



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: PRODUZIONE E PROTEZIONE DELLE COLTURE

APIS MELLIFERA COME BIOINDICATORE  
DELLA PRESENZA DI MICROPLASTICHE  
NELL'AMBIENTE

APIS MELLIFERA AS A BIOINDICATOR OF  
MICROPLASTICS IN THE ENVIRONMENT

TIPO TESI: sperimentale

Studente:  
RICCARDO CANULLO

Relatore:  
PROF.SSA SARA RUSCHIONI

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

# SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	3
ELENCO DELLE FIGURE .....	4
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI .....	5
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI .....	6
CAPITOLO 1 MATERIALI E METODI .....	14
1.1 Forza elettrostatica.....	15
1.2 Contatto.....	16
1.3 Analisi delle microplastiche.....	17
1.4 Microplastiche.....	18
CAPITOLO 2 RISULTATI E CONSIDERAZIONI.....	19
2.1 Forza elettrostatica .....	19
2.2 Contatto.....	26
CONCLUSIONI .....	33
BIBLIOGRAFIA .....	35

## ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Numero totale di microplastiche presenti nel corpo delle api .....	19
Tabella 2: Numero di microplastiche presenti nelle api contaminate con PP .....	20
Tabella 3: Numero di microplastiche presenti nelle api contaminate con PVC .....	20
Tabella 4: Numero di microplastiche presenti nelle api contaminate con PS .....	20
Tabella 5: Numero totale di microplastiche presenti nel corpo delle api (contatto) .....	26
Tabella 6: Numero di microplastiche presenti nelle api contaminate con PP .....	26
Tabella 7: Numero di microplastiche presenti nelle api contaminate con PVC .....	26
Tabella 8: Numero di microplastiche presenti nelle api contaminate con PS .....	27

## ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Polimeri utilizzati .....	19
Figura 2: Api attratte dal miele .....	22
Figura 3: Ape in hovering su microplastiche .....	22
Figura 4: Ape in hovering su microplastiche .....	22
Figura 5: Campioni raccolti .....	23
Figura 6: Api in volo.....	19
Figura 7: Tibia di zampa metatoracica.....	22
Figura 8: Basitarso di zampa metatoracica .....	22
Figura 9: Basitarso di zampa protoracica.....	22
Figura 10: Addome di Apis mellifera contaminato da PVC .....	23
Figura 11: Capo di Apis mellifera contaminato da PVC .....	23
Figura 12: Piastra Petri con svariati frammenti di PVC sulla superficie interna .....	24
Figura 13: Microplastiche adese al corpo delle api per forza elettrostatica .....	24
Figura 14: Grafico riassuntivo del esperimento 1 relativo a PP.....	25
Figura 15: Grafico riassuntivo dell'esperimento 1 relativo a PVC .....	25
Figura 16: Grafico riassuntivo dell'esperimento 1 relativo a PS.....	25
Figura 17: Zampa metatoracica con frammenti di PVC presenti in tutte le sue parti .....	27
Figura 18: Zampa metatoracica la cui cestella del polline risulta contaminata da PS .....	28
Figura 19: Frammento di PS ritrovato nella piastra Petri .....	28
Figura 20: Addome contaminato da PS .....	28
Figura 21: Ala di Apis mellifera con frammento di PS .....	29
Figura 22: Particella di PP ritrovata sulla superficie interna della piastra Petri.....	29
Figura 23: Particella di PS ritrovata sulla superficie interna della piastra Petri.....	30
Figura 24: Frammento di PS .....	30
Figura 25: Grafico riassuntivo dell'esperimento 2.....	31
Figura 26: Grafico riassuntivo dell'esperimento 2 relativo a PP .....	31
Figura 27: Grafico riassuntivo dell'esperimento 2 relativo a PVC .....	32
Figura 28: Grafico riassuntivo dell'esperimento 2 relativo a PS .....	32

## ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

PP	Polipropilene.
PVC	Polivinilcloruro.
PS	Polistirene.

## INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Nell'equilibrio dell'ecosistema terrestre uno dei ruoli chiave più affascinanti è ricoperto dagli impollinatori. Essi, infatti, sono l'esempio vivente di come l'evoluzione possa portare a delle soluzioni adattative di estrema complessità ed efficacia in ottica di un preciso ruolo all'interno di una nicchia ecologica. Questi insetti si sono evoluti di pari passo con il mondo vegetale, in particolare con i fiori, che sono la loro risorsa principale. Essi sono andati così verso una specializzazione morfologica mirata all'efficienza del volo, alla raccolta del polline, alla sopravvivenza nonostante condizioni "sfavorevoli". Nel caso di *Apis mellifera* la capacità di adattamento principale risiede nell'accumulo di scorte durante i momenti dell'anno in cui vi è abbondanza di risorse. Per questo motivo tale specie vive in simbiosi con le varie fioriture, dalle quali ricava il nutrimento necessario per vivere.

