemento moderatamente tossico, naturalmente abbondante, senza ruoli nutrizionali o metabolici noti (Wood, 2012). Le forme inorganiche sono costituite principalmente da arsenite, mentre l'arseniato è tossico per la salute umana (Mazumder, 2008). Generalmente l'arsenite è più tossica dell'arsenato (Wood, 2012). La tossicità dell'arsenico dipende quindi dalla sua forma. I composti organici dell'As sono meno tossici dei composti inorganici (Bissen and Frimmel, 2003).

Il triossido di arsenico (As₂O₃) è l'arsenico inorganico più diffuso nell'aria, mentre una varietà di arseniati inorganici (AsO₄³⁻) o arseniti (AsO₂⁻) si trovano in acqua, suolo e cibo. La più grande fonte di arsenico è il cibo, di cui le principali fonti sono frutti di mare, riso, funghi e pollame. Tra questi, i più ricchi di As sono i primi, in questi è presente principalmente in forma di arsenobetaina, che è molto meno dannosa di altri (Jomova, 2011).

A causa della somiglianza molecolare (Fig. 11), l'arseniato può sostituire il fosfato dell'adenosina difosfato (ADP), durante la fosforilazione ossidativa in adenosina trifosfato

(ATP), portando a una compromissione mitocondriale e inibizione del metabolismo energetico glicolitico (Fattorini and Regoli, 2004).

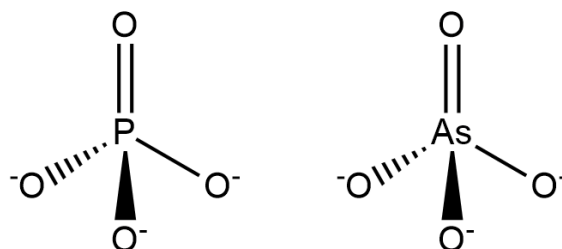


Fig. 11 – Struttura dello ione fosfato (sinistra) e arseniato (destra).

La maggior parte dei mammiferi metabolizza l'arsenico inorganico mediante metilazione in acido metilarsonico (MMA) e acido dimetilarsinico (DMA). Questi prodotti sono meno reattivi con i costituenti dei tessuti e sono più facilmente escreti nelle urine rispetto all'arsenico inorganico. La metilazione agisce quindi come meccanismo di detossificazione (Vahter, 2002).

Nonostante la forma di As più presente negli organismi sia quella organica (Jomova, 2011), sono presenti eccezioni riguardanti sia la concentrazione che la speciazione di questo elemento nei tessuti. Un esempio è quello del polichete *Sabella spallanzani*, il quale presenta una concentrazione di As nella corona branchiale di circa 760 ppm, rispetto ai 18 ppm presenti nel torace. Inoltre, l'80% di questo elemento si trova in forma di DMA (Fattorini and Regoli, 2004).

Il gruppo di esperti scientifici sui contaminanti nella catena alimentare dell'EFSA (CONTAM) ha concluso che l'assunzione settimanale tollerabile provvisoria (PTWI) è di 15 µg/kg di peso corporeo (EFSA Journal, 2009).

Il gruppo CONTAM ha individuato inoltre valori per la dose letale di riferimento (BMDL₀₁) tra 0,3 e 8 µg/kg di peso corporeo al giorno per il cancro a polmoni, vescica e pelle, nonché per lesioni cutanee. L'esposizione alimentare stimata dell'arsenico inorganico per i consumatori in Europa cade al di sotto della gamma dei valori BMDL₀₁ e, pertanto, non vi è esposizione, ma la possibilità di un rischio per i consumatori non può essere esclusa. (Regolamento (UE) 2015/1006 della Commissione del 25 Giugno 2015).

1.4.3 *Cadmio*

Il cadmio (Cd) è un elemento onnipresente, naturale e di elevato interesse ambientale. Le concentrazioni di Cd nella geosfera sono generalmente basse, ad eccezione dell'arricchimento associato a depositi di minerali di Zn, Pb e Cu, nonché ad alcune formazioni rocciose di fosfati. La tossicità del Cd per le specie acquatiche dipende dalla speciazione; la concentrazione di Cd²⁺ nei tessuti è proporzionale alla biodisponibilità. La tossicità è ridotta dalla complessazione di Cd²⁺ da parte di anioni inorganici e organici (Wood et al., 2012).

Il cadmio è stato classificato come ottavo nella Top 20 dell'elenco delle sostanze pericolose (ATSDR, 1999) e l'attività umana ha aumentato notevolmente la distribuzione del Cd nell'ambiente globale. Il cibo e il fumo di sigaretta sono le principali fonti di esposizione al Cd (Klaassen et al., 2009).

Il cadmio esercita effetti tossici in differenti modi: è altamente reattivo con i gruppi tiolici di proteine, può sostituire lo zinco in alcuni enzimi e compete con il calcio sia nei canali dello stesso che nelle proteine leganti il calcio intracellulare. Il cadmio induce inoltre la sintesi di metallotioneine. Alcuni studi suggeriscono che il cadmio sfrutti i canali del calcio voltaggio-dipendenti per l'ingresso nella cellula (Hinkle et al., 1987).

Le specie reattive dell'ossigeno sono spesso implicate nella tossicologia del Cd. I meccanismi di tossicità acuta da Cd comportano l'esaurimento dei gruppi sulfidrilici di glutatione, con conseguente aumento della produzione di ROS, come ione superossido, perossido di idrogeno e radicali ossidrilici. Le ROS producono perossidazione lipidica e danni al DNA (Liu et al., 2008).

Il cadmio inoltre interferisce sulla trascrizione del gene P450_{scc}, adibito alla sintesi del citocromo P450, il quale è impiegato nelle reazioni di fase I, e nella via steroidogena. I cambiamenti indotti da Cd²⁺ sull'espressione del gene P450_{scc} nelle cellule granulosa potrebbero influenzare la sintesi di tutti gli ormoni steroidei nell'ovaio (Smida et al., 2003).

La malattia tai-itai, riscontrata in numerosi abitanti del bacino del fiume Jinzu nella prefettura di Toyama, è la forma più grave di avvelenamento cronico da cadmio causato da una prolungata ingestione orale di Cd. Il quadro clinico caratteristico della malattia di Itai-itai mostra danni a livello renale e osseo (Inaba et al., 2005). Il cadmio agisce in differenti modi. In primo luogo, è stato osservato che il Cd provoca danni renali a livello delle cellule in cui si verifica il metabolismo della vitamina D, ciò può causare una carenza della vitamina

che, a sua volta, porta a una riduzione dell'incorporazione del calcio nelle ossa. Il Cd inoltre riduce l'assorbimento del calcio gastrointestinale, vi è quindi una riduzione della disponibilità di calcio nel corpo, provocando decalcificazione ossea. Nel terzo meccanismo il Cd influenza direttamente il metabolismo del collagene osseo, riducendo l'attività della lisil-ossidasi (Nogawa et al., 1987).

Studi condotti da FAO/OMS sugli additivi alimentari hanno stabilito un'assunzione mensile tollerabile provvisoria (PTMI) di 25 µg/kg di peso corporeo, mentre dati forniti dall'EFSA (Autorità Europea Per La Sicurezza Alimentare) hanno definito un'assunzione settimanale tollerabile di 2,5 µg/kg di peso corporeo per garantire una protezione sufficiente a tutti i consumatori (European Food Safety Authority, 2012).

Secondo il Regolamento (CE) N. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, SCF (Comitato Scientifico dell'alimentazione Umana) ha approvato un'assunzione settimanale tollerabile provvisoria (PTWI) di 7 µg/kg di peso corporeo e ha raccomandato di intensificare gli sforzi per ridurre l'esposizione alimentare al cadmio, dal momento che i prodotti alimentari sono la principale fonte di assunzione di cadmio nell'uomo (Regolamento (CE) N. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006).

1.4.4 *Piombo*

Tra i metalli non essenziali, pochi hanno eguagliato il significato del piombo (Pb) in termini di utilità e tossicità. La biodisponibilità di Pb per gli organismi acquatici dipende in gran parte dal pH, alcalinità, durezza e contenuto di sostanza organica naturale dell'acqua ricevente (Wood et al., 2012).

Al giorno d'oggi la fonte principale di tossicità derivante da piombo è rappresentata dalla forma inorganica. L'uso dei composti organici contenenti Pb è in calo, in particolare con la fine nell'impiego a livello mondiale di alchili di piombo nella benzina (Gidlow, 2015).

L'avvelenamento dovuto al piombo si verifica principalmente per ingestione di cibo o acqua contaminata da piombo. Tuttavia, l'ingestione accidentale di polvere o vernice a base di piombo può provocare avvelenamento (Wani et al., 2015).

Il piombo presenta quindi una spiccata tossicità per l'organismo umano, si possono riscontrare effetti a livello del sistema endocrino, sulla riproduzione, cancerogenità, disfunzioni renali, ipertensione e neurotossicità (Gidlow, 2015).

Sono state valutate misure relative alla pubertà in ragazze statunitensi (8-16 anni) in relazione ai livelli di piombo nel sangue allo scopo di dimostrare l'interferenza del piombo nell'ambiente sulla maturazione sessuale. Questo studio ha evidenziato una relazione tra concentrazione di piombo nel sangue (relativamente bassa) e biomarker di maturazione sessuale nelle ragazze statunitensi che vi hanno partecipato. Nonostante il calo delle concentrazioni di piombo nel sangue negli Stati Uniti, ci sono ancora preoccupazioni per la crescita e lo sviluppo delle ragazze, l'effetto potenzialmente tossico dell'esposizione al piombo sulla maturazione sessuale è biologicamente plausibile (Wu et al., 2003).

L'avvelenamento da piombo è stato anche ritenuto causa di anemia in numerosi casi, poiché questo inibisce la porfobilinogeno sintasi e la ferrochelatasi, prevenendo la formazione di porfobilinogeno e l'incorporazione di ferro nella protoporfirina IX, impedendo la sintesi dell'eme (Wani et al., 2015).

L'encefalopatia acuta può verificarsi in bambini a concentrazioni di piombo nel sangue di 80–100 µg/100 ml e negli adulti a concentrazioni di di 100-120 µg/100 ml.

È stata osservata una riduzione della velocità di conduzione del nervo periferico a livelli di piombo nel sangue pari a 70 µg/100 ml.

Sono state osservate variazioni di QI, prestazioni cognitive, ansia e umore in soggetti con concentrazioni di piombo nel sangue superiore 40 µg/100 ml.

Bambini e feti sono maggiormente a rischio riguardo agli effetti tossici del piombo. Non esiste un livello sicuro per l'esposizione al piombo nei bambini e alcuni studi hanno suggerito che per ogni aumento di 10 µg/100 ml di piombo nel sangue, vi è una perdita di 4-7 punti di QI (Gildow, 2015).

L'esposizione alimentare media durante la vita è stata stimata in 0.68 µg/kg di peso corporeo. al giorno nella popolazione europea in base alla presenza media di piombo legato al centro. Non esiste un livello di assunzione tollerabile raccomandato, poiché non ci sono valori soglia per la comparsa di effetti critici. Tuttavia, sono state gradualmente introdotte misure legislative per ridurre l'esposizione rimuovendo piombo da vernici, lattine di cibo, tubature dell'acqua e benzina (EFSA Journal, 2012).

L'SCF ha adottato in data 19 giugno 1992 un parere con cui è stata approvata un PTWI pari a 25 µg/kg di peso corporeo, così come proposto dall'OMS nel 1986. Secondo l'SFC, il tenore medio di piombo nei prodotti alimentari non sembra destare preoccupazione immediata (Regolamento (CE). N. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006).

1.4.5 Mercurio

Mercurio (Hg) deriva dalla parola latina “hydrargyrus” che significa "argento liquido" o "argento veloce". È un metallo che presenta proprietà uniche: è l'unico metallo liquido a temperatura ambiente e i legami tra gli atomi hanno una bassa energia, determinando bassi punti di fusione (38.91° C) e ebollizione (356.581° C) e una volatilità più elevata rispetto ad altri metalli (Wood et al., 2012).

Il mercurio è stato impiegato a lungo in vari settori, come catalizzatore per reazioni chimiche (Zhu et al., 2015), per la produzione di amalgame dentali (Guzzi et al. 2006) e come conservante in prodotti cosmetici e farmaceutici (Barregard et al., 2011).

La principale fonte di Hg nell'oceano proviene dalla deposizione atmosferica (Mason and Gill, 2005). Il mercurio è presente sia in forma disciolta che legata al particolato e comprende Hg⁰, Hg (II), MeHg (I) e dimetilmercurio (Me₂Hg), una forma non presente nelle acque dolci (Wood et al., 2012).

Nel 1956 fu scoperta quella che oggi viene definita “Malattia di Minamata”, ovvero un avvelenamento da metilmercurio avvenuto nella baia di Minamata (Giappone). Il metilmercurio proveniva da una fabbrica che produceva acetaldeide e composti vinilici. Quando nel 1951 si sostituì il biossido di manganese con solfuro di ferro come cocatalizzatore si ebbe un aumento della quantità di metilmercurio scaricato nella baia. Ci fu una diminuzione nello scarico solo nel 1960 quando venne apportato un miglioramento nel metodo di smaltimento dei rifiuti (Eto, 2000).

È stato osservato un aumento della tossicità del mercurio nelle comunità di pescatori intorno alla baia di Minamata a causa dell'ampio consumo di pesci e crostacei nella dieta locale. Mentre i corpi umani sono stati devastati dagli effetti dell'ingestione di mercurio, i felini sono stati colpiti dalla malattia del "gatto danzante" dovuta alla tossicità del mercurio sul sistema nervoso centrale (Magee, 2011).

Il metilmercurio è uno dei pochi metalli noti per biomagnificare attraverso le reti alimentari ed è questo processo che porta a concentrazioni elevate e talvolta tossiche nei pesci, specialmente quelli che sono piscivori (Wood et al., 2012).

In relazione alla tossicità acuta, i target del metilmercurio si trovano a livello del sistema nervoso. Sono state proposte teorie di apoptosi come meccanismo per la morte neuronale, in particolare delle cellule granulari nel cervelletto (Nakamura et al., 1993).

Inoltre, è stato osservato che nella morte di cellule trattate con metilmercurio sono implicate anche specie reattive dell'ossigeno (Ali et al., 1992).

Si ritiene che l'assunzione continua di piccole dosi di metilmercurio, ritenute prive di segni acuti di tossicità, possa causare la malattia cronica di Minamata. Inoltre, anche piccole dosi possono lasciare lievi danni al cervello, i quali possono accumularsi e provocare patologie evidenti dopo anni di esposizione (Eto, 2000).

È ormai risaputo che il selenio (Se) è un antagonista naturale del mercurio. Vari studi hanno dimostrato il legame di complessi di mercurio-selenio, da parte della selenoproteina plasmatica P, proteina capace di chelare i metalli pesanti, riducendone la tossicità (Falnoga and Žnidarič., 2007).

La principale fonte di esposizione umana al metilmercurio da alimenti sono pesci e prodotti ittici. In Europa la stima di assunzione media di metilmercurio per i consumatori europei è 1.6 µg/kg di peso corporeo e di 4 µg/kg di peso corporeo per il mercurio inorganico. Il gruppo CONTAM ha stabilito un TWI di mercurio inorganico di 4 µg/kg di peso corporeo, mentre per il metilmercurio 1.3 µg/kg di peso corporeo, entrambi espressi come mercurio. L'esposizione a metilmercurio è generalmente inferiore al TWI in Europa, ma si osservano anche livelli più elevati (EFSA Journal, 2012).

1.4.6 *Metalli tossici e insetti*

In Italia sono in vigore diverse direttive europee per garantire la sicurezza alimentare: la “Direttiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio” del 7 maggio 2002 relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali, il “Regolamento (UE) N. 420/2011 della Commissione del 29 aprile 2011” (modifica del regolamento (CE) n. 1881/2006) che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, e il regolamento N. 1006/2015 (UE) recante modifica del regolamento (CE) n. 1881/2006 per

quanto riguarda i tenori massimi di arsenico inorganico nei prodotti alimentari. Le Tabelle 2, 3 e 4 indicano i limiti di legge per i metalli in esame in mangimi per animali e alimenti destinati al consumo umano.

Tabella 2 – Limiti di legge per arsenico, piombo, cadmio e mercurio in mangimi derivanti o destinati a organismi acquatici secondo la Direttiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 7 maggio 2002.

Sostanze indesiderabili	Prodotti destinati all'alimentazione degli animali	Contenuto massimo in mg/kg (ppm) di mangime al tasso di umidità del 12 %
Arsenico (As)	Materie prime per mangimi ottenuti dalla trasformazione di pesci o di altri animali marini, farina di alghe marine e materie prime per mangimi	15
	Materie prime per mangimi dalle alghe marine	40
	Mangimi completi per pesci e mangimi completi per animali da pelliccia	6
Piombo (Pb)	Materie prime per mangimi	10
	Mangimi complementari	10
	Mangimi completi	5
Mercurio (Hg)	Materie prime per mangimi provenienti dalla trasformazione di pesci o di altri animali marini	0.1
	Mangimi completi	0.1
	Mangimi complementari	0.2
Cadmio (Cd)	Materie prime per mangimi di origine vegetale	1
	Materie prime per mangimi di origine animale	2
	Altri mangimi complementari	0.5
	Mangimi completi per bovini, ovini e caprini e mangimi per pesci	1

Tabella 3 – Limiti di legge per piombo, cadmio e mercurio in alimenti secondo il Regolamento (UE) N. 420/2011 della Commissione del 29 aprile 2011 (modifica del regolamento (CE) n. 1881/2006).

Sostanze indesiderabili	Prodotti alimentari	Tenori massimi (mg/kg di peso fresco)
Piombo (Pb)	Crostacei: muscolo delle appendici e dell'addome. Nel caso dei granchi e dei crostacei analoghi (<i>Brachyura</i> e <i>Anomura</i>) muscolo delle appendici.	0.50
	Muscolo di pesce	0.30
	Molluschi bivalvi	1.5
	Cefalopodi (senza visceri)	1.0
	Ortaggi, esclusi quelli del genere Brassica, ortaggi a foglia, erbe fresche, funghi e alghe marine. Nel caso delle patate il tenore massimo si applica alle patate sbucciate.	0.10
Mercurio (Hg)	Prodotti della pesca e muscolo di pesce. Il tenore massimo si applica ai crostacei, escluse le carni scure del granchio e quelle della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi (<i>Nephropidae</i> e <i>Palinuridae</i>).	0.50
	Muscolo dei seguenti pesci: rana pescatrice (<i>Lophius species</i>), pesce lupo (<i>Anarhichas lupus</i>), palamita (<i>Sarda sarda</i>), anguilla (<i>Anguilla species</i>), pesce specchio (<i>Hoplostethus species</i>), pesce topo (<i>Coryphaenoides rupestris</i>), ippoglosso (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>), marlin (<i>Makaira species</i>), rombo del genere <i>Lepidorhombus</i> (<i>Lepidorhombus species</i>), triglia (<i>Mullus species</i>), luccio (<i>Esox lucius</i>), palamita bianca (<i>Orcynopsis unicolor</i>), cappellano (<i>Trisopterus minutus</i>), squalo portoghese (<i>Centroscymnus coelolepis</i>), razze (<i>Raja species</i>), scorfano del genere <i>Sebastes</i> (<i>Sebastes marinus</i> , <i>S. mentella</i> , <i>S. viviparus</i>), pesce vela del Pacifico (<i>Istiophorus platypterus</i>), pesce sciabola (<i>Lepidopus caudatus</i> , <i>Aphanopus carbo</i>), pagello (<i>Pagellus species</i>), squali (tutte le specie), tirsite (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i> , <i>Ruvettus pretiosus</i> , <i>Gempylusserpens</i>), storione (<i>Acipenser species</i>), pesce spada (<i>Xiphias gladius</i>), tonno e tonnetto (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonuspelamis</i>)	1.0
Cadmio (Cd)	Crostacei: muscolo delle appendici e dell'addome. Nel caso dei granchi e dei crostacei analoghi (<i>Brachyura</i> e <i>Anomura</i>) muscolo delle appendici	0.50
	Muscolo di pesce	0.050
	Muscolo dei seguenti pesci: acciuga (<i>Engraulis species</i>), palamita (<i>Sarda sarda</i>), sarago fasciato comune (<i>Diplodus vulgaris</i>), anguilla (<i>Anguilla anguilla</i>), cefalo (<i>Mugil labrosus labrosus</i>), suro o sugarello (<i>Trachurus species</i>), luvaro o pesce imperatore (<i>Luvarus imperialis</i>), sardina (<i>Sardina pilchardus</i>), sardine del genere <i>Sardinops</i> (<i>Sardinops species</i>), tonno e tonnetto (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonuspelamis</i>), sogliola cuneata (<i>Dicologlossa cuneata</i>)	0.10
	Muscolo di pesce spada (<i>Xiphias gladius</i>)	0.30
	Alghe marine	0.050
	Integratori alimentari composti da alghe marine essiccate, da prodotti derivati da alghe marine o da molluschi bivalvi essiccati	3.0

Tabella 4 - Tenori massimi di arsenico inorganico nei prodotti alimentari. Secondo il Regolamento (UE) 2015/1006 della Commissione del 25 giugno 2015 recante modifica del regolamento (CE) n. 1881/2006.