*Apis mellifera* ha probabilmente avuto le sue origini in Africa o in Asia da dove poi si è diffusa verso il Medio Oriente e l'Europa. Questo insetto è organizzato in nuclei che in natura costruiscono strutture chiamate "alveari" formati da più favi di cera, ognuno composto da molte cellette dove verrà riposto il miele o la covata (le larve delle future operaie o dei maschi). All'interno dell'alveare vivono l'ape regina, unica femmina fertile e prolificata, dalle 50 alle 100mila operaie, femmine sterili destinate alle operazioni di mantenimento e di difesa della colonia, e dai 500 ai 200 fuchi, i maschi destinati alla riproduzione con le regine.

L'ape regina è l'unica femmina fertile, lo strumento attraverso il quale l'alveare rinnova giornalmente i ranghi del proprio esercito, soprattutto durante la stagione primaverile ed estiva. Essa nasce da una celletta diversa da quella delle operaie, più grande e più allungata. Viene nutrita esclusivamente con pappa reale dalle operaie, questo fa sì che il suo sviluppo porti ad una forma diversa da quella di queste ultime; il suo corpo infatti è massiccio, soprattutto dopo la fecondazione (da quel momento la sua sacca per contenere il seme dei fuchi, la spermatofora, contiene milioni di spermatozoi), le ali sono meno sviluppate di quelle delle operaie perché la maggior parte della sua vita non dovrà volare, le zampe non hanno la morfologia idonea alla raccolta del polline, gli occhi hanno meno ommatidi delle operaie perché starà praticamente sempre all'interno dell'alveare, il pungiglione non serve ad iniettare veleno ma a deporre le uova nelle celle. Essa viene curata e controllata costantemente da un

gruppo di operaie che tramite vari segnali le indica tutto ciò che deve fare, dove e cosa ovideporre.

Le api operaie sono femmine sterili, le loro ovaie sono atrofizzate e al loro posto presentano quella che è la ghiandola del veleno, che porta al pungiglione. Si occupano del mantenimento e della difesa dell'alveare progredendo nelle mansioni svolte in base alla loro anzianità. Ricevono pappa reale solo all'inizio del loro allevamento come larve fino al sesto giorno, poi le nutrici passano a somministrare miele e polline fino allo sfarfallamento. All'inizio della loro vita svolgono il ruolo di spazzine, un compito facile ma essenziale per la salute della famiglia, adatto alla loro poca esperienza. Dal quarto al nono giorno esse diventano nutrici, incaricate di provvedere al sostentamento delle larve. Con il passare del tempo lo sviluppo di questi insetti procede arrivando all'attivazione delle ghiandole della cera, le operaie possono così all'occorrenza produrre ciascuna fino a 6 mg di cera, che verrà usata per la costruzione dei favi. Dal diciassettesimo al ventitreesimo giorno l'ape operaia comincia ad avvicinarsi all'uscita dell'alveare diventando un'ape ricevente o guardiana. Infine, l'ultimo compito sarà quello della bottinatrice, ruolo tanto importante quanto pericoloso; sono le api più esperte a svolgere questa mansione, appunto perché la loro maturità permette loro di affrontare in modo migliore quella che sarà una routine piena di ostacoli e difficoltà. Per quest'ultime i fiori rappresentano la principale fonte di sostentamento ed essi non hanno in genere una vita molto lunga, ecco perché la ricerca costante di nuove fonti di nettare e la tempestività risulta fondamentale.

Ogni qual volta un'ape operaia adulta scopre una nuova fonte di cibo nei pressi dell'alveare, deve comunicarlo al più presto alle compagne, e lo fa tramite la danza. L'operaia torna alla colonia e inizia a muoversi oscillando e trasmettendo il suo entusiasmo alle compagne vicine, indicando che c'è qualcosa di molto appetibile nei paraggi. Le spettatrici la odorano percependo il profumo dei fiori da essa visitati e cercando nei dintorni troveranno la fonte nutritiva e inizieranno a sfruttarla il prima possibile. Quando però la nuova fioritura viene scoperta a distanze superiori, la traccia odorosa dei fiori è meno efficace il che obbliga l'ape ad essere ancora più precisa nelle sue indicazioni. Ecco quindi che, una volta rientrata all'alveare, inizierà una danza a forma di otto: girerà a destra e a sinistra ripetutamente, vibrando al centro della "strozzatura" dell'otto. Per aiutare ad orientare le sorelle volge l'asse centrale del suo "otto" prendendo come riferimento il Sole e indicando se la fonte di cibo si trovi in direzione del Sole o in quella opposta, così come l'angolo e la direzione da prendere rispetto ad esso. Se l'ape si posiziona frontalmente rispetto al Sole ed esegue la danza vibrando con uno specifico angolo, vorrà dire che la fonte di cibo si trova in direzione del Sole, deviata

approssimativamente dello stesso angolo rispetto ad esso. Se invece durante la danza l'ape mantiene il Sole alle sue spalle, vorrà dire che la fonte di cibo si trova in direzione opposta al Sole, deviata circa dello stesso angolo rispetto ad esso.