Prodotti alimentari	Tenori massimi di As (mg/kg di peso fresco)
Riso lavorato non parboiled (riso brillato o bianco)	0.20
Riso parboiled e riso semigreggio	0.25
Cialde di riso, cialdine di riso, cracker di riso e dolci di riso	0.30
Riso destinato alla produzione di alimenti per i lattanti e i bambini	0.10

Diener e collaboratori hanno valutato il bioaccumulo ed effetti sul ciclo vitale in *Hermetia illucens* in risposta all'esposizione ad alcuni metalli pesanti. In tutte le fasi di sviluppo (larva, prepupa e adulto), è stato osservato un incremento della concentrazione dei metalli in relazione all'aumento della concentrazione di metallo negli alimenti forniti. Le prepupe presentavano un tasso di bioaccumulo più elevato per il cadmio rispetto a piombo e zinco. Non sono stati riscontrati effetti significativi nelle prepupae trattate con piombo e zinco. Questa esposizione ai metalli non ha condizionato la sex ratio degli adulti (maschi/femmine: 0.98). Larve e prepupe hanno accumulato cadmio, ma le concentrazioni riscontrate nel corpo erano inferiori a quelle del substrato di allevamento, indicando quindi il mancato bioaccumulo di piombo e zinco. (Diener et al., 2015)

È stato valutato il bioaccumulo di cadmio, piombo e arsenico nei ditteri *Hermetia illucens* e *Tenebrio molitor* (van der Fels-Klerx et al., 2016). Si è osservato che entrambi gli insetti bioaccumulano Cd, in particolar modo il tasso di bioaccumulo per *Hermetia illucens* è più elevato rispetto a *Tenebrio molitor*. Ad oggi sono ormai note le differenze nel bioaccumulo e nell'escrezione di questo elemento nei vari gruppi di insetti. È stato osservato che in due specie di Imenotteri e in tre specie di Lepidotteri è avvenuta escrezione di cadmio, pertanto il bioaccumulo di questo elemento non è avvenuto. Al contrario, una specie di Omotteri lo bioaccumula (Lindqvist, 1992). Un caso particolare è quello delle locuste migratorie (Ortotteri), le quali sono in grado di mantenere stabile la concentrazione di Cd corporeo per un breve periodo di tempo dopo il quale si osserva un bioaccumulo di Cd (Crawford et al., 1995). Nei coleotteri un aumento di Cd nella dieta determina un aumento

di Cd corporeo, con andamento simile a quello osservato per il *Tenebrio molitor* (Vijver et al., 2003, van der Fels-Klerx, 2016). Riguardo al piombo, è stato osservato che in *Hermetia illucens* la concentrazione nelle esuvie è maggiore di quella nelle larve e ciò indica un sequestro dell'elemento nell'esoscheletro. In *Tenebrio molitor* non è stato osservato bioaccumulo di Pb (Vijver et al., 2003, van der Fels-Klerx, 2016). Un altro esempio è quello di *Hexagenia* (efemerottero), in cui il piombo è stato trovato nella superficie corporea e non negli organi interni, indicando uno scarso assorbimento dell'elemento, oppure l'ortottero *Aiolopus thalassinus* che presenta una concentrazione di Pb nelle ali quattro volte superiore rispetto al resto del corpo (Hare et al., 1991; Schmidt et al., 1994).

Nelle due specie studiate da van der Fels-Klerx (2016) è stato visto che l'arsenico viene bioaccumulato in *Tenebrio molitor*, mentre *Hermetia illucens* presenta un tasso di escrezione dell'elemento maggiore. Anche in questo caso, la concentrazione di arsenico nell'organismo varia a seconda del gruppo tassonomico. In *Dendroctonus ponderosae* (coleottero) è stata trovata una concentrazione di As doppia rispetto al floema della pianta su cui vive (Morissey et al., 2007; Moriarty et al., 2009).

Studi condotti su insetti che vivono su piante iperaccumulatrici di nichel, tra i quali *Chrysolina pardalina* (coleottero) e *Stenoscepa* sp. (ortottero), hanno mostrato concentrazioni di nichel elevate nell'apparato digerente e nei tubuli di Malpighi. La presenza di Ni proprio in questi ultimi ha suggerito il possibile adattamento per il controllo della quantità di questo elemento nel corpo. Inoltre, questi studi hanno mostrato concentrazioni inferiori nei tessuti esterni all'apparato digerente. In *Chrysolina pardalina* i livelli di Ni più elevati sono stati riscontrati nell'esuvia, ipotizzando così che la "muta" di questi insetti possa essere un meccanismo di eliminazione del nichel (Przybylowicz et al., 2003; Boyd, 2009).

Altri studi sono stati condotti su *Bombus impatiens*, valutando l'effetto del nichel sul comportamento alimentare di questi insetti. È stato osservato che il tempo impiegato da un bombo per nutrirsi era influenzato dal Ni, infatti questi hanno impiegato più tempo (75%) per nutrirsi con nettare contenente Ni, rispetto a quelli che si sono nutriti in fiori con nettare privo di contaminanti. Con questi studi si è giunti alla conclusione che il Ni causa una riduzione della vista nei bombi e quindi la presenza di questo elemento potrebbe essere un fattore di rischio per la salute di altri insetti impollinatori (Meindl and Ashman, 2013).

Sebbene molti studi hanno studiato le concentrazioni di mercurio negli insetti in ecosistemi acquatici (Rolfhus et al., 2015), sono state poche le ricerche sull'accumulo di

mercurio in insetti terrestri (Zhou et al., 2016). Zheng e collaboratori hanno studiato più di dieci specie di insetti che sono stati raccolti da prati nella città di Huludao, nel nord della Cina (Zhang et al., 2010, 2012; Zheng et al., 2010) e hanno scoperto che le concentrazioni di mercurio in tutti questi superavano i 100 ng/g. Ciò è stato confermato anche da altri studi (Zhou et al., 2016). Sebbene i dati pubblicati siano scarsi per gli invertebrati terrestri, è stato dimostrato che il mercurio aumenta generalmente a livelli trofici successivi all'interno delle reti di alimenti per invertebrati (Rimmer et al., 2010).

Sono stati osservati valori di Hg più elevati nelle femmine di cicala rispetto ai maschi, a causa della massa corporea più elevata di questi ultimi (Zheng et al., 2010). Tuttavia, in altri studi sono state trovate concentrazioni simili di mercurio tra i sessi (Zhou et al., 2016).

Il metilmercurio viene facilmente assorbito nei tessuti animali e bioaccumulato in tutte le catene alimentari (Gaur et al., 2017). È stata valutata la distribuzione di MeHg nel corpo di termiti della Guiana Francese per stabilire se MeHg fosse presente esclusivamente nell'apparato digerente e, quindi, fosse transitorio, o conservato in modo diffuso e duraturo all'interno dei vari tessuti. Oltre all'elevata concentrazione di MeHg nelle termiti (221-683 ng/g), è stato visto che nell'apparato digerente delle termiti sono presenti batteri che riducono il solfato, che sono anche il gruppo più noto di metilatori di Hg. (Diouf et al., 2019).

2 SCOPO DELLA TESI

Il lavoro di tesi si inserisce nel progetto di ricerca NUTRIFISH, volto a studiare la possibilità di inserire *Hermetia illucens* (HI), cresciuta su substrati opportunamente arricchiti di acidi grassi polinsaturi (PUFA), in mangimi da usare per l'allevamento di pesci per l'alimentazione umana. Il progetto prevede lo studio della possibilità di utilizzare i mangimi suddetti per l'allevamento dello zebrafish, usato come modello sperimentale, e, successivamente, per l'allevamento dello storione, pesce normalmente allevato per l'alimentazione umana, e più in generale in mangimi destinati all'acquacoltura.

Questo lavoro di tesi si inserisce nel progetto NUTRIFISH, nell'ambito della valutazione del rischio chimico riguardante la presenza di metalli nocivi per la salute degli organismi e della salute umana. IN particolare, è stata valutata la presenza di metalli tossici nichel, arsenico, cadmio, mercurio e piombo lungo la filiera alimentare, partendo dai substrati di crescita arricchiti di acidi grassi polinsaturi per l'allevamento dell'*Hermetia illucens*, fino ad arrivare all'utilizzo di questi insetti per la formulazione di mangimi per l'allevamento dello zebrafish. Allo scopo sono stati pertanto analizzati: a) i substrati di crescita degli insetti, ottenuti dal prodotto di scarto della torrefazione del caffè, il silverskin, arricchito di acidi grassi polinsaturi con l'introduzione di diverse percentuali di inclusione di microalghe *Schizochytrium* sp. o *Isochrysis* sp.; b) le prepupe allevate sui substrati suddetti; c) le lettiere residue dell'allevamento di HI; d) i mangimi formulati per l'allevamento dello zebrafish, contenenti diverse percentuali di sostituzione della farina e olio di pesce con farina di insetto HI; e) larve (20 giorni) e giovanili (2 mesi) di zebrafish.

3 MATERIALI E METODI

La determinazione di nichel, arsenico, cadmio e piombo è stata effettuata tramite spettrometria di assorbimento atomico (AAS), mentre per il mercurio è stato impiegato il *direct mercury analyzer* (DMA).

3.1 Allevamento di *Hermetia illucens*

Riguardo all'allevamento degli insetti di *Hermetia illucens* (HI), i campioni analizzati comprendono i substrati di allevamento di *Hermetia illucens*, le microalghe utilizzate per la preparazione dei substrati di crescita (*Schizochytrium* sp. e *Isochrysis* sp.) insetti e lettiera. Gli insetti in questione sono stati allevati, presso la facoltà di Agraria dell'Università Politecnica delle Marche (UNIVPM). Per l'alimentazione degli insetti sono stati testati nove differenti substrati. Il substrato basale era costituito da sottoprodotti ottenuti dalla torrefazione del caffè (miscela di varietà Arabica e Robusta) (silverskin caffè, CS, fornito da Saccaria Caffè s.r.l., Marina di Montemarciano (AN), Italia). Il CS (umidità 440 g/ kg) è stato raccolto in sacchetti di plastica e congelato a -80° C e macinato in un robot da cucina (Ariete 1769, De Longhi Appliances s.r.l.), al fine di ottenere una granulometria di 2 mm prima della preparazione dei substrati. I substrati di alimentazione sono stati formulati come segue: nel substrato E è presente 100% caffè silverskin; nei substrati As, Bs, Cs e Ds, è stata aggiunta alga *Schizochytrium* sp. al substrato CS rispettivamente in percentuali 5%, 10%, 20% e 25%; nei substrati Ai, Bi, Ci e Di, a CS è stata aggiunta alga *Isochrysis* sp. rispettivamente in percentuali 5%, 10%, 20% e 25%. A tutti i substrati è stata poi aggiunta acqua, al fine di raggiungere un'umidità ottimale (secondo dati in letteratura) di circa 700 g/kg. Entrambi i campioni con ingredienti separati (CS e microalghe) e substrati di alimentazione sono stati conservati a -80° C.

Sono state acquistate larve di sei giorni (Smart Bugs s.s. Ponzano Veneto, TV, Italia) e sono state divise nei seguenti gruppi (cinque replicati ciascuno contenente 150 larve) (Tabella 5): HI E, prepupe allevate sul substrato E; HI As, HI Bs, HI Cs e HI Ds prepupe allevate su substrato CS arricchito rispettivamente con 5%, 10%, 20%, 25% di *Schizochytrium* sp.; HI Ai, HI Bi, HI Ci e HI Di, prepupe allevate su substrato CS arricchito rispettivamente con 5%, 10%, 20%, 25% di *Isochrysis* sp. Ogni gruppo conteneva 750 larve. Queste sono state allevate a una densità di 0.3 ind./cm² in una camera climatica a una temperatura di 27° C e

con un'umidità relativa di 650 g/kg in condizioni di oscurità continua (Spranghers et al., 2017; Barragan-Fonseca et al., 2018). Per ogni larva è stato fornito un tasso di alimentazione di 100 mg/giorno all'interno di scatole di plastica (Diener et al., 2009; Spranghers et al., 2017). Queste erano coperte con garza di cotone a maglia fine e chiuse con un coperchio dotato di un unico foro di ventilazione. I substrati venivano sostituiti una volta a settimana e le larve trasferite in un'altra scatola contenente il nuovo mangime. Le larve venivano ispezionate visivamente ogni giorno e prelevati manualmente quando lo stadio di prepupa subiva una variazione di colore dal bianco al nero (May, 1961). Questi sono stati poi lavati, asciugati e conservati a -80° C. Sono stati condotti esperimenti nel rispetto delle leggi e delle linee guida istituzionali italiane.

Tabella 5 – Campioni appartenenti alla fase di allevamento degli insetti. I substrati sono costituiti da microalghe e fondi di caffè, gli insetti sono stati allevati sui substrati e le lettiere comprendono il materiale ottenuto dopo l'allevamento e la rimozione degli insetti.

Substrati	Insetti	Lettiere	CS (%)	<i>Schizochytrium</i> sp. (%)	<i>Isochrysis</i> sp. (%)	Moisture, g/kg (n=3)
As	HI As	L As	95	5	-	695±3
Bs	HI Bs	L Bs	90	10	-	693±1
Cs	HI Cs	L Cs	80	20	-	692±2
Ds	HI Ds	L Ds	75	25	-	693±4
<i>Schizochytrium</i>	-	-	0	100	-	-
E	HI E	L E	100	0	0	686±5
Ai	HI Ai	L Ai	95	-	5	688±3
Bi	HI Bi	L Bi	90	-	10	700±3
Ci	HI Ci	L Ci	80	-	20	683±2
Di	HI Di	L Di	75	-	25	694±6
<i>Isochrysis</i>	-	-	0	-	-	-

3.2 Allevamento di *Danio rerio*

Per l'allevamento degli zebrafish, sono stati analizzati i mangimi (feed), larve di venti giorni e giovanili di due mesi di zebrafish. I mangimi sono stati prodotti impiegando farina di *Hermetia illucens* e di pesce secondo quanto descritto di seguito.

L'allevamento degli insetti per la produzione del mangime per i pesci è stato effettuato in una camera climatica a una temperatura di 27° C e con un'umidità relativa del 65%, in

condizioni di continua oscurità (Spranghers et al., 2017). Sono state acquistate larve di sei giorni (Smart Bugs s.s. Ponzano Veneto (TV), IT) e divise in gruppi di 640 larve per replicato ($n = 65$) per un totale di 41.600 esemplari. Ogni replicato consisteva in una scatola di plastica schermata con una garza di cotone a maglia fine chiusa da un coperchio dotato di 90 fori con diametro di 0.05 cm (Spranghers et al., 2017). Le larve sono state allevate a una densità di 0.3 ind./cm² (Barragan-Fonseca et al., 2018). L'alimentazione, fornita una volta alla settimana (448 g per ogni scatola), consisteva in substrati costituiti dagli scarti della torrefazione del caffè (silverskin, forniti da Saccaria Caffè s.r.l.) ed il tasso di alimentazione è stato di 100 mg/giorno per larva (Diener et al., 2009). Questo sottoprodotto (umidità 44%) è stato macinato da un robot da cucina (Ariete 1769, De' Lonchi Appliances s.r.l., Italy), al fine di ottenere particelle di dimensioni di 0.4 mm. Le diete per gli insetti sono state formulate includendo un 10% di microalga *Schizochytrium* sp. (fornita da AlghItaly Società Agricola s.r.l.) al caffè. Questo substrato è stato scelto in quanto si è dimostrato il migliore dal punto di vista del rapporto qualità/prezzo (Truzzi et al., 2019). Al substrato di alimentazione è stata aggiunta acqua distillata al fine di ottenere un'umidità finale del 70% (Makkar et al., 2014). Gli insetti venivano ispezionati giornalmente e prelevati quando lo stadio di prepupa subiva una variazione di colore dal bianco al nero. Questi sono stati poi lavati, asciugati e conservati a -80° C.

Le prepupe sono state poi liofilizzate, macinate con centrifuga macinante Retsch ZM 1000 (Retsch GmbH, Haan, Germany) e usate per preparare le diete sperimentali. Una dieta controllo (CTRL), contenente farina di pesce (FM), glutine di grano, concentrati di proteine di piselli e olio di pesce (FO) come ingredienti principali, è stata preparata secondo una dieta standard disponibile in commercio per lo zebrafish (Zebrafeed, Sparos Ltd, Portogallo). Le diete sperimentali erano isonitrogeniche (50%) e isolipidiche (13%). Le diete a base di insetti sono state preparate includendo livelli graduali di farina di insetti (25%, 50%, 75%, 100%, indicati rispettivamente come HI 25, HI 50, HI 75 e HI 100, Tabella 6) nella formulazione di CTRL. Gli ingredienti vegetali convenzionali (concentrato di proteine di piselli e glutine di grano), usati per formulare le diete sperimentali, sono stati mantenuti approssimativamente a un rapporto costante (0.7: 1 w:w) in tutte le diete (Tabella 7). In sintesi, tutti gli ingredienti macinati (0.5 mm) e l'olio di pesce sono stati accuratamente miscelati (Kenwood kMix KMX53 stand Mixer; Kenwood, De Longhi s.p.a., Treviso, Italia) per 20 minuti ed è stata aggiunta acqua alla miscela per ottenere una consistenza adeguata

alla formazione di pellet. I pellet sono stati ottenuti usando un tritacarne da 1 mm ed essiccati a 40° C per 48-72 ore. Le diete ottenute sono state macinate e conservate in sacchetti sottovuoto a -20° C fino all'utilizzo. I campioni di mangime sono stati analizzati per umidità (AOAC #950.46), proteine grezze, CP (AOAC #976.05), ceneri (AOAC 920.153) ed estratto di etere (EE; AOAC #991.36) secondo AOAC 2006. La formula dietetica e la composizione sono mostrate nella Tabella 7.

Gli embrioni di zebrafish sono stati tenuti 48 ore in un sistema Tecniplast (Varese, Italia), soggetti alle seguenti condizioni: temperatura di 28° C, pH 7.0, concentrazioni di NO₂ e NH₃ < 0.01 mg/L e fotoperiodo 12L/12D (Randazzo et al., 2017). Dopo questo primo periodo, gli embrioni sono stati raccolti, contati allo stereomicroscopio (Leica Wild M3B, Leica Microsystems, Nussloch, Germania) e divisi casualmente in cinque gruppi sperimentali (in triplice copia) secondo le cinque diete di prova. Le larve sono state tenute in quindici vasche da 20 L per allestire i cinque trattamenti dietetici sperimentali, ciascuno composto da 1500 larve in totale (500 larve per vasca). L'acqua nei serbatoi larvali (stesse caratteristiche chimico-fisiche del serbatoio della generazione parentale) è stata sostituita 10 volte al giorno da un sistema di gocciolamento (Olivotto et al., 2004). I lati di ciascun serbatoio erano coperti da pannelli neri per ridurre il riflesso della luce. Tutti i serbatoi sono stati sifonati 30 minuti dopo l'alimentazione (2 volte al giorno) per rimuovere l'eventuale eccesso di cibo e le larve morte. Le larve richieste per l'esperimento sono state campionate a 20 giorni dopo la deposizione delle uova (dps), sacrificate con una dose letale di MS222 (1g/L) e correttamente conservate per ulteriori analisi.

A partire da 5 a 20 dps, le larve di zebrafish sono state alimentate come segue:

- Gruppo di controllo CTRL (L): larve nutrite con 0% farina di insetti (dieta HI 0);
- Gruppo L 25: larve nutrite con mangime contenente 25% di farina di *Hermetia illucens* (dieta HI 25);
- Gruppo L 50: larve nutrite con mangime contenente 50% di farina di *Hermetia illucens* (dieta HI 50);
- Gruppo L 75: larve nutrite con mangime contenente 75% di farina di *Hermetia illucens* (dieta HI 75);
- Gruppo L 100: larve nutrite con mangime contenente 100% di farina di *Hermetia illucens* (dieta HI 100);

Le larve di zebrafish sono state alimentate con diete sperimentali 2 volte al giorno e, inoltre, da 5 a 10 dps, tutti i gruppi sono stati alimentati (una sola volta al mattino) con rotiferi *Brachionus plicatilis* (5 ind./mL) (Lawrence et al., 2012; Piccinetti et al., 2014).

Sono stati sacrificati e studiati, inoltre, giovanili di zebrafish a due mesi dps, i quali hanno proseguito l'alimentazione avvenuta per gli individui in fase larvale. In questo caso gli individui alimentati con le diete CTRL, HI 25, HI 50, HI 75 e HI, 100, sono rispettivamente CTRL (MM), MM 25, MM 50, MM 75, MM 100.

Tabella 6 – Campioni appartenenti alla fase di allevamento dei pesci (zebrafish): Feed (mangimi), larve e giovanili di 2 mesi di zebrafish. I numeri nel nome dei campioni indicano le percentuali di farina di *HI*.

Feed	Larve	2 Mesi	Farina di pesce (%)	<i>Hermetia illucens</i> (%)
CTRL	CTRL (L)	CTRL (MM)	100	0
HI 25	L 25	MM 25	75	25
HI 50	L 50	MM 50	50	50
HI 75	L 75	MM 75	25	75
HI 100	L 100	MM 100	0	100

Tabella 7 – Composizione in ingredienti (g/kg) delle 5 diete formulate per la conduzione della prova sperimentale di alimentazione da effettuare con il modello sperimentale *Danio rerio*.

Ingredienti	MS:HI	MS:HI	MS:HI	MS:HI	MS:HI
	100:0	75:25	50:50	25:75	0:100
Farine di pesce ¹	470	400	250	110	-
Farina di <i>Hermetia</i> BS10% (liofilizzata)	-	150	275	350	460
Mix ingredienti vegetali ²	220	230	298	385	440
Farina di grano	198	172	120	110	72
Olio di pesce	80	51	25	10	-
Lecitina di soia	8	8	8	11	4
Integratore Min & Vit ³	14	14	14	14	14
Legante	10	10	10	10	10

¹ materie prime fornite da Skretting Italia; ² Mix di verdure (concentrato di proteine di piselli: glutine di grano, 0,7:1 p/p) Lombarda trading s.r.l., Casalbuttano & Uniti (CR, Italia) e Sacchetto spa (Torino, Italia); ³Consorzio Agrario (Pordenone, Italia); ⁴Composizione di integratori di minerali e vitamine (% mix): CaHPO₄.2H₂O, 78,9; MgO, 2,725; KCl, 0,005; NaCl, 17,65; FeCO₃, 0,335; ZnSO₄.H₂O, 0,197; MnSO₄.H₂O, 0,094; CuSO₄.5H₂O, 0,027; Na₂SeO₃, 0,067; tiamina cloridrato (vitamina B1), 0,16; riboflavina (vitamina B2), 0,39; piridossina cloridrato (vitamina B6), 0,21; cianocobalamina (vitamina B12), 0,21; niacina (vitamina PP o B3), 2,12; pantotenato di calcio, 0,63; acido folico, 0,10; biotina (vitamina H), 1,05; mio-inositolo (vitamina B7), 3,15; rimanere C Roche (vitamina C), 4,51; tocoferolo (vitamina E), 3,15; menadione (vitamina K3), 0,24; retinolo (vitamina A 2500 UI kg - 1 dieta), 0,026; colecalciferolo (vitamina D3 2400 UI kg - 1 dieta), 0,05; cloruro di colina, 83,99; * Valori riportati come media delle analisi triplicate; ⁶n.d : non determinato.

3.3 Strumentazioni

3.3.1 Laboratorio

La decontaminazione dei materiali e la preparazione dei campioni sono state effettuate in *clean room*, ISO 14644-1 Classe 6, con aree ISO Classe 5 sotto flusso laminare (Tabella 8). La temperatura del laboratorio è impostata a 20 ± 1 °C durante l'inverno e a 23 ± 1 °C durante l'estate.

Sono stati indossati camici, calzari e guanti da *clean room* seguendo tutte le procedure previste per questo tipo di laboratorio durante tutte fasi più critiche del trattamento e della preparazione dei campioni.

Tabella 8 – Classi ISO relative alla *clean room*

Classe Area	0.1	0.2	0.3	0.5	1	5
5	100.000	23.700	10.200	3.520	832	29
6	1.000.000	237.000	102.000	35.200	8.320	292

Il funzionamento della *clean room* si basa sul principio di ricircolo forzato di aria superfiltrata in una stanza sigillata. Il sistema è costituito da ventilatori operanti a bassa velocità, i quali immettono nella stanza, attraverso il soffitto, un flusso laminare di aria precedentemente filtrata attraverso filtri ad alta efficienza (HEPA), posizionati all'esterno della stessa e aspirata attraverso griglie poste sul pavimento.

L'analisi dei campioni è stata effettuata in laboratorio con lo spettrofotometro di assorbimento atomico con fornello in grafite (GFAAS) e con l'analizzatore diretto di mercurio (DMA-1).

3.3.2 Reagenti e soluzioni standard

L'acqua che viene usata per la preparazione di soluzioni standard, per il lavaggio dei materiali e per gli usi generali del laboratorio, viene prodotta attraverso un sistema Millipore Midi con trattamento a due stadi, che produce rispettivamente acqua deionizzata nel primo stadio (sistema Elix). e acqua elettrodeionizzata Milli-Q nel secondo stadio (sistema Milli-Q).

Al fine di evitare la contaminazione dei campioni stessi, per il loro trattamento, per la pulizia dei contenitori e per tutte le altre procedure analitiche, sono stati usati reagenti di grado superpuro o ultrapuro, con un contenuto di metalli pesanti molto basso.

Riguardo gli acidi, sono stati impiegati: HCl ultrapuro (32–35%, UpA), HCl superpuro (34–37%, SpA), HNO₃ ultrapuro (70%, UpA), HNO₃ superpuro (68%, SpA) e HNO₃ grado reagente (65%) della “Carlo Erba” (Mi, Italia). Il perossido di idrogeno usato per la digestione dei campioni al microonde è superpuro (30%, Carlo Erba).

Gli acidi grado reagente sono stati utilizzati solo nei primi stadi del lavaggio dei materiali, gli acidi di grado superpuro nelle fasi finali del lavaggio degli stessi, mentre gli acidi di grado ultrapuro sono stati usati per la preparazione di soluzioni, bianchi e standard.

Le soluzioni standard dei metalli, impiegate per la quantificazione, vengono rinnovate ogni mese a partire da soluzioni (SIGMA-ALDRICH 39435) di Ni, As, Cd, Pb e Hg con concentrazione 1 g/L, mediante diluizione con acqua Milli-Q acidificata 2:1000.

3.3.3 Omogeneizzazione dei campioni

Il primo trattamento dei campioni ha riguardato la loro omogeneizzazione. Questa è stata effettuata mediante l'uso di omogeneizzatore a lame MZ 4140. Per evitare la degradazione dei tessuti, la frazione non impiegata dei campioni è stata riposta in un contenitore a -80° C.

3.3.4 Liofilizzazione dei campioni

Il processo di liofilizzazione, effettuato sul campione precedentemente pesato (peso umido, WW) tramite bilancia analitica (AT261 DeltaRange, Mettler Toledo, MPIM & Co.) (Fig. 12) e poi conservato a -80° C per 1 ora, permette la disidratazione del campione in particolari condizioni di temperatura (tra -20 e -30° C) e in condizioni di vuoto (0 atm), in circa 12 ore (liofilizzatore Edwards EF40 modulyo, Crawley Sussex, England). Il campione ottenuto, disidratato e a peso costante (± 0.2 mg), è conservabile a lungo termine, poiché le trasformazioni chimiche ed enzimatiche sono inibite. Il peso secco (DW) è stato determinato per differenza ed è stata calcolata la percentuale d'acqua contenuta. A fine processo, i campioni non immediatamente analizzati sono stati riposti a -80° C.



Fig. 12 – Bilancia analitica AT261.

3.3.5 Digestione dei campioni liofilizzati

La strumentazione usata per la digestione dei campioni consiste in un Microonde MARS 5 (CEM Corporation, North Carolina, USA) con frequenza standard di 2450 MHz (Fig. 13).

Il principio su cui si basa il microonde è l'impiego dell'energia delle microonde, prodotte da un apposito generatore (magnetron) al fine di accelerare il processo di digestione del campione. Le microonde sono radiazioni elettromagnetiche non ionizzanti che causano un aumento dell'energia vibrazionale di molecole con momento dipolare, senza modificarne la struttura, attivando transizioni rotazionali dei legami molecolari polarizzati o polarizzabili, la migrazione degli ioni e il moto degli elettroni in materiali metallici. Così le molecole d'acqua e le specie ioniche del solvente, energizzate, collidono con le altre molecole trasferendo energia alla matrice.

La digestione assistita da microonde è applicata per la maggior parte all'analisi ambientale degli inquinanti (Buldini et al., 2002)



Fig. 13 - Microonde MARS 5.

Il sistema a microonde impiegato è dotato di un carello circolare all'interno del quale è possibile inserire fino a 14 contenitori (*vessel*) in teflon PFA, trasparenti alle microonde, di cui uno è il contenitore pilota (*control vessel*), sul quale vengono monitorati i parametri pressione e temperatura durante l'intero processo di digestione, mediante un'apposita sonda in fibra ottica. (Fig. 14)

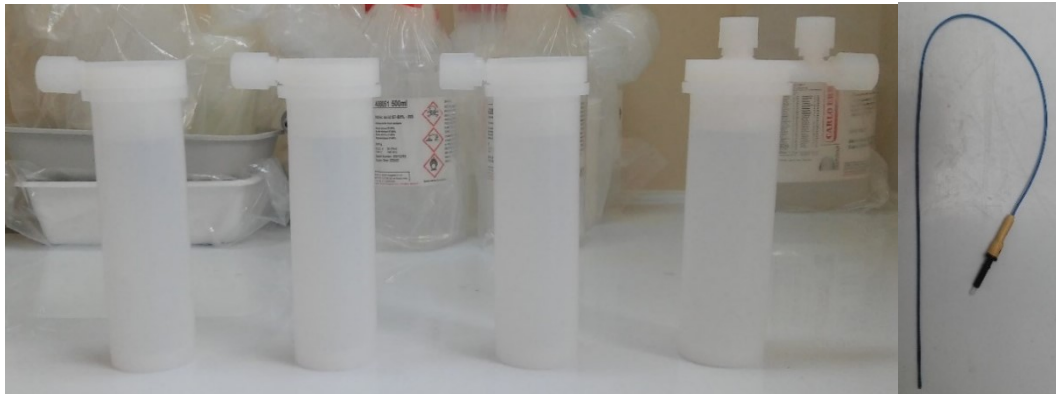


Fig. 14 – Contenitori in Teflon PFA (sinistra); sonda in fibra ottica (destra).

Per ciascuna operazione di digestione è necessario impostare un programma di lavoro, nel quale vengono definiti i seguenti parametri:

- Potenza in Watt e percentuale di utilizzo;
- Pressione;
- Temperatura;
- Tempo di raggiungimento dei parametri di pressione e temperatura impostati (rampa);
- Tempo di mantenimento dei parametri impostati (hold-time);
- Tempo di raffreddamento.

Nella Tabella 9 sono elencati i parametri che vengono impostati al microonde per la digestione dei campioni.

Tabella 9 – Parametri impostati del microonde per la digestione

Fase	Potenza (W)	Potenza (%)	Rampa (min)	Pressione (psi)	Temperatura (°C)	Hold time (min)
1	400*	100	10	50	150	5
2	400*	100	10	90	160	5
3	400*	100	10	150	175	5

(*) Quando si usano due o tre contenitori, il valore della potenza è impostata a 400 W, mentre per 4 o più contenitori a 800 W.

Circa 0.5 g di campioni liofilizzati vengono inseriti nei contenitori di teflon PFA con 3 mL di H₂O₂ e 3 mL di HNO₃ di grado superpuro e poi digeriti al microonde; successivamente la soluzione ottenuta viene portata a 10 mL con 4 mL di acqua Milli-Q e conservata a +4° C in una provetta da 10 mL (Mendil et al., 2013).

3.4 Metodologia analitica

3.4.1 Spettrofotometria di assorbimento atomico

La spettrofotometria di assorbimento atomico (*Atomic Absorption Spectrophotometric*), tecnica analitica introdotta nel 1955 da A. Walsh, è oggi una delle tecniche maggiormente impiegate per l'analisi qualitativa e, soprattutto, quantitativa degli elementi in tracce, in modo particolare dei metalli, in un vasto numero di matrici: da quelle ambientali (acque e terreni), fino agli alimenti e leghe metalliche (Cozzi et al., 2014).

Il principio di funzionamento si basa sull'assorbimento atomico: quando un atomo viene investito da radiazioni elettromagnetiche con una determinata frequenza (UV/Visibile), assorbe energia e salta ad un livello energetico superiore. Ciò accade quando l'elettrone esterno acquista energia pari a quella necessaria per il salto energetico:

$$\Delta E = (E_2 - E_1) = h\nu$$

Equazione 1 – h è la costante di Planck ($6.6262 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$) e ν è la frequenza.

Questo elettrone va quindi a occupare un orbitale di energia superiore (Fig. 15). Questo fenomeno ha una durata compresa dai 10^{-14} ai 10^{-7} s, dopo di che segue il fenomeno di rilassamento (*quenching*), in cui l'energia assorbita si disperde rapidamente negli urti con altre particelle e l'elettrone torna nell'orbitale di partenza.

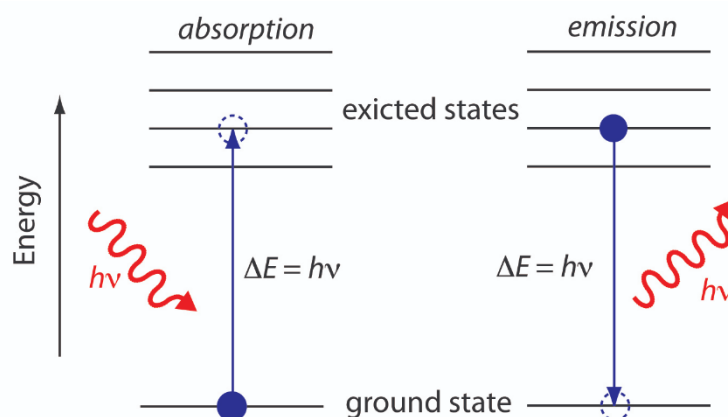


Fig. 15 – Fenomeno dell'assorbimento e dell'emissione atomica.

Ogni atomo dispone di un numero proprio di elettroni, i quali sono situati su determinati orbitali; è quindi possibile individuare gli spettri di assorbimento atomico caratteristici, costituiti da una serie di *righe di risonanza*, la cui intensità è proporzionale alla probabilità di transizione elettronica corrispondente.

Le righe osservate non sono monocromatiche, ma hanno un'ampiezza dell'ordine di 0.002 nm. Questa condizione è denominata "allargamento della riga spettrale" e deriva dalla somma di tre differenti fattori:

- *Allargamento di Lorentz*: gli atomi si urtano continuamente e le collisioni fanno variare, anche se di poco, i livelli energetici degli atomi stessi (di conseguenza l'assorbimento delle radiazioni avviene a frequenze non rigorosamente esatte, ma entro una ristrettissima gamma di queste). Dato che gli urti sono casuali, si avrà una banda (molto ristretta di frequenze) con andamento gaussiano.
- *Allargamento Doppler*: quando assorbono o emettono radiazioni, gli atomi sono in continuo movimento, sia rispetto alla sorgente, che al rivelatore. Di conseguenza la frequenza assorbita (o emessa) da ogni atomo è, sia pur lievemente, diversa da quella emessa dalla sorgente (o raccolta dal rivelatore) (Fig. 16).

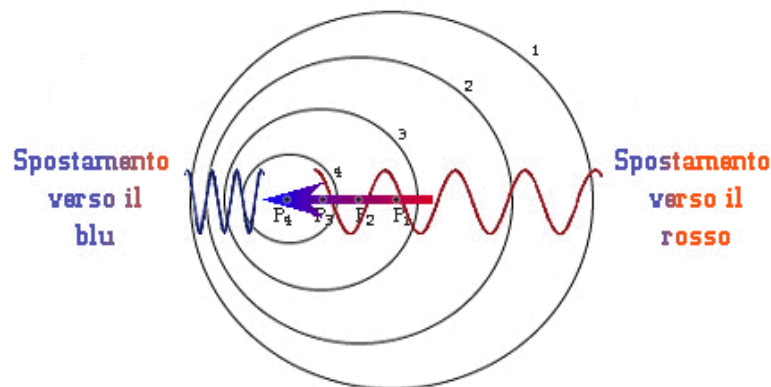


Fig. 16 – Effetto Doppler.

- *Allargamento naturale*: la radiazione elettromagnetica ha una doppia natura, particellare e ondulatoria. Secondo il principio di indeterminazione di Heisenberg, esiste una relazione precisa tra il tempo (ΔT) che un atomo trascorre in un determinato stato quantico e l'energia di questo stato. Tale energia non è ben definita, ma si colloca in un intervallo (ΔE) di possibili valori, secondo l'equazione 2:

$$\Delta E \times \Delta T \geq \frac{h}{4\pi}$$

Equazione 2

In altri termini, l'ampiezza dell'intervallo energetico tende a zero ($\Delta E \rightarrow 0$) quando la durata tende a infinito ($\Delta T \rightarrow \infty$), ma questa condizione vale solo per lo stato fondamentale.

Gli stati eccitati sono di breve ($\Delta T \rightarrow 0$) durata e quindi l'intervallo delle possibili energie si allarga ($\Delta E \rightarrow \infty$); di conseguenza, anche le righe spettrali si allargano in una banda di ampiezza $D\nu$. Tale contributo resta notevolmente inferiore rispetto agli allargamenti di collisione e di Doppler.

3.4.2 Assorbimento atomico e concentrazione

Per determinare la quantità di analita, il campione in cui è contenuto viene atomizzato tramite un sistema di riscaldamento (fiamma o fornello in grafite) e i suoi atomi eccitati con radiazioni di opportuna lunghezza d'onda. La radiazione assorbita (*flusso radiante*) viene poi misurata.

Alle normali temperature di esercizio, una minima parte degli atomi si trova già in uno stato termicamente eccitato e, di conseguenza, questi non partecipano al processo di assorbimento che si intende misurare. Questi atomi possono andare incontro a un processo di rilassamento per via radiante, emettendo radiazioni che si sommano a quelle in uscita dal campione, le quali possono ridurre l'entità di assorbimento. Tuttavia, applicando l'equazione di Boltzmann (equazione 4) si può notare come a temperatura ambiente, la percentuale di atomi eccitati sia trascurabile (con dislivello energetico tipico di 2.5 eV la popolazione del primo livello eccitato è pari a una percentuale di $3.7 \times 10^{-43} \%$).

$$\%_{\text{atomi eccitati}} = \left(\frac{n_{\text{eccitati}}}{n_{\text{stato fondamentale}}} \times 100 \right) = \left(e^{\frac{\Delta E}{KT}} \right) \times 100$$

Equazione 3 - Equazione di Boltzmann; K è la costante di Boltzmann ($8,617385 \cdot 10^{-5}$ eV/K) e T è la temperatura in gradi Kelvin.

L'assorbimento, che dipende dal numero di atomi nello stato fondamentale, è direttamente proporzionale all'intera popolazione di atomi presenti sul cammino ottico della radiazione e quindi alla concentrazione dell'elemento nel campione (se l'atomizzazione viene ottenuta con una fiamma) oppure alla quantità dell'elemento (se l'atomizzazione viene ottenuta con sistemi senza fiamma). In queste condizioni l'assorbimento atomico, sia pure in un intervallo di linearità abbastanza ristretto, segue una legge analoga alla legge di Lambert-Beer, descritta per l'assorbimento molecolare. Per un generico elemento eccitato da una radiazione monocromatica i cui atomi siano dispersi in fase gassosa si ha che:

$$A = x \times b \times n$$

- $A = \log \frac{I_0}{I}$ (con I_0 radiazione entrante e I radiazione uscente) è l'assorbanza;
- x è il coefficiente spettrale di assorbimento atomico, che caratterizza la riga di risonanza analitica*;
- b è lo spessore dello strato assorbente (ovvero il cammino ottico della radiazione);
- N è il numero totale di atomi liberi, proporzionale alla concentrazione del campione.

*Si definiscono righe di risonanza, quelle che partono da transizioni dal livello fondamentale. Il coefficiente spettrale di assorbimento atomico è il corrispettivo dell'assorbanza molecolare (ϵ) della legge di Lambert-Beer.

3.4.3 Strumentazione

L'insieme di tutte le parti ottiche e meccaniche necessarie a generare, guidare, disperdere, selezionare e rivelare l'energia radiante viene definito spettrofotometro.

Spettrometria di assorbimento atomico a fornetto di grafite

Per le analisi effettuate è stato usato il GFAAS (*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometric*) con sistema di atomizzazione interamente automatizzato (GTA 120 Graphite Tube Atomizer, Agilent Technologies) (Fig. 17).

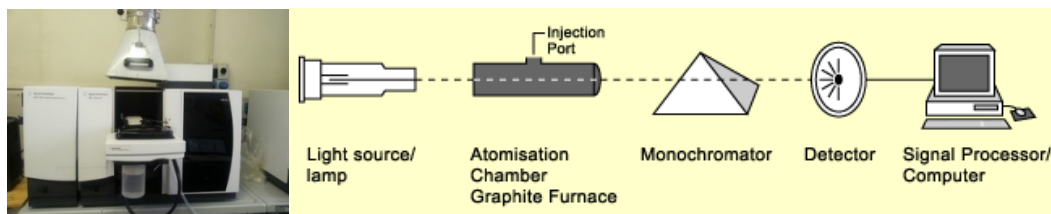


Fig. 17 – Spettrofotometro di assorbimento atomico con fornetto in grafite (sinistra); Diagramma delle componenti principali di GFAAS (destra).

Lo spettrofotometro GFAAS è costituito principalmente dai seguenti componenti:

1. Sorgente. La sorgente dello spettrofotometro GTA 120 è costituita da una lampada a catodo cavo (*Hollow Cathode Lamp*), in cui l'emissione della radiazione eccitante è prodotta da un catodo cilindrico cavo, costituito dall'elemento da analizzare o da una sua lega. Il bulbo della lampada, in vetro con una finestra di quarzo, è riempito da argon o neon. Quando viene applicata una differenza di potenziale (d.d.p.) opportuna agli elettrodi, il gas di riempimento si ionizza parzialmente (*ionization*). Gli ioni positivi,

accelerati dal campo elettrico, urtano il catodo e provocano l'espulsione degli atomi superficiali (*sputtering*). Si formano così atomi vaporizzati che, eccitati dagli urti con il gas di riempimento (*excitation*), emettono energia radiante (*emission*) (Fig. 18).

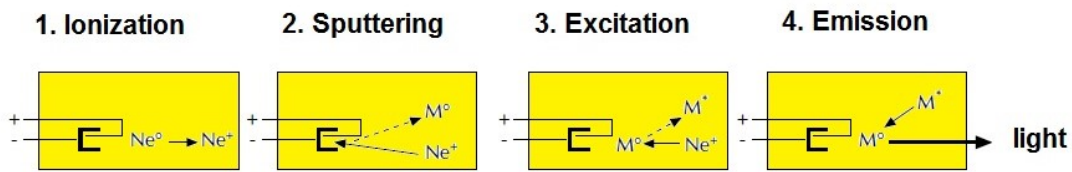


Fig. 18 – Principio di funzionamento di una lampada a catodo cavo.

2. Sistema di atomizzazione. Al fine di atomizzare la matrice entro cui è contenuto l'analita, il GFAAS è dotato di un sistema di atomizzazione a fornetto di grafite (o fornetto di massa) (Fig. 19). Tale sistema consente di abbassare notevolmente (fino a 1000 volte) i limiti di rivelabilità rispetto a quello con fiamma, permettendo di misurare concentrazioni di $0.01 \mu\text{g/L}$ e di lavorare su aliquote molto piccole di campione. Un autocampionatore introduce un volume noto di campione (da 20 a $40 \mu\text{L}$) all'interno del tubo di grafite, posto sul cammino ottico della radiazione emessa dalla sorgente. Al fine di espellere l'aria ed evitare condizioni ossidanti, viene fatto fluire un gas inerte (argon) all'interno del tubo. Successivamente all'introduzione del campione, il tubo di grafite (materiale a elevata conducibilità elettrica) viene riscaldato per mezzo di una resistenza elettrica, secondo un preciso programma a più stadi che varia in base all'elemento da analizzare, al fine di garantire la combustione della componente organica (che risulta essere un interferente) e un'efficiente atomizzazione nello stadio di massima temperatura. Generalmente, il programma impostato prevede tre fasi di durata differente, condotti a temperature crescenti: una prima fase di rimozione del solvente, seguita dall'incenerimento (pirolisi) del campione e, infine, l'atomizzazione vera e propria. La misura di assorbimento viene fatta sui vapori atomici che si liberano rapidamente nello stadio finale.