Per far capire la distanza o la tipologia di fioritura l'ape ricorre poi alla frequenza. Maggiore sarà la frequenza di danza, più la fonte sarà ricca o vicina o comunque meno faticosa da raggiungere. Più la frequenza di danza è lenta, più l'ape sta comunicando che sì, del cibo c'è, ma è scarso o comunque faticoso da raggiungere perché molto lontano. Ecco quindi che la frequenza della danza è direttamente proporzionale all'entusiasmo dell'ape e alla vicinanza o alla ricchezza della fonte (Bonardo, 2022).

Tuttavia la vita di questi insetti e l'intima connessione con l'ambiente che li circonda sono regolate da particolari interazioni ed equilibri. Uno di questi è rappresentato dalla carica elettrostatica. L'operaia, infatti, durante il volo assume una carica positiva chiamata "elettricità di attrito" (Altmann & Warnke, 1979). Queste interazioni elettrostatiche svolgono un ruolo di rilievo in vari processi biologici, tra cui l'impollinazione delle piante (Honig & Nicholls, 1995) e questi insetti hanno la capacità di captarle. L'elettrorecezione, definita come la capacità di un organismo di rilevare forze elettriche esterne, è nota da tempo negli animali che vivono in ambienti acquatici elettricamente conduttivi, ad esempio nei pesci (Kalmijn, 1971), negli anfibi e nell'ornitorinco (Gregory, et al., 1989). Studi recenti hanno fornito evidenze comportamentali e fisiologiche del fenomeno negli impollinatori (Clarke, et al., 2013). Finora, le prove indicano meccanismi di rilevamento delle forze elettriche aeree che sono molto diversi da quelli descritti negli animali acquatici (Carr, et al., 1986). In questi, l'elettrorecezione si basa sulla trasmissione diretta dello stimolo dal mezzo conduttivo (acqua) al sistema nervoso, attraverso canali recettoriali conduttivi (ampolla di Lorenzini). Per gli animali terrestri che risiedono nell'aria, ossia un mezzo elettricamente resistivo, il rilevamento dei campi elettrici deve funzionare in modo diverso e costituire una nuova capacità sensoriale. *Bombus terrestris* (Clarke, et al., 2013) e *Apis mellifera* (Greggers, et al., 2013) si sono dimostrati in grado di rilevare campi elettrici deboli, ciascuno in diversi contesti comportamentali, utilizzando diversi meccanismi sensoriali. I bombi possono percepire la presenza di deboli campi elettrici che circondano i fiori e discriminare tra campi elettrici con diverse geometrie radiali utilizzando le informazioni da essi elaborate per discriminare tra fiori gratificanti e non gratificanti. Possono anche apprendere i compiti di discriminazione del colore più velocemente quando i segnali di colore sono abbinati a segnali di campo elettrico simili per grandezza a quelli che circondano i fiori naturali. La conferma dell'importanza dei



dati ricavati dalle informazioni relative al campo elettromagnetico è data dal fatto che questi insetti presentano difficoltà nell'orientarsi in ambienti elettricamente neutri.

Il fuco è il maschio di *Apis mellifera*. Impiega 24 giorni per sfarfallare e viene nutrito inizialmente con pappa reale e poi con miele e tanto polline; anche dopo lo sfarfallamento spesso e volentieri continua a venir nutrito dalle operaie nutrici. La sua principale funzione è l'atto riproduttivo con la regina; il suo corpo è fatto per questo preciso scopo infatti presenta occhi composti molto voluminosi e con un altissimo numero di ommatidi (7-8000), per poter individuare meglio la regina durante il volo nuziale, ali ampie, per avere più potenza durante gli spostamenti in aria, zampe sprovviste di appendici, per la raccolta del polline. Oltre alla riproduzione svolge un'utile compito di termoregolazione all'interno dell'alveare.

La prima cosa a cui si pensa se si parla di api è il miele, la sostanza zuccherina che questi insetti usano come scorta di cibo per la stagione autunnale ed invernale. L'uomo cercando di beneficiare della bontà e delle proprietà di questo prodotto è entrato in contatto con gli alveari già da tempi antichissimi; a testimoniarlo sono le prime pitture rupestri che raffigurano figure umane intente a raccogliere favi di miele (Cueva della Arana, Bicorp, Valencia, risalente al Neolitico, circa 7000 a.C.). Questo rapporto si è consolidato con il popolo egizio; esso, infatti, conferiva alle api un grande valore, anche di natura teologica. In un antico papiro si leggeva che questi insetti erano nati dalle lacrime del dio Ra e che anche la cera ed il miele fossero state generate dalla stessa divinità. In questo contesto le api iniziarono dunque ad essere gestite da quelli che possono essere considerati i primi apicoltori della storia. Lo sviluppo delle tecniche progredì fino ad arrivare a quella che può essere a tutti gli effetti definita un'apicoltura mobile: le fioriture non avvenivano nello stesso momento lungo tutta l'estensione dei territori egiziani, arrivando prima nell'Alto Egitto e poi nel Basso Egitto; quindi, i proprietari degli alveari affidavano gli stessi a dei signori che con delle barche eseguivano una transumanza lungo il fiume Nilo spostandosi da sud a nord e dilatando la stagione favorevole per i loro insetti produttori di miele e cera. I prodotti apistici inoltre, fanno anche parte della tradizione greca: nell'antica Grecia si pensava che il dio Zeus fosse stato cresciuto di nascosto in una caverna per sfuggire alle manie omicide di suo padre Crono e che fosse stato nutrito dalle ninfe con latte e miele; secondo la stessa mitologia greca Aristeo, figlio di Apollo, apprese le conoscenze inerenti all'apicoltura dalle ninfe, per poi successivamente trasmettere il suo saper agli uomini. *Apis mellifera*, la cui origine viene fatta risalire a 7 milioni di anni fa, venne dunque in contatto con l'essere umano circa 9000 anni fa. In questo lasso di tempo essa ha proliferato concordemente alle oscillanti condizioni climatiche. Tuttavia, ultimamente, l'ambiente naturale è stato stravolto in maniera radicale, e i fiori, la principale ricchezza per