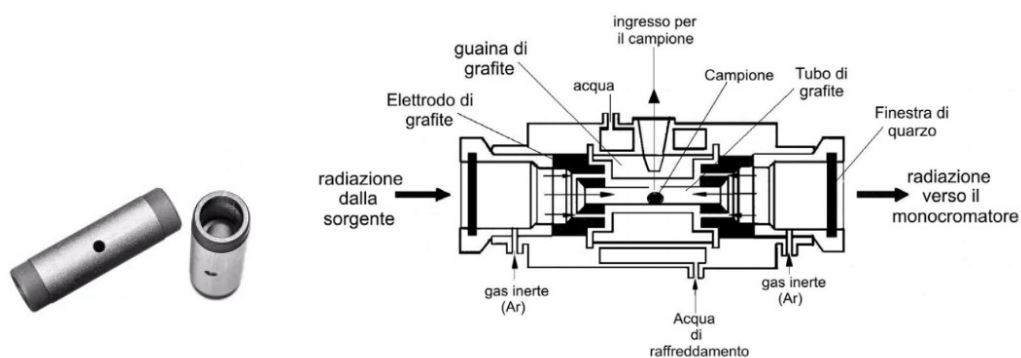


Fig. 19 –Fornetti in grafite (sinistra); Sezione longitudinale di un fornello in grafite (destra).

3. Sistema di controllo delle interferenze. Durante un'analisi mediante spettrofotometria di assorbimento atomico possono verificarsi numerose interferenze; queste vengono distinte in interferenze spettrali (da emissione, atomiche, molecolari, di scattering e di fondo non specifiche) e interferenze non spettrali (chimiche, fisiche e da ionizzazione). Le interferenze chimiche possono essere dovute alla formazione di composti refrattari all'atomizzazione e sono state eliminate con l'aggiunta di un modificatore chimico (Palladium matrix Modifier 7640: 10 g/L palladio in acido nitrico al 15%), un reagente che rende più volatile la matrice e meno l'analita, formato da 0.120 g di C₆H₈O₇, 200 μL di HNO₃ SpA, 200 μL di Pd e 600 μL di acqua Milli-Q. Le interferenze dovute all'assorbimento di fondo (dipendenti dall'assorbimento molecolare della matrice e dallo scattering) sono state eliminate mediante il sistema Zeeman, ovvero attivando e disattivando un campo magnetico che polarizza la riga di assorbimento in direzione perpendicolare alla riga emessa dalla lampada, facendo in modo che quest'ultima subisca solo l'assorbimento di fondo (non polarizzato).
4. Monocromatore e sistema ottico. Il monocromatore ha il compito di isolare la radiazione caratteristica dell'elemento di interesse. Nel monocromatore di Ebert (Fig. 20) la radiazione proveniente dalla lampada a catodo cavo, dopo aver attraversato il sistema di atomizzazione, entra nel monocromatore attraverso una fenditura di ingresso e raggiunge uno specchio concavo che la collima su un reticolo a dispersione ad alto potere dispersivo. La radiazione, dispersa dal reticolo, viene focalizzata tramite lo stesso specchio concavo sulla fenditura di uscita in direzione del rivelatore.

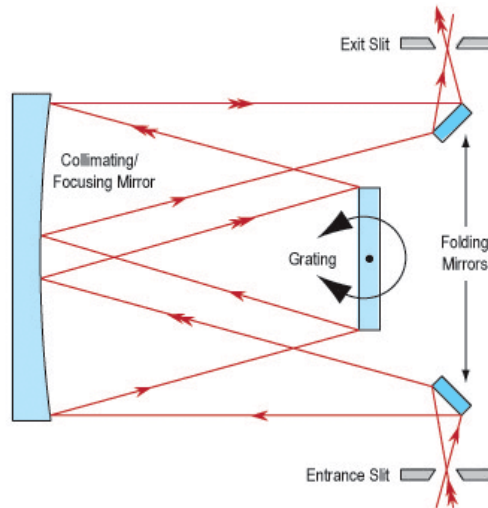


Fig. 20 – Monocromatore di Ebert

5. Rivelatore e sistema di lettura del segnale. L'intensità della radiazione trasmessa (ovvero, quella non assorbita dall'analita) deve essere convertita in un segnale elettrico ad essa proporzionale. Ciò avviene per mezzo di un *fotomoltiplicatore*, un particolare tipo di rivelatore utile nelle applicazioni a bassa intensità, costituito da due elettrodi opportuni all'interno di un'ampolla sottovuoto, con una finestra trasparente alle radiazioni (quarzo o vetro). La radiazione che giunge al primo catodo genera un'emissione di elettroni dalla sua superficie (effetto fotoelettrico). Gli elettroni emessi vengono accelerati da un campo elettrico e acquistano energia. Quando colpiscono la seconda superficie (dinodo) liberano un numero maggiore di elettroni rispetto a quello iniziale. Generando un effetto a cascata tramite la ripetizione di queste emissioni, il segnale iniziale subisce una notevole amplificazione (il fotone iniziale dopo 9 passaggi è amplificato di un fattore di circa 10^6) (Fig. 21).

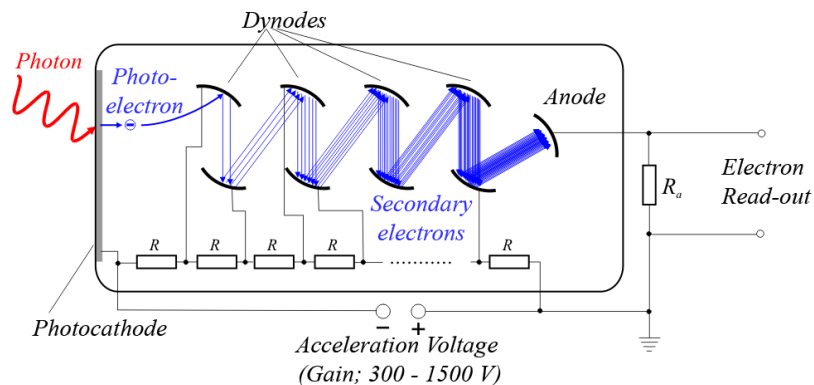


Fig. 21 – Principio di funzionamento di un fotomoltiplicatore.

6. Sistema di lettura del segnale e presentazione dati. Il segnale in uscita dal fotomoltiplicatore è, per sua natura, fluttuante e deve essere filtrato prima di essere trasmesso al microprocessore. Al termine della compensazione delle fluttuazioni, si ottiene un picco la cui area (o altezza) è direttamente proporzionale alla massa dell'analita presente allo stato atomico nel tubo di grafite (Fig. 22). In particolare, l'area rappresenta l'intera popolazione di atomi, mentre l'altezza dipende dalla concentrazione massima di atomi presenti nel fornetto durante lo stadio di atomizzazione. A questo punto il microprocessore comunica al sistema di elaborazione del segnale la trasmittanza; in base a questa, viene calcolata l'assorbanza del campione.

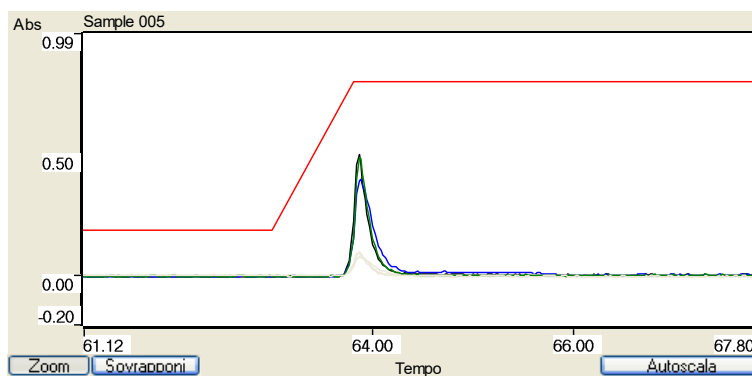


Fig. 22 – Segnale ottenuto mediante GFAAS.

Per le analisi dei metalli sono state usate lampade a catodo cavo multielemento. Il catodo per ciascuna lampada è ricoperto da più elementi compatibili in lega, rispettivamente: Fe/Co/Ni/Mn/Cu/Cr (Posizione: lampada 1) e Ag/Cd/Pb/Zn (Posizione: lampada 2) (Fig. 23).



Fig. 23 – Lampade multielemento a catodo cavo (Agilent Technologies); le singole lampade hanno operato con una fessura di 0.5 nm, ad una corrente e con lunghezza d’onda indicate nella Tabella 10 in funzione dell’elemento da analizzare.

Tabella 10 – Lunghezze d’onda per singoli elementi.

	Cd	Pb	As	Ni
Lunghezza d’onda (nm)	228.8	283.3	193.7	232.0
Corrente (mA)	5	10	10	4

La Tab. 11 mostra le fasi di atomizzazione per ciascun elemento con i corrispettivi parametri di temperatura, durata dello step e flusso.

Tabella 11 – Fasi di atomizzazione in funzione di cadmio, piombo, nichel e arsenico.

Elemento	Fase	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Flusso (L/min)
Cadmio (Cd)	1	85	5.0	3.0
	2	95	40.0	3.0
	3	120	10.0	3.0
	4	250	5.0	3.0
	5	250	1.0	3.0
	6	250	2.0	0.0
	7	1800	0.8	0.0
	8	1800	2.0	0.0
	9	1800	2.0	3.0
Piombo (Pb)	1	85	5.0	3.0
	2	95	40.0	3.0
	3	120	10.0	3.0
	4	400	5.0	3.0
	5	400	1.0	3.0
	6	400	2.0	0.0
	7	2100	0.9	0.0
	8	2100	2.0	0.0
	9	2100	2.0	3.0
Nichel (Ni)	1	85	5.0	3.0
	2	95	40.0	3.0
	3	120	10.0	3.0
	4	800	5.0	3.0
	5	800	1.0	3.0
	6	800	2.0	0.0
	7	2400	1.1	0.0
	8	2400	2.0	0.0
	9	2400	2.0	3.0
Arsenico (As)	1	85	5.0	3.0
	2	95	40.0	3.0
	3	120	10.0	3.0
	4	1400	5.0	3.0
	5	1400	1.0	3.0
	6	1400	2.0	0.0
	7	2600	0.6	0.0
	8	2600	2.0	0.0
	9	2600	2.0	3.0

Una volta misurata l'assorbanza, per quantificare il contenuto degli analiti è stato utilizzato il metodo della retta di taratura (*calibration curve*) e delle aggiunte standard (*standard addition*) (Fig. 24). Sono state eseguite 3 repliche nella fase di misura dell'assorbanza sia per le soluzioni standard che per i campioni. Ogni campione ha subito 3

repliche analitiche. Tutte le misure sono state eseguite direttamente nelle soluzioni digerite tal quali.

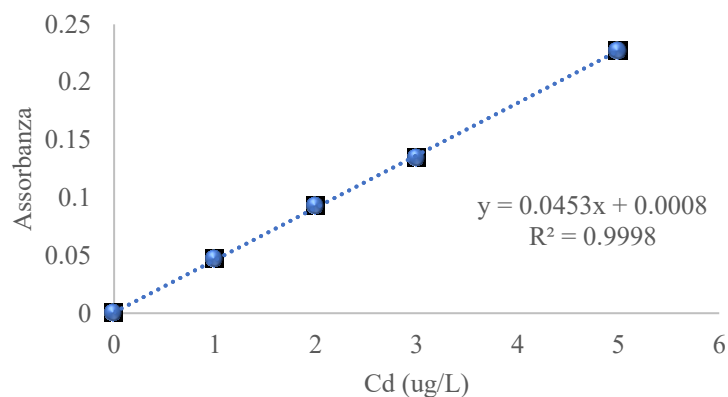


Fig. 24 – Esempio di retta di taratura per il cadmio (Cd).

DMA-1

La determinazione del mercurio nei campioni è stata effettuata tramite l'analizzatore Diretto di Mercurio, il DMA-1 (TRICELL, DMA-1, Milestone S.r.L.) (Fig. 25), impiegando sempre una metodologia basata sulla spettroscopia di assorbimento atomico.

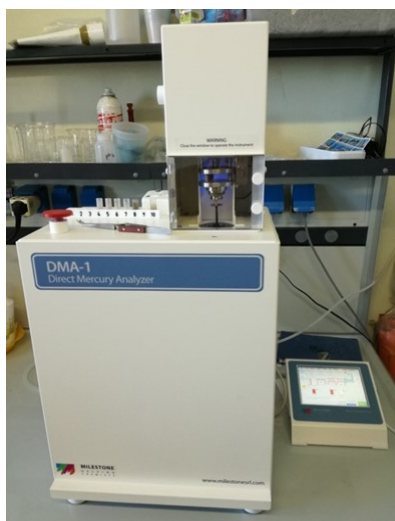


Fig. 25 – Analizzatore Diretto di Mercurio.

L'Analizzatore Diretto di Mercurio fornisce una rapida e diretta determinazione della concentrazione di Hg totale e della sua concentrazione in un campione solido o liquido senza la necessità di mineralizzare né pretrattare il campione per la riduzione a mercurio metallico.

Il DMA-1 consente di ottenere risultati attendibili e convalidati in accordo alla normativa (US-EPA method 7473). L'analisi procede attraverso la decomposizione termica (120-750 °C) del campione mediante un flusso di ossigeno che passa attraverso un tubo in quarzo mantenuto in una spirale di riscaldamento. I gas prodotti dalla combustione sono trasferiti dal flusso di ossigeno fino alla fornace (catalizzatore), dove vengono separati ulteriormente. I vapori di mercurio (Hg^0) che si liberano durante questo processo sono raccolti in un amalgama d'oro e il contenuto di mercurio viene quantificato attraverso il metodo della spettrofotometria ad assorbimento atomico.

Il tempo di analisi va da 6 a 10 minuti (i campioni più arricchiti richiedono un tempo di esposizione alla pirolisi maggiore).

L'uso di questa tecnica consente di abbassare il limite di rivelabilità per il mercurio fino a 0.003 ng in valore assoluto. Il software crea un grafico assorbanza/ng e restituisce una concentrazione in $\mu g/Kg$ o mg/Kg calcolata in base al peso o al volume del campione analizzato interpolando la retta di taratura (Fig.26) del metodo impostato.

La quantificazione delle misure viene effettuata mediante il metodo della retta di taratura, seguendo la legge di Lambert-Beer già descritta in precedenza.

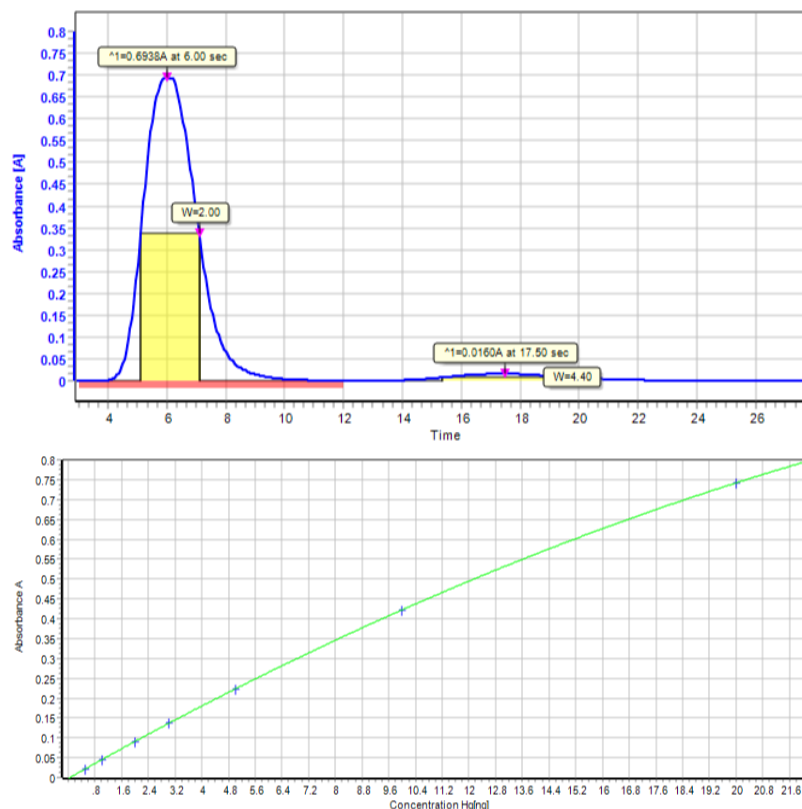


Fig 26 – Esempi di picco di assorbanza (in alto) e retta di taratura (in basso).

3.4.4 Bianco strumentale

Prima di effettuare l’analisi dei campioni è stato necessario analizzare il “bianco”, ossia una soluzione composta da una matrice simile al campione, contenente tutti i suoi componenti ad eccezione dell’analita di interesse. In questo modo è possibile ottenere il segnale relativo alla “concentrazione zero” di analita.

Per il GFAAS il bianco è costituito da una soluzione di 3 mL di HNO₃ superpuro e 3 mL di H₂O₂ superpuro digerita al microonde e successivamente portata a 10 mL con l’aggiunta di 4 mL di acqua Milli-Q. Questa determinazione è già inclusa nella procedura, che sottrae all’assorbanza del campione quella del rispettivo bianco.

Per la determinazione del mercurio il campione non viene digerito, quindi il bianco si limita alla sola pulizia dello strumento, eseguendo un’analisi con cuvetta vuota in cui viene poi inserito il campione.

3.5 Accuratezza della metodologia analitica

Per verificare l'accuratezza dei dati ottenuti dalle analisi strumentali effettuate con lo spettrofotometro (GFAAS) sono stati determinati nichel, arsenico, cadmio e piombo nel materiale certificato DORM-2 (Dogfish Muscle Certified Reference Material for Trace Metals, NCR, Canada), che consiste in un campione di muscolo di pesceccane.

Inoltre, per la determinazione del mercurio, al termine di ogni ciclo di analisi è stata usata una soluzione a concentrazione nota di mercurio, per valutare se lo strumento fosse ogni volta correttamente calibrato. È stata usata una soluzione standard 100 µg/l acidificata al 2.5% con HNO₃ grado reagente. La normale assorbanza registrata per questa soluzione standard e la concentrazione di Hg rilevata dipendono dal peso della soluzione al momento della preparazione.

I risultati delle misure sistematiche, eseguite sul materiale certificato durante l'intero periodo di tesi sono mostrati nella Tabella 12.

Tabella 12 – Media dei risultati ottenuti dall'analisi del DORM-2 eseguite con GFAAS.

DORM-2	Valore certificato (mg/kg)	Valore ottenuto (Δ%, mg/kg)
Nichel	19.4±3.1	17.2±1.62
Arsenico	18.0±1.1	17.0±4.11
Piombo	0.065±0.007	0.069±0.004
Cadmio	0.043±0.008	0.044±0.005
Mercurio	4.64±0.26	4.43±0.05

L'accuratezza può essere valutata osservando che le concentrazioni medie rilevate per i metalli nel materiale di riferimento certificato rientrano nell'intervallo di tolleranza del valore certificato. Per quanto riguarda la precisione delle misure, si osserva che questa, espressa come deviazione standard percentuale, è dell'ordine di 1–10%. Questi valori possono essere considerati buoni considerando gli ordini di grandezza delle concentrazioni dei metalli nei campioni analizzati.

3.6 Analisi statistica

Al fine di comparare i risultati ottenuti tra i diversi campioni e valutare le possibili correlazioni tra i livelli di concentrazione è stata effettuata un'analisi statistica multivariata (Multiple Range Test) utilizzando il software STATGRAPHICS Centurion 2018, (Manugistic Inc., Rockville, Maryland, USA).

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Allevamento di insetti: determinazione di metalli pesanti in substrati, insetti e lettiera.

Le Fig. 27, 28, 29, 30, e 31 mostrano rispettivamente il contenuto di cadmio, piombo, arsenico, nickel e mercurio nei substrati a base di *Schizochytrium* e *Isochrysis*, nelle prepupe di HI, nelle lettiera e nelle alghe.

La Tabella 13 mostra il Fattore di bioaccumulo (BAF), calcolato su peso secco, per le prepupe di *Hermetia illucens* allevate su 100% silverskin (HI E), e su silverskin arricchito con *Schizochytrium* sp. (5%, HI As, 10%, HI Bs, 20%, HI Cs, 25%, HI Ds) e *Isochrysis* sp. (5%, HI Ai, 10%, HI Bi, 20%, HI Ci, 25%, HI Di).

In riferimento alla normativa riguardante la presenza di metalli tossici nel mangime, è stato preso in considerazione il regolamento 2002/32/EU, che stabilisce i limiti di concentrazione di metalli tossici nei mangimi destinati all'allevamento. I limiti di legge si riferiscono al mangime con una percentuale di acqua del 12%. La Tabella 14 mostra le concentrazioni dei metalli analizzati nei substrati di crescita e negli insetti in mg/kg, riferite a un peso umido con una percentuale di acqua del 12%, come richiesto dalla normativa. Per il nichel non sono previsti limiti. Tali valori sono discussi di seguito nelle sezioni relative a ciascun metallo.

Tabella 13 – Fattore di bioaccumulo, calcolato su peso secco, per prepupe di *Hermetia illucens* allevate nei substrati inclusi con *Schizochytrium* sp. e *Isochrysis* sp.

Campioni	Cd	Pb	As	Ni	Hg
E	3.9±0.6	30±3	0.86±0.04	0.63±0.05	3.9±0.2
HI As	5.5±0.4	19±2	0.83±0.06	0.56±0.04	2.8±0.2
HI Bs	4.4±0.5	11±1	0.86±0.03	0.25±0.02	2.0±0.1
HI Cs	3.4±0.3	11±1	0.83±0.04	0.29±0.03	1.6±0.1
HI Ds	4.9±0.6	9±1	0.89±0.02	0.30±0.03	1.4±0.1
HI Ai	6.0±0.7	1.4±0.1	0.98±0.09	1.06±0.07	4.5±0.2
HI Bi	5.7±0.7	0.68±0.09	1.01±0.08	0.38±0.02	4.3±0.2
HI Ci	6.9±0.5	0.56±0.06	0.96±0.06	0.14±0.01	3.2±0.1
HI Di	7.4±0.9	2.0±0.1	0.99±0.02	0.25±0.01	3.7±0.1

Tabella 14 – Contenuto di metalli (mg/kg ww, umidità 12%) nei substrati e nelle prepupe Hi in riferimento alla normativa 2002/32/EU.