questi insetti impollinatori, cominciano a scarseggiare in moltissime zone antropizzate. Le api si interfacciano così ad un mondo, dove la mano dell'uomo è sempre più invadente, e la sua impronta è visibile anche nei luoghi apparentemente più incontaminati.

Questo studio si pone l'obiettivo di analizzare le api in relazione ad un'inquinante che deriva dallo stile di vita che l'essere umano ha creato a partire dalla seconda metà del secolo scorso: la plastica. Noi infatti, in qualità di specie umana, dobbiamo il nostro successo evolutivo alla nostra innata capacità di adattamento, grazie ad essa siamo stati in grado di evolverci, di sopravvivere, di colonizzare ambienti inhospitali. Tramite un percorso graduale fatto da continue conquiste e scoperte siamo arrivati oggi a quella che chiamiamo "società contemporanea", che fonda la sua logica su molti principi cardine, tra i quali la ricerca del benessere del singolo nella collettività. Questo "star bene" viene perseguito tramite più aspetti, tipici della vita nei paesi sviluppati tra cui: avere una casa, un lavoro con un buon reddito, vestiti, cibo ecc. In tutto questo la plastica riveste un ruolo chiave: moltissimi oggetti usati nel vivere quotidiano sono realizzati a partire da questo materiale, per via di alcuni vantaggi che le sue caratteristiche strutturali portano sia ai produttori che ai consumatori. Tuttavia, gli aspetti negativi dell'utilizzo di materiali plastici sono molteplici; primo fra tutti la dispersione di questi nell'ambiente, che si osserva anche attraverso delle semplici azioni che fanno parte della routine quotidiana, come il lavaggio dei vestiti sintetici (De Falco, et al., 2019). Negli ultimi anni, le attività antropiche sono considerate i fattori chiave della perdita di biodiversità e delle funzioni dell'ecosistema (C. Rillig, et al., 2018). Un indicatore tipico dell'attività umana è infatti proprio l'enorme quantità di plastica prodotta e la conseguente dispersione di gruppi chimicamente eterogenei di materiali polimerici (S. Galloway, et al., 2017). Nel 2017 il mondo ha prodotto 348 milioni di tonnellate di plastica e questo numero cresce ogni anno del 5% circa. Gran parte di questa produzione si accumula come rifiuto nell'ambiente e la progressiva frammentazione porta alla presenza di plastica secondaria negli ambienti terrestri, d'acqua dolce, atmosferici e marini. La resilienza e la longevità estremamente elevate conferiscono alla plastica la sua utilità, ma queste stesse caratteristiche portano all'accumulo sfrenato di materiali sintetici in quasi tutti gli ecosistemi del pianeta (Brahney, et al., 2020). I rifiuti di plastica, compresa la plastica biodegradabile, sono in realtà più suscettibili alla frammentazione che alla degradazione e mineralizzazione, il che si traduce in plastiche di dimensioni più piccole (Whitacre, et al., 2014). La plastica generata con dimensioni delle particelle <5 mm è generalmente considerata microplastica. Pochi studi hanno esaminato i livelli di inquinamento e le possibili fonti di microplastiche nell'ambiente agricolo e i loro effetti dannosi sulla biodiversità del suolo (Boots, et al., 2019); (Chae & Youn-Joo, 2018);

(Mai , et al., 2022); (Zhang, et al., 2018). Risultati recenti hanno confermato la natura pervasiva e persistente dei frammenti di plastica nel terreno (Zhang, et al., 2018) e gli effetti negativi degli stessi sulla crescita, la riproduzione, l'alimentazione, la sopravvivenza e il livello di immunità della fauna terricola (Zhu, et al., 2019). Una causa considerevole di inquinamento da microplastiche nel mondo sono i fanghi delle acque reflue trattate (biosolidi) che vengono spesso riciclati nei terreni agricoli; si è visto purtroppo che questa pratica costituisce un'immissione notevole di frammenti di plastica, nanoplastiche, materiali sintetici, metalli pesanti, prodotti farmaceutici e nanoparticelle ingegnerizzate nel terreno. Secondo uno studio (Qiu , et al., 2016) l'Unione Europea, gli Stati Uniti, la Cina, il Canada e l'Australia, rispettivamente immettono circa 26.042, 21.249, 13.660, 1.518 e 1.241 tonnellate di microplastiche ogni anno nei terreni agricoli come risultato dell'applicazione di biosolidi.