Campioni	Cd	Pb	As	Ni	Hg
Limiti di legge	0.5	5.0	2.0*	-	0.1
E	0.05±0.01	0.0028±0.0002	0.13±0.01	3.1±0.2	0.024±0.001
As	0.044±0.004	0.0034±0.0002	0.13±0.01	3.1±0.2	0.024±0.001
Bs	0.043±0.004	0.0027±0.0001	0.127±0.001	4.0±0.3	0.021±0.001
Cs	0.035±0.003	0.0022±0.0001	0.14±0.01	3.6±0.3	0.019±0.001
Ds	0.036±0.003	0.0022±0.0001	0.133±0.001	4.0±0.3	0.0179±0.0004
<i>Schizochytrium</i>	0.0023±0.0001	0.0057±0.0003	0.162±0.002	3.2±0.1	0.008±0.002
E	0.18±0.01	0.087±0.006	0.112±0.001	1.94±0.02	0.10±0.01
HI As	0.239±0.003	0.066±0.007	0.109±0.001	1.7±0.1	0.067±0.004
HI Bs	0.188±0.014	0.030±0.003	0.109±0.002	1.02±0.01	0.041±0.001
HI Cs	0.121±0.004	0.024±0.002	0.113±0.001	1.02±0.08	0.03±0.002
HI Ds	0.18±0.01	0.021±0.0004	0.119±0.002	1.2±0.1	0.025±0.002
Ai	0.107±0.011	0.048±0.003	0.119±0.008	1.4±0.1	0.022±0.001
Bi	0.10±0.01	0.08±0.01	0.112±0.004	1.96±0.06	0.0202±0.0002
Ci	0.096±0.004	0.12±0.01	0.120±0.005	2.05±0.04	0.020±0.001
Di	0.09±0.01	0.167±0.004	0.123±0.002	2.07±0.01	0.0188±0.0004
<i>Isochrysis</i>	0.001±0.001	0.007±0.002	0.135±0.001	1.04±0.03	0.0001±0.00003
HI Ai	0.65±0.03	0.068±0.001	0.116±0.008	1.5±0.1	0.098±0.001
HI Bi	0.6±0.1	0.05±0.01	0.114±0.008	0.74±0.04	0.088±0.003
HI Ci	0.67±0.04	0.065±0.004	0.115±0.006	0.29±0.01	0.063±0.001
HI Di	0.6±0.1	0.33±0.02	0.122±0.002	0.52±0.02	0.069±0.001

*Il valore per i mangimi completi per i pesci è 6.0 mg/kg.

4.1.1 Cadmio

La Fig. 27 mostra il contenuto di cadmio in substrati, insetti, lettiere, e alghe.

Substrati. Le alghe studiate mostrano un contenuto di Cd simile tra loro, e significativamente più basso rispetto al silverskin (un ordine di grandezza in meno). Di conseguenza, il cadmio presente nei substrati di allevamento deriva principalmente dallo scarto della torrefazione del caffè. Infatti, il contenuto di cadmio nei substrati si riduce significativamente all'aumentare della percentuale di inclusione di alga, da 0.05 a 0.04 mg/kg dw per i substrati arricchiti con *Schizochytrium* sp., e da 0.12 a 0.09 mg/kg dw per i substrati arricchiti con *Isochrysis* sp.

Prepupa Hi. Il contenuto di cadmio nelle prepupa allevate su substrati arricchiti con l'alga *Schizochytrium* sp. diminuisce passando dagli insetti allevati con la dieta As (~0.27 mg/kg dw, 5% di alga) a quelli allevati con la dieta Cs (~0.14 mg/kg dw, 20% di alga). Si è registrato un dato stranamente alto per gli insetti allevati con la dieta Ds (~0.20 mg/kg dw, 25% di alga), per il quale ci si sarebbe attesi un contenuto più basso.

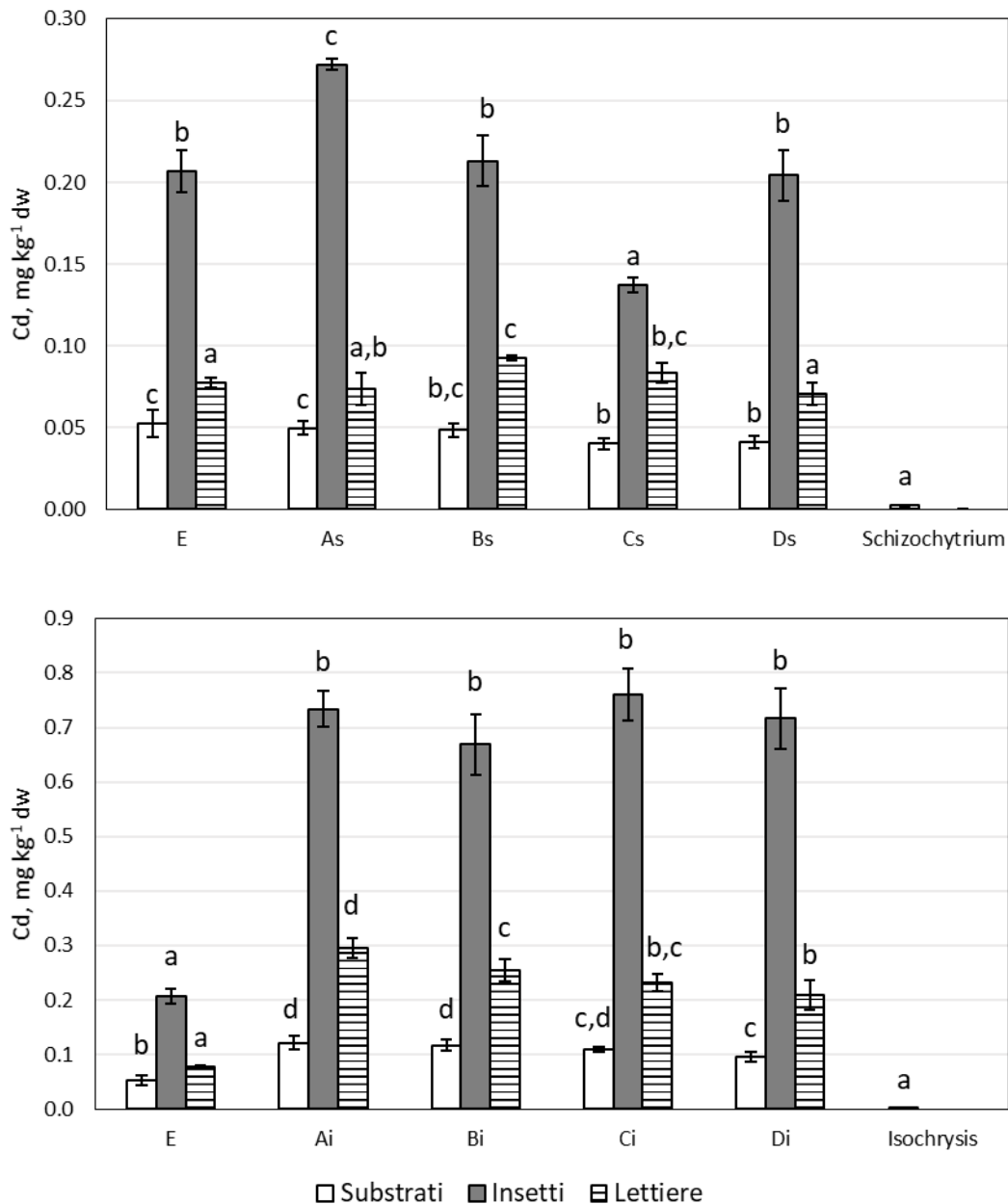


Fig. 27 – Contenuto di cadmio (mg/kg dw) in substrati, insetti, lettiera, e alghe. E, 100% silverskin; As, Bs, Cs, Ds: substrato silverskin arricchito con 5%, 10%, 20% e 25% di *Schizochytrium* sp.; Ai, Bi, Ci, Di: substrato silverskin arricchito con 5%, 10%, 20% e 25% di *Isochrysis* sp. I valori sono presentati come media \pm deviazione standard (n=3). Lettere diverse per la stessa matrice indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

Per quanto riguarda invece gli insetti allevati su substrati arricchiti con *Isochrysis* sp., il contenuto di cadmio non varia significativamente al variare della percentuale di inclusione di alga nel substrato, tuttavia le prepupe mostrano un contenuto di Cd significativamente più alto non solo rispetto alle prepupe allevate sul substrato di controllo E, ma anche rispetto agli insetti allevati su substrati arricchiti con *Schizochytrium* sp. Non c'è una correlazione statisticamente significativa del contenuto di Cd nelle prepupe con il contenuto nei substrati.

Il BAF del Cd supera 1 in tutti i campioni (Tabella 13), suggerendo la capacità delle prepupe HI di bioaccumulare questo metallo. I risultati ottenuti trovano riscontro nei dati in letteratura (van der Fels-Klerx et al., 2016), si può quindi concludere che il cadmio presente nei substrati penetra nel corpo delle prepupe e bioaccumula in esse.

Lettiere. Le lettiere analizzate sono state campionate alla fine della terza settimana di allevamento. Il contenuto di cadmio varia da ~0.07 a ~0.09 mg/kg dw per le lettiere derivanti da substrati arricchiti con *Schizochytrium* sp., significativamente più basso ($P < 0.005$) rispetto alle lettiere derivanti da substrati arricchiti con *Isochrysis* sp. (0.20-0.29 mg/kg dw).

In riferimento alla normativa 2002/32/EU, il limite di legge del Cd per il mangime completo è pari a 0.5 mg/kg ww (umidità 12%). Dalla Tabella 14 notiamo che il contenuto di Cd in tutti i substrati testati e nelle prepupe HI allevate su substrati arricchiti con *Schizochytrium* sp. è inferiore al limite di legge, mentre le prepupe allevate su substrati arricchiti con *Isochrysis* sp. mostrano una concentrazione di Cd superiore al limite di legge (0.6, 0.59, 0.67 e 0.63 mg/kg per HI Ai, HI Bi, HI Ci e HI Di, rispettivamente).

4.1.2 Piombo

La Fig. 28 mostra il contenuto di piombo in substrati, insetti, lettiere, e alghe.

Substrati. Le alghe studiate mostrano un contenuto di Pb simile tra loro (~0.0065 e ~0.0077 mg/kg dw for *Schizochytrium* sp. e *Isochrysis* sp. rispettivamente), e circa due volte maggiore rispetto al contenuto di Pb nel silverskin (~0.0032 mg/kg dw). Il contenuto di piombo nei substrati si riduce significativamente all'aumentare della percentuale di inclusione di alga *Schizochytrium* sp., da ~0.0039 mg/kg dw per As a ~0.0026 mg/kg dw per Ds. Al contrario, per i substrati arricchiti con *Isochrysis* sp. il contenuto aumenta all'aumentare dell'inclusione di alga nel substrato, passando da ~0.05 mg/kg dw per Ai a ~0.19 mg/kg dw per Di. I substrati arricchiti con *Isochrysis* sp. presentano un contenuto di

Pb significativamente maggiore (da 14 a 70 volte) rispetto ai substrati contenenti l'alga *Schizochytrium* sp. questo risultato è inaspettato, dal momento che le due alghe studiate non presentano differenze tra loro così consistenti nel contenuto di Pb. Si ipotizza quindi la possibilità di una contaminazione (in genere probabile per questo metallo) dei substrati contenenti *Isochrysis* sp.

Prepupe HI. Le prepupe allevate sul substrato di controllo (E) presentano la più alta concentrazione di Pb (~0.098 mg/kg dw) rispetto alle prepupe allevate su substrati arricchiti con *Schizochytrium* sp. mentre il contenuto nelle prepupe decresce significativamente all'aumentare della percentuale di inclusione di alga *Schizochytrium* sp. nel substrato. Anche per gli insetti allevati su substrati arricchiti con 5%, 10% e 20% di *Isochrysis* sp. si osserva un calo nel contenuto di Pb rispetto agli insetti allevati sul substrato di controllo E, mentre gli insetti allevati sul substrato arricchito con il 25% di *Isochrysis* sp. mostrano un contenuto di Pb significativamente maggiore rispetto agli insetti controllo HI E. le prepupe allevate su substrati arricchiti con *Isochrysis* sp. presentano un contenuto di Pb significativamente maggiore rispetto alle prepupe allevate su substrati contenenti l'alga *Schizochytrium* sp. Non c'è una correlazione statisticamente significativa del contenuto di Pb nelle prepupe con il contenuto nei substrati.

Il BAF del Pb supera largamente il valore di 1 in tutti gli insetti allevati su substrati arricchiti con alga *Schizochytrium* sp., ad indicare che il Pb bioaccumula nelle prepupe di HI. Tuttavia, il BAF è vicino o inferiore a 1 negli insetti allevati su substrati arricchiti con l'alga *Isochrysis* sp. (Tabella 13). Questo risultato potrebbe essere legato alla contaminazione dei substrati, come sottolineato precedentemente. *Hermetia illucens* tende ad accumulare Pb presente nel substrato di allevamento; ma all'aumentare dei livelli di Pb nei substrati (pari a quello registrato nei campioni inclusi con alga *Isochrysis* sp.) non si osserva un rispettivo aumento di Pb negli insetti, come del resto confermato dalla assenza di correlazione tra contenuto di Pb negli insetti e nei rispettivi substrati. Queste osservazioni suggeriscono che ci sia anche una capacità di regolazione dell'up-take del Pb da parte dell'insetto stesso. Nel substrato Di si osserva una concentrazione di piombo superiore agli altri substrati e in questo caso il BAF delle prepupe torna ad essere superiore a 1. Secondo dati presenti in letteratura, le concentrazioni di Pb sono più elevate nelle esuvie larvali rispetto alle larve stesse, indicando che il Pb viene sequestrato nell'esoscheletro di *Hermetia illucens* (van der Fels-Klerx et al., 2016).

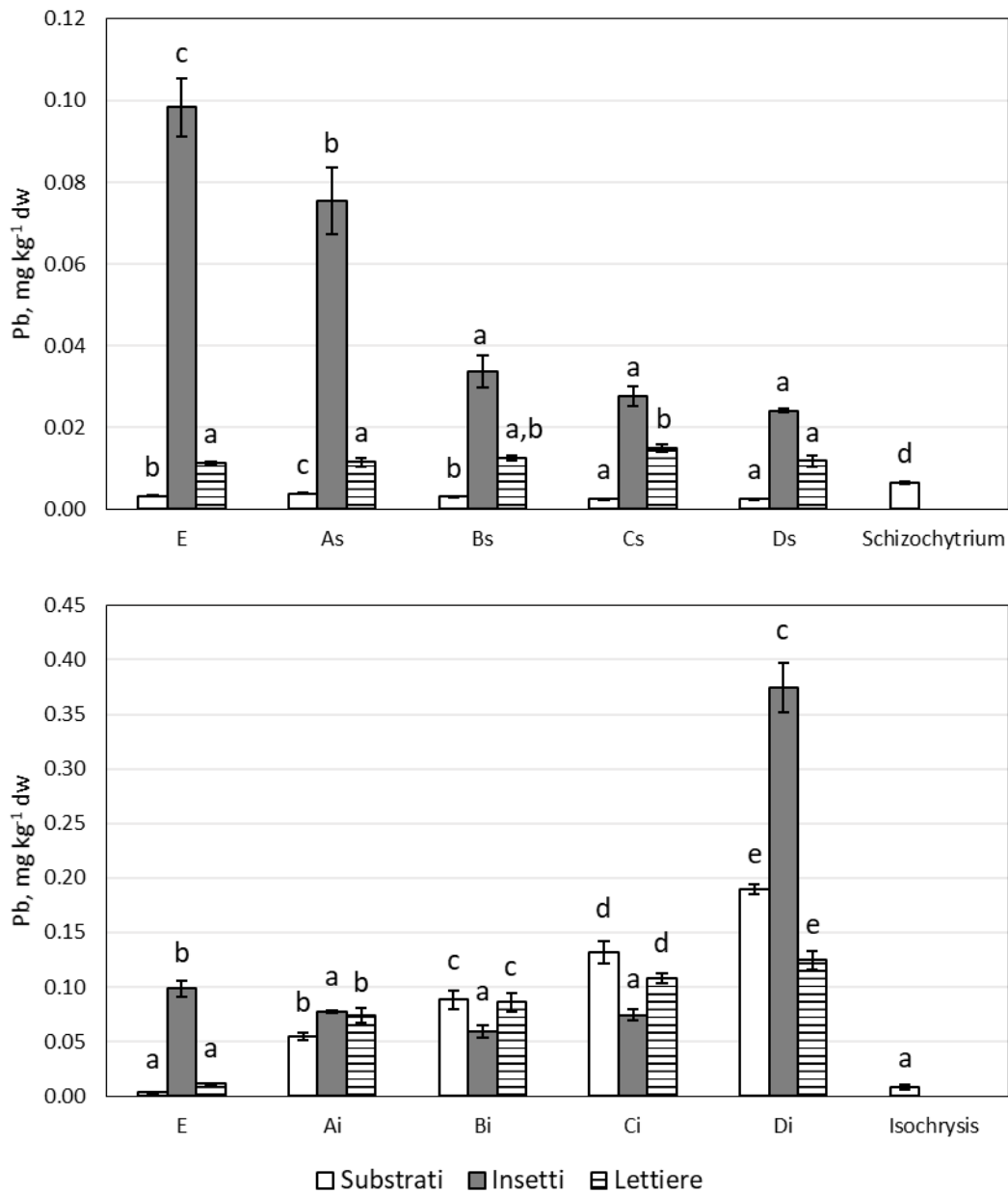


Fig. 28 – Contenuto di piombo (mg/kg dw) in substrati, insetti, lettiera, e alghe. E, 100% silverskin; As, Bs, Cs, Ds: substrato silverskin arricchito con 5%, 10%, 20% e 25% di *Schizochytrium* sp.; Ai, Bi, Ci, Di: substrato silverskin arricchito con 5%, 10%, 20% e 25% di *Isochrysis* sp. I valori sono presentati come media \pm deviazione standard (n=3). Lettere diverse per la stessa matrice indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

Lettiera. Il contenuto di Pb è di circa 0.01 mg/kg dw nelle lettiera residue dei substrati arricchiti con l'alga *Schizochytrium* sp., e non ci sono differenze statisticamente significative tra le lettiera. Nelle lettiera residue dei substrati arricchiti con *Isochrysis* sp., al contrario, il

contenuto di Pb aumenta all'aumentare della percentuale di inclusione di alga nel substrato, passando da ~0.011 mg/kg dw nella lettiera L E, a 0.12 mg/kg dw nella lettiera L Di. Le lettiere residue di substrati arricchiti con *Isochrysis* sp. presentano un contenuto di Pb significativamente maggiore rispetto alle lettiere residue di substrati contenenti l'alga *Schizochytrium* sp.

Il limite di legge per il Pb nei mangimi è 5 mg/kg per i mangimi completi (contenuto massimo relativo a un mangime con umidità del 12%, 2002/32/EC). Nei substrati arricchiti con alga *Schizochytrium* sp., la concentrazione massima di Pb è 0.003 mg/kg (substrato As); negli insetti è 0.09 mg/kg in HI E. Relativamente ai substrati arricchiti con alga *Isochrysis* sp., il valore di Pb più elevato si riscontra in Di (0.17 mg/kg), mentre il valore più elevato di Pb negli insetti si trova nelle prepupe HI Di (0.33 mg/kg). Le concentrazioni di Pb sono state calcolate per un'umidità del 12%. Sia i substrati che le prepupe HI presentano un contenuto di Pb al di sotto dei limiti di legge.

4.1.3 Arsenico

La Fig. 29 mostra il contenuto di arsenico in substrati, insetti, lettiere e alghe.

Substrati. Le alghe *Schizochytrium* sp. e *Isochrysis* sp. mostrano un contenuto di As molto simile (0.184 ± 0.002 e 0.153 ± 0.001 mg/kg dw, rispettivamente), e maggiore rispetto al substrato E (0.147 ± 0.006 mg/kg dw). Il substrato E ed i substrati arricchiti con *Schizochytrium* sp. non presentano differenze statisticamente significative tra di loro, mentre i substrati arricchiti con 5%, 10% e 20% di *Isochrysis* sp. mostrano un calo statisticamente significativo rispetto al substrato E. Il contenuto di As tra i vari substrati testati è comunque molto simile.

Prepupe HI. Il contenuto di As aumenta nelle prepupe all'aumentare della percentuale di inclusione di alga *Schizochytrium* sp. nel substrato di crescita, mentre non ci sono differenze statisticamente significative nelle prepupe allevate su substrati arricchiti con *Isochrysis* sp. Le prepupe allevate su substrati arricchiti con *Isochrysis* sp. presentano un contenuto di As molto simile alle prepupe allevate su substrati contenenti l'alga *Schizochytrium* sp. Non c'è una correlazione statisticamente significativa del contenuto di As nelle prepupe con il contenuto nei substrati.