Le api in quanto impollinatori vagliano continuamente i territori limitrofi all'alveare in cerca di polline e immagazzinano questi piccolissimi granelli tramite i peli piumosi che ricoprono il loro corpo e le zampe modificate per questo scopo.

Le microplastiche, essendo anch'esse granelli piccolissime possono essere raccolte involontariamente da *Apis Mellifera*? Questo è il quesito al quale abbiamo cercato di rispondere con questo studio.

Questi insetti sono già stati analizzati con successo in quanto potenziali bioindicatori di metalli pesanti presenti come inquinanti nell'ambiente, da uno studio del 2019 (Davodpour, et al., 2019), nel quale sono stati raccolti 180 campioni di terreno, piante (incluse radici e parte aerea), api e miele da 12 siti nelle principali regioni di apicoltura e produzione di miele nella provincia di Markazi, in Iran, e sono stati rilevati quantità considerevoli di Cadmio e Cromo.

Per quanto riguarda invece la presenza di microplastiche nell'aria, è stata studiata a livello del terreno utilizzando collettori attivi e passivi o misurando il loro tasso di deposizione al suolo, ma i dati disponibili sono limitati e difficili da interpretare a causa di complicazioni tecniche, del rapido mescolamento atmosferico e del verificarsi di eventi di deposizione imprevedibili. L'unico ampio studio disponibile ha mostrato tassi di deposizione >100 microplastiche al metro quadrato al giorno in aree remote del Nord America. I calcoli della traiettoria della massa d'aria e i parametri della popolazione suggeriscono un'origine urbana per i frammenti depositati in seguito a piogge, mentre in assenza di precipitazioni, gli stessi potrebbero percorrere distanze molto grandi (Brahney, et al., 2020). Mentre le microplastiche relativamente grandi possono produrre danni fisici, piccoli detriti possono causare il blocco dell'intestino di piccoli animali e, per particelle sufficientemente piccole, la traslocazione e il trasferimento attraverso le reti alimentari, originando così veri e propri effetti tossici.

L'accumulo nei tessuti e la traslocazione sono fenomeni descritti per la plastica rispettivamente nell'ordine di centinaia e decine di nanometri (Sendra , et al., 2020). È stato ipotizzato che piccole particelle potrebbero causare danni a livello cellulare e molecolare comprese immunotossicità e genotossicità (Ballesteros, et al., 2020). Un ulteriore motivo di preoccupazione è la possibile migrazione di frammenti verso gli alimenti confezionati (Kedzierski, et al., 2020). Infatti, la presenza di quest'ultimi negli alimenti è ben documentata con stime di assunzione annuale nell'ordine di decine di migliaia di particelle (Cox , et al., 2019).

Nel 2021 uno studio (Edo, et al., s.d.) ha raccolto api da apiari situati nel centro di Copenaghen e dalle vicine aree semiurbane e rurali mostrando la presenza di microplastiche in tutte le località campionate principalmente sotto forma di frammenti (52%) e fibre (38%) con diametro equivalente medio di  $64 \pm 39 \mu\text{m}$  per le fibre e  $234 \pm 156 \mu\text{m}$  per i frammenti. Il campionamento, condotto con la collaborazione dell'associazione danese degli apicoltori (Danmarks Biavlterforening), ha avuto luogo in diciannove diversi apiari urbani di Copenaghen e di altre aree in Danimarca. Il quantitativo più elevato corrispondeva agli apiari urbani, ma un numero comparabile di microplastiche è stato trovato negli alveari provenienti da aree suburbane e rurali, il che può essere spiegato dalla presenza di insediamenti all'interno del raggio di bottinamento delle api operaie e dalla facile dispersione di piccole microplastiche da parte del vento. L'analisi Micro-FTIR ha confermato la presenza di tredici polimeri sintetici, il più frequente dei quali era il poliestere seguito dal polietilene e dal cloruro di polivinile. Gli inquinanti monitorati includono prodotti utilizzati specificamente dagli apicoltori per controllare i parassiti, nonché diversi tipi di inquinanti ambientali raccolti dalle api durante i loro voli di bottinamento. Le api interagiscono essenzialmente con tutti gli elementi del loro ambiente e riportano le sostanze inquinanti nel loro alveare, dove alla fine si accumulano e vengono trasferite nel miele, nel pan d'api e nella cera d'api. I risultati hanno dimostrato la presenza di microplastiche attaccate al corpo delle api e aprono un nuovo percorso di ricerca sul loro utilizzo come biocampionatori attivi per l'inquinamento antropogenico.

La tesi di laurea è quindi incentrata su *Apis Mellifera* e sulla sua validità come bioindicatore per le microplastiche. In particolare, vengono prese in considerazione due situazioni tipo, nelle quali l'insetto entra in rapporto con queste particelle, e viene misurato e comparato il livello di esposizione finale all'inquinante.

I motivi che mi hanno spinto ad affrontare una tematica simile sono riconducibili al fascino che questi apoidei esercitano su di me, per la loro struttura sociale e per il ruolo fondamentale

che hanno nell'ecosistema insieme agli altri impollinatori e l'interesse per le tematiche ambientali come l'inquinamento da microplastiche.

L'obiettivo di questa tesi è la validazione di *Apis Mellifera* come organismo indicatore della presenza di residui di plastica nell'ambiente. Nel corso dello studio vengono comparati i poteri contaminanti di tre diversi tipi di microplastiche attraverso l'inquinamento intenzionale ad alti dosaggi di diversi campioni, simulando situazioni la cui dinamica risulta essere verosimile.

# Capitolo 1

## MATERIALI E METODI

La sperimentazione alla base dello studio si articola in due esperimenti, ognuno di essi ripetuto per ciascuna delle tre microplastiche prese in esame, ossia Polipropilene (PP), Polivinilcloruro (PVC) e Polistirene (PS) (Figura 1).

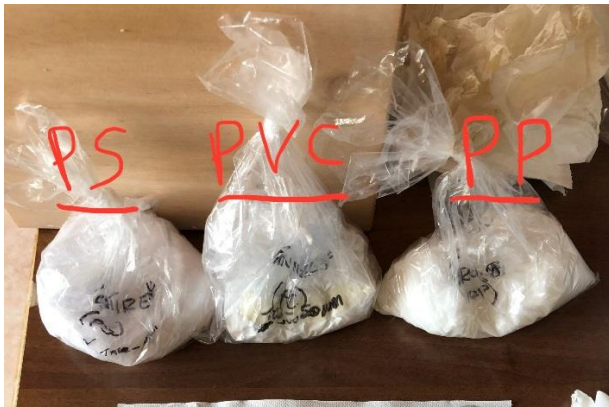


Figura 1. Sacchetti contenenti i tre polimeri utilizzati per i test

Prima di tutto è stato necessario “addestrare” le api sistemando del miele nel luogo scelto per lo svolgimento del test. Una volta che l’odore del loro cibo si è disperso nell’aria sono cominciate ad arrivare le prime operaie di *Apis mellifera* (Figura 2) e dopo circa mezz’ora il sito era circondato da api.



Figura 2. Api attratte dal miele

L'addestramento era terminato poiché da quel momento esse erano a conoscenza della fonte di cibo e, tramite la loro danza, avrebbero comunicato alle compagne dello stesso alveare il luogo da raggiungere.

### 1.1 Forza elettrostatica

Il primo esperimento ha voluto testare la capacità dei frammenti di plastica di attaccarsi ed aderire al corpo dell'ape attratti dalla forza elettrostatica generata dalla carica dello stesso insetto. In una piastra Petri ho quindi disposto un letto di microplastiche e sopra di esso una carta filtro con una goccia di miele al centro. La Petri è stata disposta all'interno di un cubo di legno avente 5 facce (una mancante per creare una specie di tunnel) in modo da ridurre o azzerare l'influenza dell'eventuale vento presente. Le api andando verso il miele entravano nel cubo, sorvolavano il letto di microplastiche senza atterrarvi sopra (Figura 3), si posavano sopra la carta filtro per cibarsi del miele e venivano infine campionate. Ho ripetuto la stessa procedura per ognuno dei tre tipi di microplastiche (PP, PVC, PS).



Figura 3. Ape in hovering sopra il letto di microplastiche

## 1.2 Contatto

Il secondo esperimento è simile al precedente con la differenza che il miele in questo caso è a diretto contatto con il letto di microplastiche; l'ape, quindi, vola sopra i frammenti e poi vi atterra sopra per cibarsi del miele (Figura 4). A questo punto avviene il campionamento. La procedura è stata ripetuta per ognuna delle tre microplastiche.





Figura 4. Ape in hovering sopra le microplastiche e ape posatasi sopra i frammenti, intenta a cibarsi del miele

### 1.3 Analisi delle microplastiche

Le api sono state riposte in delle piastre richiudibili ciascuna contrassegnata con il codice indicante il tipo di plastica, il numero dell'esperienza e il numero dell'ape campionata (Figura 5).