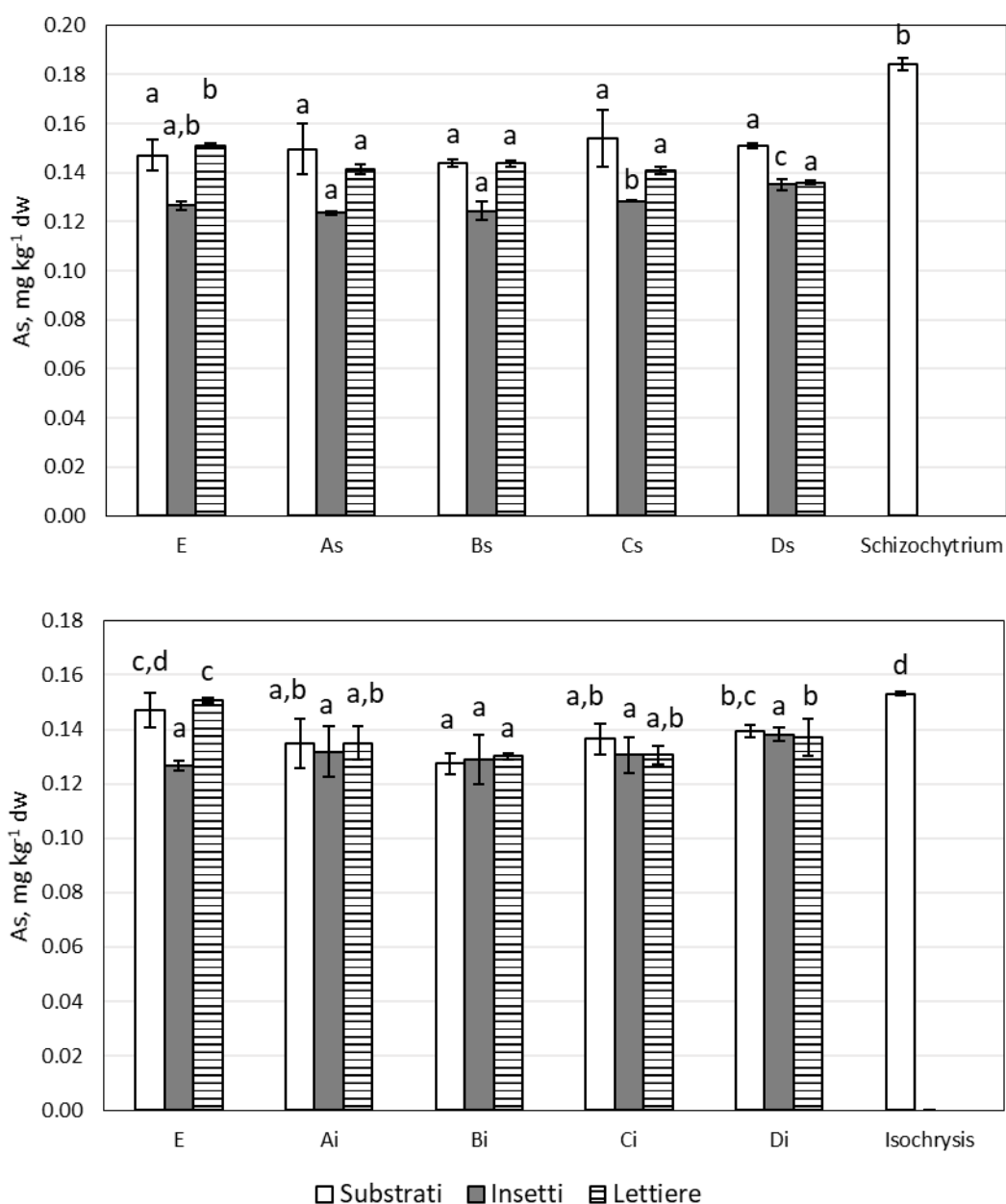


Fig. 29 – Contenuto di arsenico (mg/kg dw) in substrati, insetti, lettieri, e alghe. E, 100% silverskin; As, Bs, Cs, Ds: substrato silverskin arricchito con 5%, 10%, 20% e 25% di *Schizochytrium* sp.; Ai, Bi, Ci, Di: substrato silverskin arricchito con 5%, 10%, 20% e 25% di *Isochrysis* sp. I valori sono presentati come media \pm deviazione standard (n=3). Lettere diverse per la stessa matrice indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

Il BAF di As presenta valori ≤ 1 in tutti i campioni (Tabella 13). Ciò indica che As non si bioaccumula nelle prepupe, come confermato da dati presenti in letteratura (van der Fels-Klerx et al., 2016).

Lettiere. Il contenuto di As è di circa 0.15 mg/kg dw nella lettiera di controllo, significativamente maggiore rispetto alle lettiere residue dei substrati arricchiti con l'alga *Schizochytrium* sp., (circa 0.14 mg/kg dw) che non presentano differenze statisticamente significative tra loro. Il contenuto di As è significativamente maggiore nella lettiera controllo anche rispetto alle lettiere residue dei substrati arricchiti con l'alga *Isochrysis* sp.

Il limite di legge per As nei mangimi è 2 mg/kg per i mangimi completi, ad eccezione dei mangimi completi per i pesci, in cui il valore limite è 6 mg/kg (contenuto massimo relativo a un mangime con umidità del 12%, 2002/32/EC). Nei substrati testati il contenuto di As varia da 0.11 a 0.16 mg/kg ww (umidità 12%), valori molto al di sotto del limite di legge. Anche le prepupe presentano valori da 0.11 a 0.12 mg/kg ww (umidità 12%), molto al di sotto del limite di legge.

4.1.4 Nichel

La Fig. 30 mostra il contenuto di nichel in substrati, insetti, lettiere e alghe.

Substrati. L'alga *Schizochytrium* sp mostra un contenuto di Ni (3.6 ± 0.1 mg/kg dw), simile al contenuto di Ni del silverskin (3.5 ± 0.3 mg/kg dw), e circa tre volte maggiore rispetto all'alga *Isochrysis* sp. (1.17 ± 0.03 mg/kg dw). Nei substrati arricchiti con l'alga *Schizochytrium* sp. il contenuto di nichel varia da 3.5 a 4.6 mg/kg dw; nei substrati arricchiti con l'alga *Isochrysis* sp. la concentrazione varia da 1.6 a 2.3 mg/kg dw., quindi significativamente minore rispetto ai corrispondenti substrati arricchiti con l'alga *Schizochytrium* sp.

Prepupe HI. Il contenuto di nickel nelle prepupe diminuisce con l'aumentare della percentuale di inclusione di alga *Schizochytrium* sp. nella dieta, passando da ~2.2 mg/kg dw negli insetti allevati con la dieta E a ~1.3 mg/kg dw in quelli allevati con la dieta Ds. Lo stesso andamento si evidenzia per i substrati arricchiti con l'alga *Isochrysis* sp., dove si passa da un contenuto di Ni pari a ~1.7 mg/kg dw in HI Ai (substrati con 5% di alga), ad un contenuto di ~0.6 mg/kg dw in HI Di (substrati con 25% di alga). le prepupe allevate su substrati arricchiti con *Schizochytrium* sp mostrano un contenuto di Ni significativamente più alto rispetto alle prepupe allevate su substrati arricchiti con *Isochrysis* sp. Non c'è una correlazione statisticamente significativa del contenuto di Ni nelle prepupe con il contenuto nei substrati.

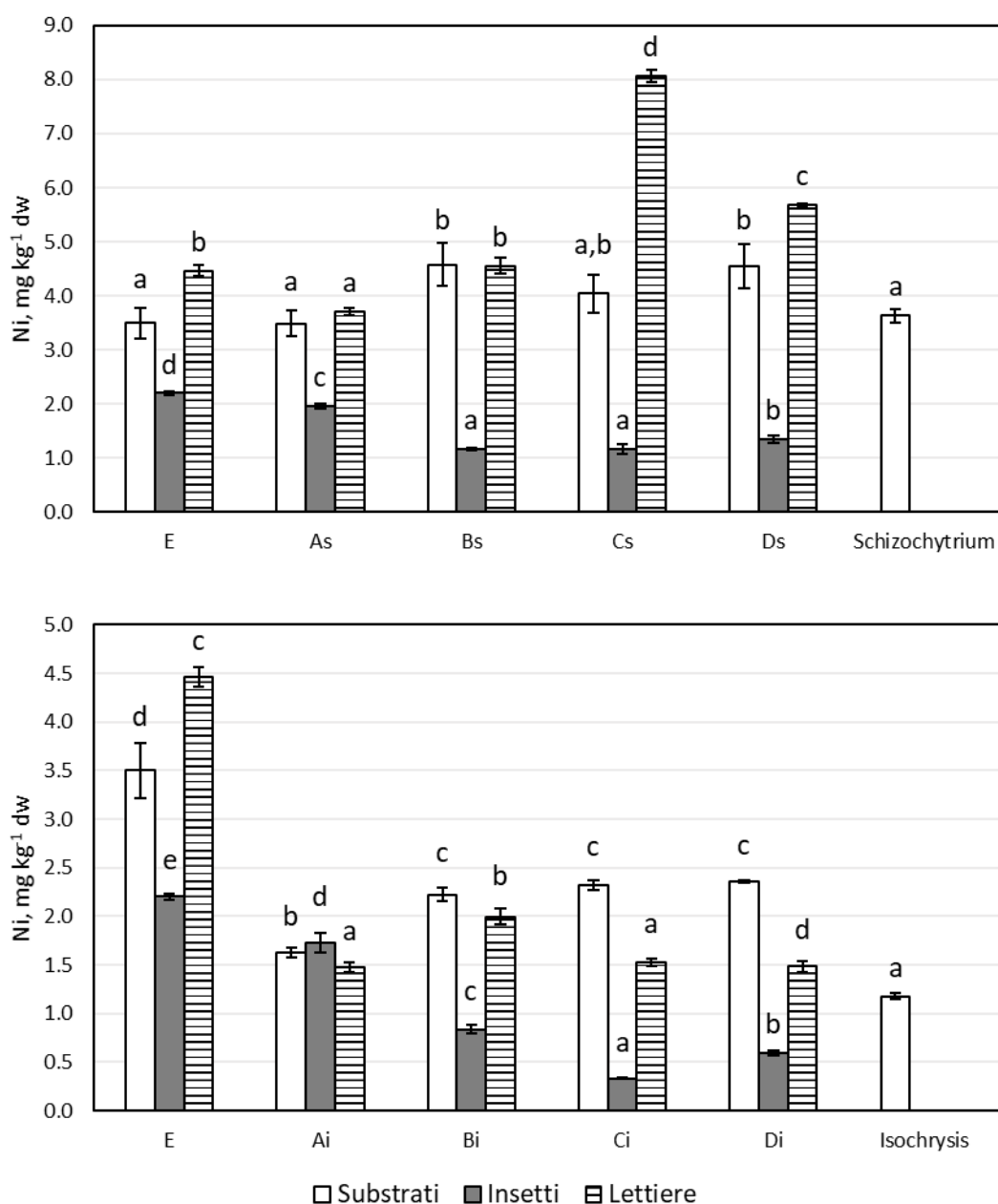


Fig. 30 – Contenuto di nichel (mg/kg dw) in substrati, insetti, lettiera, e alghe. E, 100% silverskin; As, Bs, Cs, Ds: substrato silverskin arricchito con 5%, 10%, 20% e 25% di *Schizochytrium* sp.; Ai, Bi, Ci, Di: substrato silverskin arricchito con 5%, 10%, 20% e 25% di *Isochrysis* sp. I valori sono presentati come media \pm deviazione standard (n=3). Lettere diverse per la stessa matrice indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

Il BAF del Ni è sempre ≤ 1 (Tabella 13). Questo risultato dimostra che il Ni non si bioaccumula nelle prepupe.

Lettiera. Il contenuto di Ni nella lettiera L E è pari a 4.4 mg/kg dw, rimane abbastanza simile nelle lettiera residue dei substrati arricchiti con 5% e 10% di *Schizochytrium* sp., mentre

aumenta significativamente nelle lettiere derivanti dai substrati arricchiti con 20% e 25% di *Schizochytrium* sp., fino ad arrivare ad una concentrazione di 8 mg/kg dw. Nelle lettiere derivanti dai substrati arricchiti con l'alga *Isochrysis* sp. invece il contenuto di Ni cala significativamente all'aumentare della percentuale di inclusione dell'alga nel substrato. Di conseguenza, le lettiere residue di substrati arricchiti con *Schizochytrium* sp. presentano un contenuto di Ni significativamente maggiore rispetto alle lettiere residue di substrati contenenti l'alga *Isochrysis* sp.

Il contenuto di Ni nelle lettiere è in genere maggiore rispetto al contenuto di Ni nelle corrispondenti prepupe, confermando che questo elemento non viene bioaccumulato da questa specie. Da questi risultati, consistenti con dati di letteratura (van der Fels-Klerx et al., 2016), possiamo affermare che il Ni presente nel substrato di allevamento penetra nel corpo degli insetti di HI per poi venire escreto senza essere ritenuto.

Non esistono limiti di legge per il nichel nei mangimi.

4.1.5 Mercurio

La Fig. 31 mostra il contenuto di mercurio in substrati, insetti e alghe. Per problemi tecnici dovuti a varie molecole interferenti con la tecnica analitica, non è stato possibile determinare il Hg nelle lettiere.

Substrati. Le alghe *Schizochytrium* sp. e *Isochrysis* sp. contengono basse quantità di mercurio (rispettivamente 9.2 e 0.6 µg/kg dw), pertanto il mercurio presente nelle diete deriva principalmente dallo scarto della torrefazione del caffè, che presenta una concentrazione di Hg pari a ~27 µg/kg dw. Il contenuto di mercurio decresce infatti all'aumentare della percentuale di inclusione di alga nel substrato, passando da ~27 µg/kg dw nella dieta As (5% alga), a ~20 µg/kg dw nella dieta Ds (25% alga), e da ~25 µg/kg dw nella dieta Ai (5% alga), a ~21 µg/kg dw nella dieta Di (25% alga).

Prepupe HI. Il contenuto di mercurio negli insetti allevati sul substrato E è pari a 104 mg/kg dw, e diminuisce all'aumentare della percentuale di inclusione di alga nella dieta, passando da ~75 µg/kg dw negli insetti allevati su substrati arricchiti con l'alga *Schizochytrium* sp. As (5% di alga) a ~29 µg/kg dw in quelli allevati con la dieta Ds (25% di alga). Lo stesso andamento si verifica per gli insetti allevati su substrati arricchiti con l'alga *Isochrysis* sp., dove il contenuto di Hg passa da ~112 µg/kg dw nelle prepupe (HI Ai, 5% di alga) a ~78 µg/kg dw in quelle allevate con la dieta Di (25% di alga).

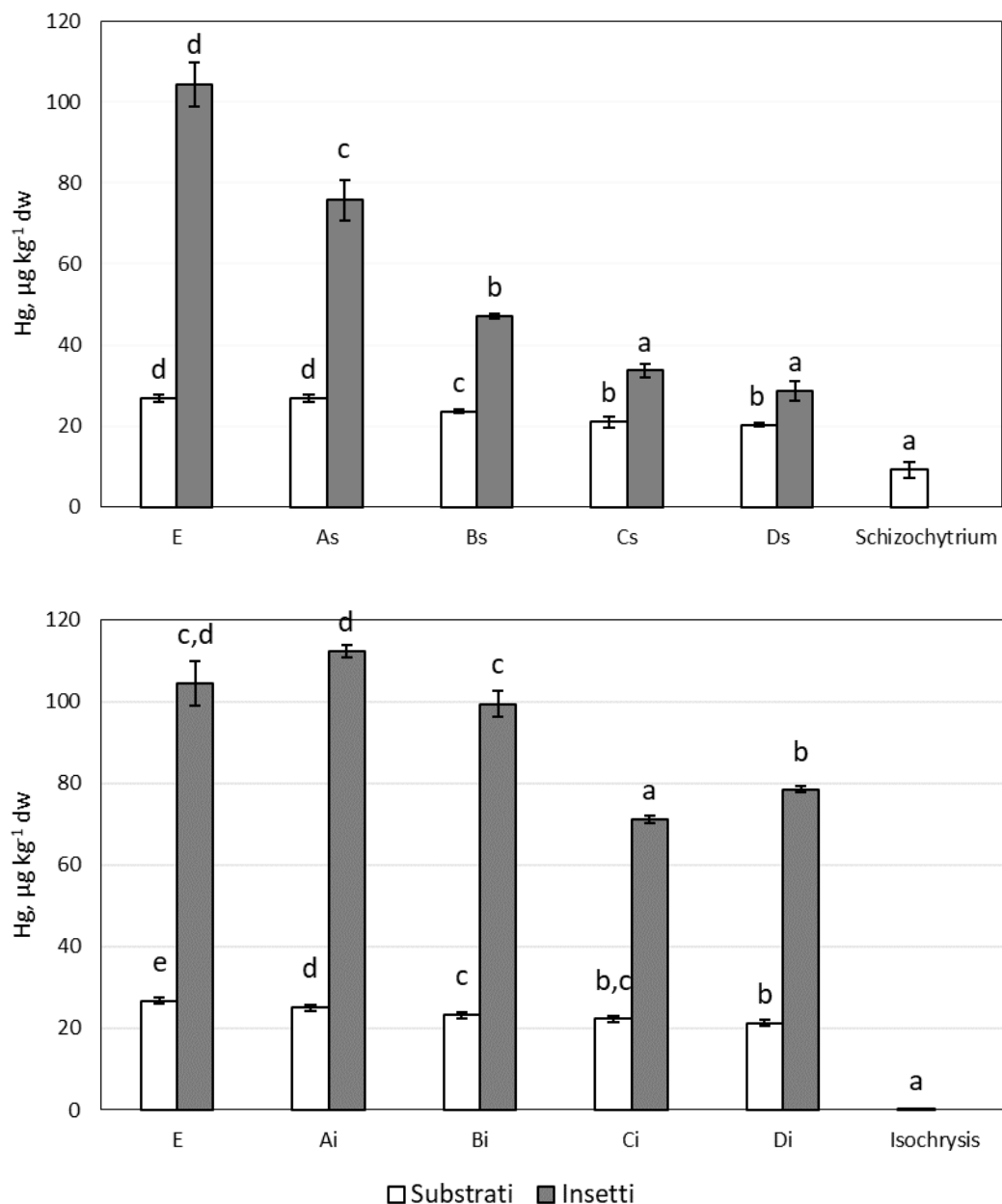


Fig. 31– Contenuto di mercurio (mg/kg dw) in substrati, insetti e alghe. E, 100% silverskin; As, Bs, Cs, Ds: substrato silverskin arricchito con 5%, 10%, 20% e 25% di *Schizochytrium* sp.; Ai, Bi, Ci, Di: substrato silverskin arricchito con 5%, 10%, 20% e 25% di *Isochrysis* sp. I valori sono presentati come media \pm deviazione standard (n=3). Lettere diverse per la stessa matrice indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

La concentrazione di mercurio nelle prepupe HI allevate su substrati arricchiti con l'alga *Schizochytrium* sp. presenta una correlazione lineare positiva statisticamente significativa con il contenuto di mercurio nelle rispettive diete ($r=0.9282$, $P=0.0229$), ed è pertanto fortemente influenzata da quest'ultimo. Anche le prepupe HI allevate sui substrati arricchiti

con l'alga *Isochrysis* sp., presentano una correlazione lineare positiva, anche se non statisticamente significativa, con il contenuto di mercurio nelle rispettive diete ($r=0.7966$, $P=0.1067$),

Il BAF del Hg è superiore a 1 in tutti i campioni (Tabella 13). È noto, come precedentemente descritto in letteratura, che il mercurio sia soggetto a bioaccumulo e biomagnificazione in numerosi organismi (Wood et al., 2012).

Il limite di legge per il mercurio nei mangimi è 0.1 mg/kg per i mangimi completi (contenuto massimo relativo a un mangime con umidità del 12%, 2002/32/EC). Nei substrati arricchiti con l'alga *Schizochytrium* sp. e con l'alga *Isochrysis* sp. la concentrazione massima di Hg è 0.02 mg/kg, mentre negli insetti è sempre inferiore a 0.1 mg/kg. Le concentrazioni di Hg sono state calcolate per un'umidità del 12%. I substrati testati e gli insetti allevati su silverskin arricchito con *Schizochytrium* sp. o *Isochrysis* sp. sono quindi al di sotto dei limiti di legge.

4.2 Determinazione di metalli pesanti in mangimi, larve e giovanili di zebrafish

Le Fig. 32, 33, 34, 35 e 36 mostrano rispettivamente il contenuto di cadmio, piombo, arsenico, nickel e mercurio nel mangime destinato all'allevamento del *Danio Rerio*, nelle larve e nei giovanili di zebrafish.

Come per gli insetti, è stato calcolato il fattore di bioaccumulo (BAF) su peso secco (dw) in larve e giovanili di 2 mesi di zebrafish secondo l'equazione 4 precedentemente descritta. La Tabella 15 mostra i BAF per i metalli nei campioni di pesci analizzati.

In riferimento alla normativa riguardante la presenza di metalli tossici nel mangime, è stato preso in considerazione il regolamento 2002/32/EU, che stabilisce i limiti di concentrazione di metalli tossici nei mangimi destinati all'allevamento. I limiti di legge si riferiscono al mangime con una percentuale di acqua del 12%. La Tabella 16 mostra le concentrazioni dei metalli analizzati nei mangimi in mg/kg, riferite a un peso umido con una percentuale di acqua del 12%, come richiesto dalla normativa. Per il nickel non sono previsti limiti. Tali valori sono discussi di seguito nelle sezioni di ciascun metallo.

Tabella 15 – Fattore di bioaccumulo, calcolato su peso secco, per larve e giovanili di zebrafish.

Campioni	Cd	Pb	As	Ni	Hg
CTRL	0.10±0.01	0.9±0.1	2.1±0.2	0.49±0.04	0.20±0.01
L 25	0.16±0.01	0.34±0.02	2.8±0.4	0.9±0.1	0.31±0.02
L 50	0.09±0.01	0.55±0.03	2.8±0.3	2.3±0.3	0.242±0.004
L 75	0.08±0.01	0.87±0.04	3.4±0.1	3.1±0.5	0.20±0.01
L 100	0.11±0.01	1.9±0.1	3.2±0.4	27±3	0.15±0.01
CTRL	0.7±0.1	0.32±0.02	2.8±0.3	2.2±0.1	2.2±0.2
MM 25	1.3±0.1	0.47±0.03	2.4±0.3	1.9±0.2	2.05±0.08
MM 50	0.7±0.1	0.84±0.05	1.8±0.2	5.2±0.8	1.8±0.2
MM 75	1.3±0.1	0.98±0.07	0.8±0.1	9.8±1.6	2.1±0.3
MM 100	1.5±0.1	3.4±0.1	0.9±0.2	39±3	2.1±0.2

Tabella 16 – Contenuto di metalli (mg/kg ww, umidità 12%) nei mangimi in riferimento alla normativa 2002/32/EU.

Campioni	Cd	Pb	As	Ni	Hg
Limiti di legge	0.5	5.0	2.0*	-	0.1
CTRL	0.38±0.02	0.63±0.04	0.21±0.01	1.72±0.04	0.033±0.001
HI 25	0.31±0.01	0.71±0.03	0.14±0.01	1.04±0.11	0.035±0.001
HI 50	0.45±0.02	0.42±0.02	0.12±0.01	0.20±0.02	0.037 ±0.001
HI 75	0.51±0.03	0.34±0.01	0.118±0.004	0.21±0.03	0.032±0.001
HI 100	0.46±0.03	0.31±0.01	0.111±0.003	0.11±0.01	0.034±0.002

*Il valore per i mangimi completi per i pesci è 6.0 mg/kg.