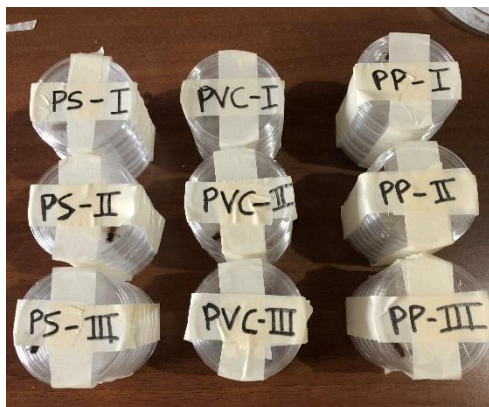


Figura 5. Tutti i campioni una volta raccolti e catalogati

I contenitori sono stati riposti subito in congelatore per evitare il deterioramento degli insetti. Il trasporto in università per le analisi in laboratorio è stato fatto con una borsa frigo per mantenere le api nel miglior stato di conservazione.

Ho eseguito le analisi del secondo e terzo esperimento tramite un microscopio ottico sezionando ogni ape, tagliando le zampe e le ali con l'ausilio di pinzetta e forbici entomologiche; per ogni campione ho quindi contato tutti i frammenti di plastica visibili al microscopio, ho poi sistemato i dati in un file Excel riportando la parte dell'insetto e la quantità di particelle rilevate. Con il programma "Leica" del microscopio sono riuscito a scattare foto che ritraggono in dettaglio la contaminazione degli insetti.

#### 1.4 Microplastiche

Come precedentemente affermato le microplastiche prese in considerazione sono state di tre tipologie:

- Polipropilene (PP);
- Polivinilcloruro (PVC);
- Polistirene (PS).

I tre polimeri sono stati utilizzati sotto forma di frammenti sminuzzati. Le dimensioni e il peso degli stessi varia a seconda della loro struttura chimica.

PP ha una dimensione media delle particelle di 1,09 mm – 190 µm, PVC di 100-50 µm e PS di 1 mm – 500 µm.

Il polipropilene è un polimero semicristallino caratterizzato da un elevato carico di rottura, una bassa densità, una buona resistenza termica e all'abrasione.

Il polivinilcloruro è il polimero del cloruro di vinile, un materiale rigido che deve la sua versatilità applicativa alla possibilità di essere miscelato anche in proporzioni elevate a composti inorganici e a prodotti plastificanti, che lo rendono flessibile e modellabile.

Il polistirene è il polimero dello stirene; a temperatura ambiente è un solido vetroso; al di sopra della sua temperatura di transizione vetrosa, circa 100 °C, acquisisce plasticità e diventa fluido. La sua forma espansa si presenta in forma di schiuma bianca leggera, spesso modellata in sferette o chips, e viene usato per l'imballaggio e l'isolamento.

## Capitolo 2

### RISULTATI E CONSIDERAZIONI

Le api campionate durante i due esperimenti sono state portate in laboratorio e, tramite una scrupolosa osservazione al microscopio ottico, sono stati ricavati i dati relativi al numero di microplastiche depositate sopra gli insetti.

#### 2.1 Forza elettrostatica

Nel primo esperimento i frammenti aderiscono al corpo dell'insetto solamente grazie all'interazione elettrostatica creatasi tra l'organismo e il letto di plastica sminuzzata sottostante (Figura 6).



Figura 6. Tre api stanno volando dentro il cubo, una di esse è in hovering sopra i frammenti plastici

I risultati del conteggio dei residui presenti nel primo test sono elencati nelle tabelle 1, 2, 3 e 4.

Tabella 1. Numero totale di microplastiche presenti nel corpo delle api

	PP	PVC	PS
Ape 1	16	17	1

<b>Ape 2</b>	2	57	2
<b>Ape 3</b>	10	5	1
<b>Ape 4</b>	1	50	13
<b>Ape 5</b>	3	12	9
<b>Ape 6</b>	7	38	3
<b>Ape 7</b>	3	19	32
<i>Media</i>	6	28,3	8,7

Tabella 2. Numero di microplastiche presenti nelle api contaminate con PP, divise in base alla zona del corpo

<b>PP</b>	<b>Zampe</b>	<b>Ali</b>	<b>Addome+Torace</b>	<b>Testa</b>	<b>Petri</b>	<b>Totale</b>
<b>Ape 1</b>	4	1	9	1	1	16
<b>Ape 2</b>	0	1	1	0	0	2
<b>Ape 3</b>	7	2	1	0	0	10
<b>Ape 4</b>	1	0	0	0	0	1
<b>Ape 5</b>	3	0	0	0	0	3
<b>Ape 6</b>	3	0	2	2	0	7
<b>Ape 7</b>	3	0	0	0	0	3

Tabella 3. Numero di microplastiche presenti nelle api contaminate con PVC, divise in base alla zona del corpo

<b>PVC</b>	<b>Zampe</b>	<b>Ali</b>	<b>Addome+Torace</b>	<b>Testa</b>	<b>Petri</b>	<b>Totale</b>
<b>Ape 1</b>	10	0	6	1	0	17
<b>Ape 2</b>	8	1	15	1	32	57
<b>Ape 3</b>	2	0	0	0	3	5
<b>Ape 4</b>	37	8	5	0	0	50
<b>Ape 5</b>	8	0	3	0	1	12
<b>Ape 6</b>	34	2	0	0	2	38
<b>Ape 7</b>	15	0	2	0	2	19