4.2.1 Cadmio

Il contenuto di cadmio nei mangimi (Fig. 33) varia da 0.35 a 0.58 mg/kg dw. La dieta controllo e la dieta HI 25 presentano un contenuto significativamente più basso rispetto alle diete con una percentuale di inclusione di insetti maggiore ($P < 0.05$). Il limite di legge del Cd nel mangime è di 0.5 mg/kg (contenuto massimo relativo ad un mangime con umidità del 12%, 2002/32/EC). Il cadmio contenuto nelle diete varia da 0.31 a 0.51 mg/kg (calcolato per un'umidità del 12%). Le diete presentano quindi un contenuto di Cd al di sotto o pari al limite di legge.

Le larve presentano un contenuto di Cd molto inferiore rispetto al corrispondente mangime. Le larve allevate con il mangime HI 100 mostrano un contenuto di Cd

significativamente maggiore rispetto alle larve allevate con gli altri mangimi. I giovanili presentano un contenuto di Cd significativamente maggiore rispetto alle larve, che aumenta all'aumentare della percentuale di inclusione di farina di HI nel mangime.

Il BAF di Cd per le larve è inferiore a 1 in tutti i campioni (Tabella 15), e per i giovanili è vicino a 1. Ciò indicherebbe assenza di bioaccumulo. Il cadmio tende a bioaccumularsi negli organismi acquatici attraverso l'esposizione alimentare o semplicemente viene captato dall'acqua (Liao et al.,2010). In numerosi studi, il bioaccumulo del Cd è associato all'aumento della concentrazione esterna dell'elemento. In esemplari giovanili di 78 dpf di *Paralichthys olivaceus* (platessa giapponese) è stato osservato un notevole aumento della concentrazione di Cd nel corpo in relazione all'aumento di Cd nell'ambiente esterno (Cao et al., 2010). Studi condotti in embrioni di zebrafish hanno mostrato bioaccumulo di questo elemento in seguito a esposizione a sedimenti addizionati con Cd (Redelstein et al., 2015). In uno studio sull'esposizione a lungo termine al cadmio, negli zebrafish, a diverse temperature si è osservato un incremento del bioaccumulo (e della tossicità) del cadmio all'aumentare della temperatura (Vergauwen et al., 2013).

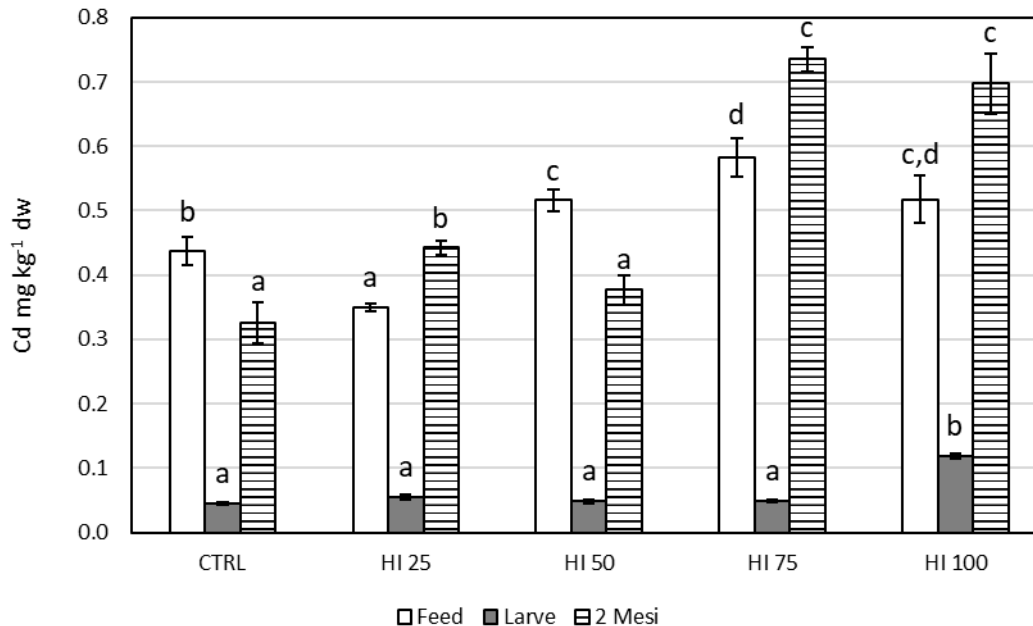


Fig. 32 - Contenuto di Cd (mg/kg dw) nel mangime (Feed), larve (20 giorni) e giovanili (2 mesi) di zebrafish. I valori sono presentati come media \pm deviazione standard (n=3). Lettere diverse per la stessa matrice indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

La maggior parte degli studi che indicano un bioaccumulo di Cd sono stati effettuati con esperimenti in cui il mangime (o l'ambiente acquatico) veniva addizionato con alte quantità di Cd. I livelli del metallo nei mangimi considerati in questo lavoro di tesi sono molto bassi, pertanto è plausibile che non ci sia una quantità di Cd sufficiente per il bioaccumulo.

4.2.2 Piombo

Il contenuto di piombo (Fig. 34) varia da ~0.35 a ~0.81 mg/kg dw nel mangime. La dieta controllo e la dieta HI 25 presentano un contenuto significativamente più alto rispetto alle diete con una percentuale di inclusione di insetti maggiore ($P < 0.05$). Il limite di legge del Pb nel mangime è di 5 mg/kg (contenuto massimo relativo ad un mangime con umidità del 12%, 2002/32/EC). Il piombo contenuto nelle diete varia da 0.31 a 0.71 mg/kg (calcolato per un'umidità del 12%). Le diete presentano quindi un contenuto di piombo al di sotto del limite di legge.

Le larve controllo e alimentate con il mangime HI 100 presentano il contenuto di Pb più alto (~0.66 mg/kg dw), significativamente maggiore rispetto alle larve alimentate con gli altri mangimi. In genere, all'aumentare della percentuale di inclusione della farina di insetto nel mangime, aumenta significativamente la concentrazione di Pb nelle larve. Lo stesso andamento si verifica per i giovanili di zebrafish.

Il BAF di Pb per le larve e giovanili di 2 mesi è inferiore a 1 in tutti i campioni (Tabella 15), anche se nei giovanili il valore è sempre maggiore rispetto alle corrispondenti larve. Unica eccezione il BAF degli individui alimentati con il mangime HI 100, che supera il valore di 1 e che starebbe ad indicare un avvenuto bioaccumulo. In realtà è ipotizzabile una contaminazione esterna del campione, come già descritto precedentemente. Studi condotti sul ciclode *Tilapia zilli* hanno mostrato che il piombo tende a bioaccumularsi nell'organismo, in particolare in branchie, fegato e muscoli, all'aumentare della concentrazione esterna di Pb (Ay et al., 1999). Si può quindi ipotizzare che la concentrazione di piombo nei mangimi non sia così alta da determinare bioaccumulo negli zebrafish.

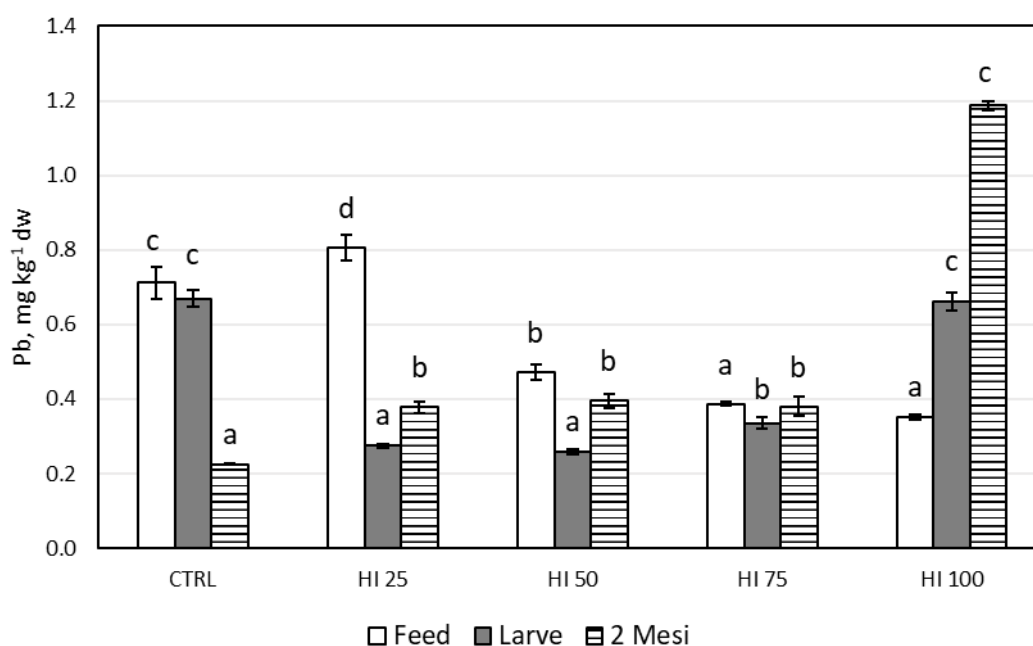


Fig. 33 - Contenuto di Pb (mg/kg dw) nel mangime (Feed), larve (20 giorni) e giovanili (2 mesi) di zebrafish. I valori sono presentati come media \pm deviazione standard (n=3). Lettere diverse per la stessa matrice indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

4.2.3 Arsenico

Il contenuto di arsenico nel mangime (Fig. 35) varia da 0.13 a 0.24 mg/kg dw e si riduce significativamente all'aumentare della percentuale di inclusione di insetti nella dieta (P<0.05). Il limite di legge del As nel mangime è di 2 mg/kg per i mangimi completi o 6 mg/kg per mangimi completi per pesci (contenuto massimo relativo ad un mangime con umidità del 12%, 2002/32/EC). L'arsenico contenuto nei mangimi varia da 0.11 a 0.14 mg/kg (calcolato per un'umidità del 12%). Le diete presentano quindi un contenuto di arsenico al di sotto del limite di legge.

Le larve alimentate con mangimi a diversa percentuale di inclusione di farina di insetto non mostrano differenze significative tra di loro riguardo al contenuto di As. Al contrario, i giovanili mostrano un contenuto di As che diminuisce significativamente all'aumentare della percentuale di inclusione di farina di insetto nel mangime.

Il BAF di As per le larve è superiore a 1 in tutti i campioni (Tabella 15), ad eccezione dei giovanili alimentati con i mangimi HI 75 e HI 100. Le larve presentano un BAF maggiore rispetto ai rispettivi giovanili. Ciò indicherebbe una tendenza da parte dello zebrafish ad accumulare questo metallo. In letteratura sono presenti dati discordanti sul bioaccumulo di

questo elemento nello zebrafish. Alcuni autori riportano che i pesci, insieme ad altri organismi acquatici, sono noti per accumulare quantità significative di arsenico (Hamdi et al., 2009), mentre in altri si osserva che le larve di *Danio rerio* non accumulano in modo significativo questo elemento (Oliver et al., 2011). Tuttavia, il risultato più interessante è la differenza dei BAF tra le larve e i giovanili, molto maggiore negli zebrafish a 20 giorni. L'arsenico infatti entra nell'organismo dello zebrafish attraverso determinate acquagliceroporine (proteine di membrana simili alle acquaporine dei mammiferi). Queste si sviluppano molto precocemente già nelle larve del pesce, tanto da determinare concentrazioni nelle larve pari a quelle nei muscoli degli adulti (Hamdi et al., 2009).

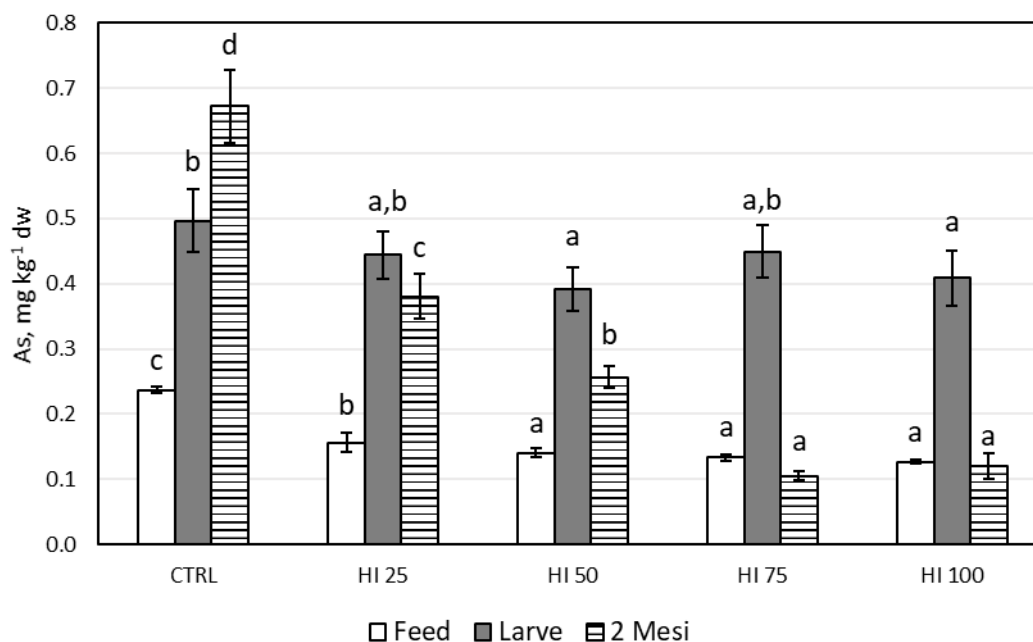


Fig. 34 - Contenuto di As (mg/kg dw) nel mangime (Feed), larve (20 giorni) e giovanili (2 mesi) di zebrafish. I valori sono presentati come media \pm deviazione standard (n=3). Lettere diverse per la stessa matrice indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

4.2.4 Nichel

Il mangime tradizionale (CTRL) (Fig. 36) presenta un contenuto di Ni statisticamente maggiore rispetto alle altre diete (~1.93 mg/kg dw), che si riduce significativamente all'aumentare della percentuale di inclusione di insetti nella dieta, fino ad arrivare a ~0.12 mg/kg dw nel mangime HI 100 ($P < 0.05$). Non esiste un limite di legge del Ni nel mangime.

Le larve e i giovanili di zebrafish presentano un contenuto di Ni che varia significativamente in base al mangime utilizzato, tuttavia non si riscontrano correlazioni statisticamente significative tra le concentrazioni di Ni nei pesci e nel mangime. Al contrario, il contenuto di Ni nei giovanili è correlato ($r= 0.7275$) al contenuto di Ni nelle larve, anche se la correlazione non è significativa ($P=0.1645$).

Il BAF del Ni per le larve (Tabella 15) cresce passando dai pesci alimentati con il mangime di controllo ai pesci alimentati con HI 100. Inoltre, il BAF dei giovanili è sempre maggiore del BAF delle rispettive larve. Questi risultati fanno pensare che il Ni si bioaccumuli nello zebrafish. Del resto, è già stato osservato in letteratura un accumulo di Ni in ossa, branchie e reni nei pesci (Wood et al., 2012).

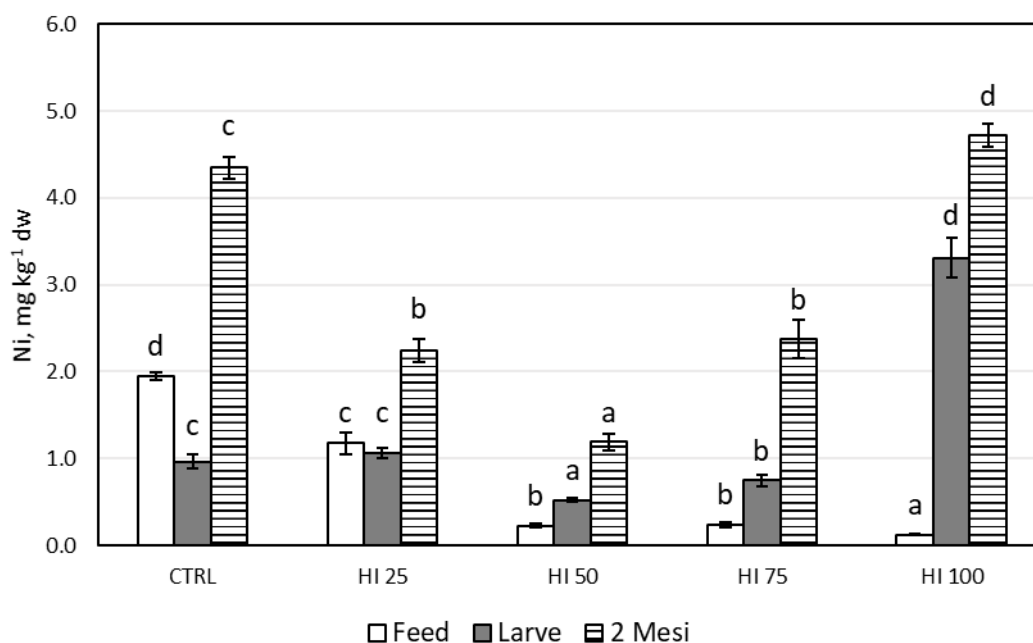


Fig. 35 - Contenuto di Ni (mg/kg dw) nel mangime (Feed), larve (20 giorni) e giovanili (2 mesi) di zebrafish. I valori sono presentati come media \pm deviazione standard ($n=3$). Lettere diverse per la stessa matrice indicano differenze statisticamente significative ($P<0.05$).

4.2.5 Mercurio

La concentrazione di mercurio nei mangimi (Fig. 37) è molto bassa rispetto agli altri metalli, 36-42 $\mu\text{g}/\text{kg dw}$, e non si apprezzano differenze sostanziali tra le diete. Il limite di legge del Hg nel mangime è di 0.1 mg/kg (contenuto massimo relativo ad un mangime con umidità del 12%, 2002/32/EC). Il mercurio contenuto nelle diete varia da 33 a 39 $\mu\text{g}/\text{kg}$

(calcolato per un'umidità del 12%). Le diete presentano quindi un contenuto di Hg molto al di sotto del limite di legge.

Il contenuto di Hg nelle larve varia da 5.5 a 12.4 mg/kg dw, e decresce significativamente all'aumentare della percentuale di inclusione di farina di insetto nel mangime. I giovanili presentano un contenuto di Hg che non varia significativamente tra i gruppi. È importante sottolineare come la concentrazione di Hg nei giovanili sia molto maggiore rispetto alle larve, indicando come il metallo si bioaccumula nel pesce in accrescimento. A conferma di ciò, il BAF di Hg, che nelle larve di zebrafish è inferiore a 1 (Tabella 15), nei giovanili di 2 mesi è circa 2, indicando come il metallo si accumula negli esemplari senza venire escreto. I BAF per il mercurio nei pesci selvatici possono raggiungere valori dell'ordine di 10^6 e tendono ad essere più alti nelle specie di maggiori dimensioni e piscivore e più bassi nei consumatori di piccole dimensioni (Wood et al., 2012), ad indicare che il Hg biomagnifica lungo la catena trofica.

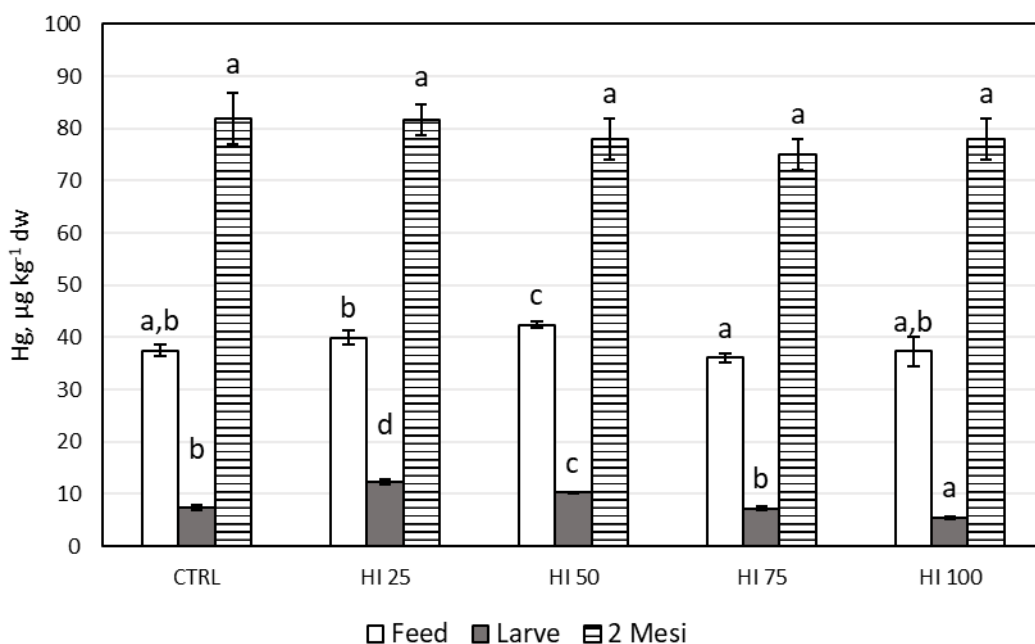


Fig. 36 - Contenuto di Hg (mg/kg dw) nel mangime (Feed), larve (20 giorni) e giovanili (2 mesi) di zebrafish. I valori sono presentati come media \pm deviazione standard (n=3). Lettere diverse per la stessa matrice indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

5 CONCLUSIONI

I substrati di allevamento di *Hermetia illucens* a base di silverskin (scarto della torrefazione del caffè) e di microalghe presentano livelli di Hg, Cd, Pb e As molto al di sotto dei limiti di legge previsti per i mangimi completi per animali (2002/32/EU, non sono presenti limiti per Ni), pertanto sono sicuri e privi di rischio chimico per quanto riguarda la presenza di metalli tossici. I substrati di allevamento studiati possono essere quindi proposti per l'allevamento di insetti.

Gli insetti HI studiati in questo lavoro di tesi sono in grado di bioaccumulare Cd, Pb e Hg, mentre As e Ni non vengono ritenuti. Le prepupe HI mostrano un contenuto di metalli pesanti al di sotto dei limiti di legge previsti per i mangimi, ma gli insetti HI allevati su diete a base di scarto della torrefazione e alga *Schizocytrium* sp. mostrano in generale un contenuto più basso di metalli rispetto agli insetti allevati su diete arricchite con l'alga *Isochrysis* sp. L'uso dell'alga *Schizocytrium* sp. come componente di arricchimento di PUFA nei substrati di crescita di HI potrebbe essere quindi la scelta migliore per ottenere substrati a basso rischio chimico.

La sostituzione di farina e olio di pesce con farina di *Hermetia illucens* fornisce diete con un contenuto di metalli generalmente più basso (tranne Cd), pertanto l'impiego delle prepupe HI come ingrediente per mangimi in acquacoltura in sostituzione alle farine di pesce può essere considerata un'alternativa sicura dal punto di vista della sicurezza chimica.

Gli zebrafish accumulano As, Ni già allo stadio larvale, mentre il Hg viene bioaccumulato nei giovanili. Cd e Pb non vengono ritenuti.

Ulteriori studi sul bioaccumulo dei metalli da parte di *Hermetia illucens* e *Danio rerio* potrebbero fornire utili informazioni necessarie allo sviluppo di nuovi mangimi ecosostenibili, prodotti a partire anche da altre sostanze di scarto.

BIBLIOGRAFIA

- Ab Latif Wani A. A. and Usmani J. A., 2015, “Lead toxicity: a review”, *Interdisciplinary toxicology*, 8 (2).
- Allsop M., Johnston P. and Santillo D, 2008, “Challenging the Aquaculture Industry on Sustainability”, Greenpeace Research Laboratories, University of Exeter, UK.
- Ay Ö., Kalay M., Tamer L., and Canli, M., 1999, “Copper and lead accumulation in tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na, K-ATPase activity”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62 (2), pp. 160-168.
- Barragan-Fonseca K. B., Dicke M. and van Loon J. J., 2018, “Influence of larval density and dietary nutrient concentration on performance, body protein, and fat contents of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*)”, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 166 (9), pp. 761-770.
- Belghit I., Liland N. S., Waagbø R., Biancarosa I., Pelusio N., Li Y., Krogdahl Å., Lock E. J., 2017, “Potential of insect-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*)”, *Aquaculture*.
- Bissen M. and Frimmel, F. H., 2003, “Arsenic a review. Part I: occurrence, toxicity, speciation, mobility”, *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 31 (1), pp. 9-18.
- Boyd R. S., 2009, “High-nickel insects and nickel hyperaccumulator plants: A review”, *Insect Science*, 16 (1), pp. 19-31.
- Caimi C, Prearo M, Schiavone A., Varello K., Gai F., Gasco L., 2019, “Caratterizzazione istologica dell'apparato digerente di storioni alimentati con diete contenenti una farina di mosca soldato (*Hermetia illucens*)”, *IRIS AperTO - Archivio Istituzionale Open Access dell'Università di Torino*.
- Cao L., Huang, W. Liu J., Yin, X. and Dou, S., 2010, “Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure”, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151 (3), pp. 386-392.
- Carpenè E., Andreani G., Isani G., 2007, “Metallothionein functions and structural characteristics”, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21 (1), pp. 35–39.
- Cataudella S. e Bronzi P., 2001, “Acquacoltura responsabile”.
- Čičková H., Newton G. L., Lacy R. C and Kozánek M., 2015, “The use of fly larvae for organic waste treatment”, *Waste Management*, 35, pp. 68–80.
- Costantini M., Cannella, Tomassi, 2016, “Alimentazione e nutrizione umana”.
- Craig S., 2017, “Understanding Fish Nutrition, Feeds, and Feeding”, Virginia Cooperative Extension.
- Crawford L. A., Hodkinson I, and N. W. Lepp., 1995 "The effects of elevated host-plant cadmium and copper on the performance of the aphid *Aphis fabae* (Homoptera: Aphididae)", *Journal of Applied Ecology*, pp. 528-535.
- Das K. K., Das S. N., Dhundasi S. A., 2009, “Nickel: molecular diversity, application, essentiality and toxicity in human health”, Nova Science Publishers, Inc.

- Das K. K., Das S. N., Dhundasi S. A., 2010. “Nickel: molecular diversity, application, essentiality and toxicity in human health. in Biometals”, Molecular Structures, Binding Properties and Applications, pp. 33-58.
- Das K.K.; Buchner V., 2007, “Effect of Nickel Exposure on Peripheral Tissues: Role of Oxidative Stress in Toxicity and Possible Protection by Ascorbic Acid”, Rev Environ Health., 22 (2), pp. 133-149.
- Denkhaus E. and Salnikow K., 2001, “Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity”, Critical Reviews in Oncology/Hematology, 42, pp. 35–56.
- Department Of Health And Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999, Toxicological Profile For mercury U.S.
- Diener S., Zurbrügg C. and Tockner K., 2015, “Bioaccumulation of heavy metals in the black soldier fly, *Hermetia illucens* and effects on its life cycle”, Journal of Insects as Food and Feed, 1(4), pp. 261-270.
- Diouf M., Sillam-Dussès D., Alphonse V., Frechault S., Miambi E. & Mora, P., 2019, “Mercury species in the nests and bodies of soil-feeding termites, *Silvestritermes* spp. (Termitidae, Syntermitinae), in French Guiana”, Environmental Pollution, 254, pp. 113064.
- Drake H. L., 1982, “Occurrence of nickel in carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium pasteurianum* and *Clostridium thermoaceticum*”, Journal of bacteriology,
- Eto K., 2000, "Minamata disease", Neuropathology, 20, pp. 14-19.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2012, “Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food”, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Parma, Italy.
- European Food Safety Authority, 2009, Scientific Opinion on Arsenic in Food, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM).
- Falnoga I. and Tušek-Žnidarič M., 2007, "Selenium–mercury interactions in man and animals." Biological trace element research, 119 (3), pp. 212-220.
- FAO, 1996, “Guidelines for drinking-water quality”, Volume 2 Health criteria and other supporting information, United Nations Food and Agricultural Organization, Geneva.
- FAO, 1998, “Rural Aquaculture: Overview and Framework for Country Reviews”, Food and Agricultural Organization, Bangkok, Thailand.
- FAO, 2011, “Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans”, Food and Agricultural Organization, Roma.
- FAO, 2011, Fisheries and Aquaculture Department, “Global Aquaculture Production Statistics for the year 2011”, Food and Agricultural Organization.
- FAO, 2013, “Food Wastage Footprint: Impacts on Natural Resources”, United Nations Food and Agricultural Organization, Rome.
- FAO, 2017, “Global aquaculture updates”, FAO Fisheries and Aquaculture Department Rome, pp. 6.
- FAO, 2018, “The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals”, Food and Agricultural Organization, Roma.

- Fattorini D. and Regoli F., 2004, "Arsenic speciation in tissues of the Mediterranean polychaete *Sabella spallanzanii*", *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23 (8), pp. 1881-1887.
- Fernando G. Barroso F. G., de Haro C., Sánchez-Muros M., Venegas E., Martínez-Sánchez A., Pérez-Bañón C., 2014, "The potential of various insect species for use as food for fish", *Aquaculture*, 422–423, pp. 193–201.
- Ferrer Llagostera P., Kallas Z., Reig L. and Amores de Gea D, 2019, "The use of insect meal as a sustainable feeding alternative in aquaculture: Current situation, Spanish consumers' perceptions and willingness to pay", *Journal of Cleaner Production*, 229, pp. 10-21.
- Francesco Regoli and Gary W. Winston, "Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxy nitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 156, pp. 96–105.
- Gaur S., Singh N., Singh A., & Singh H. K., 2017, "Biological influences of mercury on living organisms", *International Journal of Medical and Biomedical Studies*, 1 (6).
- Gidlow D. A., 2004, "Lead toxicity.", *Occupational Medicine*, 54 (2).
- Gray S. J., 2002, "Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist", *Marine Pollution Bulletin*, 45, pp. 46–52.
- Gupta S. C., Sharma A., Mishra M., Mishra R. K., Chowdhuri D. K., 2010, "Heat shock proteins in toxicology: How close and how far?", *Life Sciences*, 86, pp. 377–384.
- Hamdi, M., Sanchez, M. A., Beene, L. C., Liu, Q., Landfear, S. M., Rosen, B. P., & Liu, Z., 2009, "Arsenic transport by zebrafish aquaglyceroporins", *BMC molecular biology*, 10 (1).
- Hare, L., Saouter, E., Campbell, P. G., Tessier, A., Ribeyre, F., & Boudou, A., 1991, "Dynamics of cadmium, lead, and zinc exchange between nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* (Ephemeroptera) and the environment." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48 (1), pp. 39-47.
- Harrison M. D., Jones C. E., Solioz M. and Dameron C. T., 2000, "Intracellular copper routing: the role of copper chaperones", Elsevier Science Ltd., pp. 29-30.
- Hinkle P. M., Kinsella P. A. and Osterhoudt K. C., 1987, "Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels" *Journal of Biological Chemistry*, 262 (34), pp. 16333-16337.
- Hirose K., 2006, "Chemical Speciation of Trace Metals in Seawater: a Review", *Analytical sciences* august, 22, pp. 1055-1063.
- Inaba T., Kobayashi E., Suwazono Y., Uetani M., Oishi M., Nakagawa H. and Nogawa, K., 2005, "Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease", *Toxicology letters*, 159 (2), pp. 192-201.
- J. H. Duffus, 2002, "'Heavy metals'-a meaningless term?", *Pure Appl. Chem.*, 74 (5), pp. 793-807.

- Jomova K., Jenisova Z., Feszterova M., Baros S., Liska J., Hudecova D. and Valko M., 2011, "Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease.", *Journal of Applied Toxicology*, 31(2), pp. 95-107.
- Kasprzak K. S., Waalkes M. P. and Poirier L. A., 1987, "Effects of essential divalent metals on carcinogenicity and metabolism of nickel and cadmium", *Biological trace element research*, 13 (1), pp. 253-273
- Klaassen C. D., Liu J. and Diwan B. A., 2009, "Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*", 238 (3), pp. 215-220.
- Liao, C. M., Ju, Y. R., Chen, W. Y., & Chen, B. C., 2011, "Assessing the impact of waterborne and dietborne cadmium toxicity on susceptibility risk for rainbow trout", *Science of the total environment*, 409 (3), pp. 503-513.
- Lindqvist L., 1992, Accumulation of cadmium, copper and zinc in five species of phytophagous insects", *Environmental Entomology*, 21 (1).
- Liu J., Qu W. and Kadiiska M. B., 2009, "Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis", *Toxicology and applied pharmacology*, 238 (3), pp. 209-214.
- Magee and Darrin, 2011, "Brett L. Walker, Toxic archipelago: a history of industrial disease in Japan (Seattle: University of Washington Press, 2010)", *Journal of Environmental Studies and Sciences* 1(2), (2011), pp. 156-158.
- Makkar H. P. S., Tran G., Heuzé V., Ankers P., 2014, "State-of-the-art on use of insects as animal feed", *Animal Feed Science and Technology* 197, pp. 1–33.
- Marzouk S., 2016, "Physiological, ethological and ecological features of *Hermetia illucens*", *PeerJ Preprints*.
- May B. M., 1961, "The occurrence in New Zealand and the life-history of the soldier fly *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae).", *Nzj Sci*, 4 (5).
- Mazumder, DN Guha, 2008, "Chronic arsenic toxicity & human health", *Indian J Med Res* 128(4), pp. 436-447.
- Meindl, G. A., & Ashman, T. L. 2013, "The effects of aluminum and nickel in nectar on the foraging behavior of bumblebees", *Environmental pollution*, 177, pp. 78-81.
- Moriarty, Maeve M., 2009, "Arsenic speciation of terrestrial invertebrates." *Environmental Science & Technology* 43 (13), pp. 4818-4823.
- Morrissey Christy A., 2007, "Arsenic accumulation in bark beetles and forest birds occupying mountain pine beetle infested stands treated with monosodium methanearsonate", *Environmental science & technology* 41 (4), pp. 1494-1500.
- Mourad M., 2016, "Recycling, recovering and preventing "food waste": competing solutions for food systems sustainability in the United States and France", *Journal of Cleaner Production*, 126, pp. 461-477.
- Mudipalli A. and Zelikoff J. T., 2017, "Essential and Non-essential metals".
- Nogawa K., Tsuritani I., Kido T., Honda R., Yamada Y. and Ishizaki, M., 1987, "Mechanism for bone disease found in inhabitants environmentally exposed to cadmium: decreased serum $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D level" *International archives of occupational and environmental health*, 59 (1), pp. 21-30.

- Oliver A. L. S., Sanz-Landaluze J., Muñoz-Olivas R., Guinea J. and Cámara, C., 2011, “Zebrafish larvae as a model for the evaluation of inorganic arsenic and tributyltin bioconcentration”, *Water research*, 45 (19), pp. 6515-6524.
- Olsen R. L. and Hasan M. R., “A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production”, *Trends in Food Science & Technology*, 27, 120-128.
- Park H. H., 2016, “Black Soldier Fly Larvae Manual”, pp. 1–13.
- Pauly D., Christensen V., Guénette S, Pitcher T. J., Sumaila U. R., Walters C. J., Watson R. & Zeller D., 2002, “Towards sustainability in world fisheries”, *Nature*, 418, pp. 689-695.
- Phipps T., Tank S. L., Wirtz J., Brewer L., Coyner A., Ortego L. S., & Fairbrother A., 2002, “Essentiality of nickel and homeostatic mechanisms for its regulation in terrestrial organisms”, *Environmental Reviews*, 10 (4), pp. 209-261.
- Poonkothai M. V. B. S. and B. Shyamala Vijayavathi, 2012, "Nickel as an essential element and a toxicant", *Int. J. Environ, Sci* 1(4), 285-288.
- Przybyłowicz, W. J., Przybyłowicz, J. M., Migula, P., Głowacka, E., Nakonieczny, M., & Augustyniak, M., 2003, “Functional analysis of metals distribution in organs of the beetle *Chrysolina pardalina* exposed to excess of nickel by Micro-PIXE” *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, pp. 210, 343-348.
- Redelstein, R., Zielke, H., Spira, D., Feiler, U., Erdinger, L., Zimmer, H., & Hollert, H., 2015, “Bioaccumulation and molecular effects of sediment-bound metals in zebrafish embryos”, *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (21), pp. 16290-16304.
- Regoli F. and Giuliani M. E., 2014, “Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms”, *Marine Environmental Research*, 93, pp. 106-117.
- Regoli Francesco and Maria Elisa Giuliani, 2014, "Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms", *Marine Environmental Research*, 93, pp. 106-117.
- Ribas L. and Piferrer F., 2014, “The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research”, *Aquaculture*, 6, pp. 209–240.
- Rigby K. E. and Stillman M. J., 2004, “Structural studies of metal-free metallothionein”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325, pp. 1271–1278.
- Rimmer C. C., Miller E. K., McFarland K. P., Taylor R. J., & Faccio S. D., 2010 “Mercury bioaccumulation and trophic transfer in the terrestrial food web of a montane forest”, *Ecotoxicology*, 19 (4), pp. 697-709.
- Rolfhus, K. R., Wiener, J. G., Haro, R. J., Sandheinrich, M. B., Bailey, S. W., & Seitz, B. R., 2015, “Mercury in streams at Grand Portage National Monument (Minnesota, USA): Assessment of ecosystem sensitivity and ecological risk. *Science of the Total Environment*”, 514, pp. 192-201.
- Schmidt, G. H., and N. M. M. Ibrahim, 1994, "Heavy metal content (Hg²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺) in various body parts: its impact on cholinesterase activity and binding glycoproteins in

the grasshopper *Aiolopus thalassinus* adults", *Ecotoxicology and Environmental Safety* 29 (2), 148-164.

- Scientific report of EFSA, Cadmium dietary exposure in the European population European Food Safety Authority EFSA, *Journal* 2012, 10 (1).
- Smida A. D., Agostini M. C., Valderrama X. P., Furlan M. A. and Chedrese J., 2003, "Cadmium (Cd) stimulates transcription of the cytochrome P450 side chain cleavage gene in genetically modified stable granulosa cells", In *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 68, pp. 272-272.
- Spence R., Gerlach G., Lawrence C. and Smith C., "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*", *Biol. Rev.*, 83, pp. 13–34.
- Spivey Fox and Tao, 1981, "Animal models for assessing bioavailability of essential and toxic elements".
- Spranghers T., Ottoboni M., Klootwijk C., Obyn A., Deboosere S., De Meulenaer B., Michiels J., Eeckhout M, De Clercq P and De Smet S, 2016, "Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates", *Society of Chemical Industry*, 97, pp. 2594–2600.
- Spranghers T., Ottoboni M., Klootwijk C., Obyn A., Deboosere S., De Meulenaer B. & De Smet S., 2017, "Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97 (8), pp. 2594-2600.
- Stamera., Wesselss S., Neidigk R., Hoerstgen-Schwark G., 2014, "Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) larvae-meal as an example for a new feed ingredients' class in aquaculture diets", *Proceedings of the 4th ISOFAR Scientific Conference. "Building Organic Bridges"*, at the Organic World Congress 2014, pp. 1043-1046.
- Terlizzi A., Geraci S. e Gibbs P. E., 1999, Tributyltin (TBT)-induced imposex in the Neogastropod *Hexaplex trunculus* in Italian coastal waters: Morphological aspects and ecological implications, *Italian Journal of Zoology*, 66, pp. 141-146.
- Tomberlin J.K., Van Huis A., Benbow M.E., Jordan H., Astuti D.A., Azzollini D., Banks I., Bava V., Borgemeister C., Cammack J.A., Chapkin R.S., Čičková H., Crippen T.L., Day A., Dicke M., Drew D.J.W., Emhart C., Epstein M., Finke M., Fischer C.H., Gatlin D., Grabowski N.Th., He C., Heckman L., Hubert A., Jacobs J., Josephs J., Khanal S.K., Kleinfinger J.-F., Klein G., Leach C., Liu Y., Newton G.L., Olivier R., Pechal J.L., Picard C.J., Rojo S., Roncarati A., Sheppard C., Tarone A.M., Verstappen B., Vickerson A., Yang H., Yen A.L., Yu Z., Zhang J. and Zheng L., 2015, "Protecting the environment through insect farming as a means to produce protein for use as livestock, poultry, and aquaculture feed", *Journal of Insects as Food and Feed*, 1 (4), pp. 307-309.
- Tovar A., Moreno C., Manuel-Vez M. P. And Vargas M. G., 2000, Environmental Impacts Of Intensive Aquaculture In Marine Waters, *Wat. Res.*, 34b (1), pp. 334-342.
- Truzzi C, Giorgini E., Annibaldi A., Antonucci M., Illuminati S., Scarponi G., Riolo P., Isidoro N., Conti C., Zarantonello M., Cipriani R., Olivotto I., 2019, "GC-MS and FTIR analysis of fatty acids profile and biochemical composition of black soldier fly (*Hermetia*

illucens): influence of feeding substrate based on coffee-waste silverskin enriched with microalgae”, Animal feed Science and technology.

- Vahter M., 2002, “Mechanisms of arsenic biotransformation”, Toxicology, 181, 211-217.
- Van der Fels-Klerx H. J., Camenzuli L., Van Der Lee M. K. and Ooninx, 2016, "Uptake of cadmium, lead and arsenic by *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* from contaminated substrates", PLoS One 11 (11).
- Vargas A., Randazzo B., Riolo P., Truzzi C., Gioacchini G., Giorgini E., Loreto N., Ruschiuni S., Zarantoniello M., Antonucci M., Polverini S., Cardinaletti G., Sabbatini S., Tulli F., & Olivotto I., 2018, “Rearing Zebrafish on Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*): Biometric, Histological, Spectroscopic, Biochemical, and Molecular Implications”, ©Mary Ann Liebert, Inc., ZEBRAFISH, 15 (4), pp. 404-419.
- Vergauwen, L., Knapen, D., Hagenars, A., & Blust, R., 2013, “Hypothermal and hyperthermal acclimation differentially modulate cadmium accumulation and toxicity in the zebrafish” Chemosphere, 91 (4), pp. 521-529.
- Vijver, Martina, et al., 2003, "Metal uptake from soils and soil–sediment mixtures by larvae of *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera)", Ecotoxicology and Environmental Safety 54(3), pp. 277-289.
- Watanabe T., 1982, “Lipid nutrition in fish”, Comp. Biochem. Physiol., 73B (1), pp. 3-15.
- Wood C. M., Farrell A. P. and Brauner C. J., 2012, “Homeostasis and toxicology of essential metals”.
- Wood C. M., Farrell A. P. and Brauner C. J., 2012, “Homeostasis and toxicology of non-essential metals”.
- Wu, Tiejian, Germaine M. Buck and Pauline Mendola, 2003, "Blood lead levels and sexual maturation in US girls: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994", Environmental health perspectives 111 (5), pp.737-741.
- Yokoi K., Uthus E. O., Nielsen F. H., 2003, “Nickel deficiency diminishes sperm quantity and movement in rats. Biological trace element research”, 93 (1-3), pp. 141-153.
- Zarantoniello M., Randazzo B., Truzzi C., Giorgini E., Marcellucci C., Vargas-Abúndez J. A., Zimbelli A., Annibaldi A., Parisi G., Tulli F., Riolo P. & Olivotto I., 2018, “A six-months study on Black soldier Fly (*Hermetia illucens*) based diets in zebrafish”, Scientific Reports.
- Zhang Z., Song X., Wang Q. & Lu X., 2012, “Mercury bioaccumulation and prediction in terrestrial insects from soil in Huludao City, Northeast China”, Bulletin of environmental contamination and toxicology, 89 (1), pp. 107-112.
- Zhang Z., Wang Q., Zheng D., Zheng N. and Lu, X., 2010, “Mercury distribution and bioaccumulation up the soil-plant-grasshopper-spider food chain in Huludao City, China”, Journal of Environmental Sciences, 22 (8), pp. 1179-1183.

Zhou, J., Wang, Z., Sun, T., Zhang, H., & Zhang, X., 2016, “Mercury in terrestrial forested systems with highly elevated mercury deposition in southwestern China: the risk to insects and potential release from wildfires”, *Environmental pollution*, 212, pp. 188-196