Tabella 4. Numero di microplastiche presenti nelle api contaminate con PS, divise in base alla zona del corpo

<b>PS</b>	<b>Zampe</b>	<b>Ali</b>	<b>Addome+Torace</b>	<b>Testa</b>	<b>Petri</b>	<b>Totale</b>
<b>Ape 1</b>	0	0	1	0	0	1
<b>Ape 2</b>	2	0	0	0	0	2
<b>Ape 3</b>	0	0	0	1	0	1

<b>Ape 4</b>	12	0	1	0	0	13
<b>Ape 5</b>	9	0	0	0	0	9
<b>Ape 6</b>	3	0	0	0	0	3
<b>Ape 7</b>	5	0	27	0	0	32

Gli stessi dati sono poi stati elaborati tramite il programma Excel eseguendo il test ANOVA per analizzare la variabilità dei dati in relazione al tipo di particella considerata. Con questo tipo di calcoli è successivamente stato anche possibile studiare la variabilità dei numeri di frammenti rilevati in base alla zona dell'insetto interessata dalla contaminazione. Questo genere di analisi numerica si utilizza per verificare la diversità tra le medie di gruppi e quanto la suddivisione in questi gruppi possa spiegare la variabilità di un carattere. Lo scopo finale è riassumibile in due obiettivi principali: il primo è quello di capire se le medie di gruppi distinti possano o meno essere considerate uguali, il secondo è individuare quanta parte della variabilità di un certo carattere possa essere spiegata attraverso la suddivisione delle unità statistiche in questi gruppi.

Prendendo in esame la prima tabella possiamo notare come la varianza cambi considerevolmente a seconda del tipo di microplastica considerato. Per PP<sup>1</sup> la varianza è bassa, aumenta per PS<sup>2</sup> e invece raggiunge livelli molto alti per PVC<sup>3</sup>. La ragione che si trova alla base di questo fatto potrebbe essere spiegata dalla diversa volatilità dei tre tipi di particelle. Il PVC è il polimero che riesce a contaminare maggiormente le api, nelle quali le zone più soggette ad inquinamento sono le zampe (Figure 7, 8, 9), poi a seguire la piastra Petri (Figure 12, 19, 22, 23, 24), il corpo dell'insetto (Figure 10 e 20), le ali ed infine la testa (Figura 11). Le zampe per la loro morfologia tendono a trattenere i frammenti, in particolare quelle metatoraciche, nelle parti corrispondenti alla tibia, sia nella parte interna sia nella parte esterna in corrispondenza della corbicula, una lieve concavità marginata da forti e lunghi peli incurvati, dove l'ape accumula il polline per trasportarlo nell'alveare, e al basitarso, soprattutto nel lato interno dove sono presenti delle spazzole di peli corti e rigidi.

---

<sup>1</sup> Polipropilene

<sup>2</sup> Polistirene

<sup>3</sup> Polivinilcloruro



Figura 7. Tibia di zampa metatoracica contaminata da PVC



Figura 8. Basitarso di zampa metatoracica contaminato da PVC



Figura 9 Basitarso di zampa protoracica contaminato da PVC



Figura 10. Addome di *Apis mellifera* contaminato da PVC



Figura 11. Capo di *Apis mellifera* contaminato da PVC

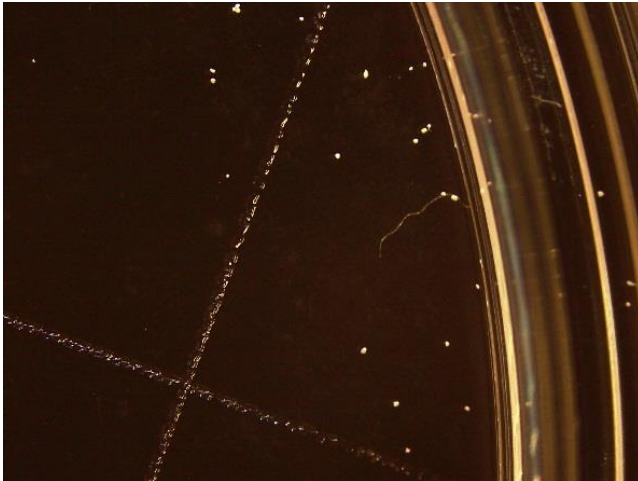


Figura 12. Piastra Petri con svariati frammenti di PVC sulla superficie interna

Possiamo osservare che, discriminando tra i valori numerici che descrivono il livello di contaminazione delle diverse parti del corpo delle api esaminate, le zampe risultano sempre le zone nelle quali sono stati registrati i valori più importanti (Figure 17, 18, 19). Il motivo potrebbe ricercarsi sia nella già citata morfologia, sia nel fatto che durante il volo esse siano la zona più vicina al letto di microplastiche che sottostava agli insetti. La seconda zona risulta essere il corpo (comprensivo di addome e torace).

Nei grafici sottostanti viene riproposta schematicamente la situazione riassuntiva dell'esperimento precedentemente descritto (Figure 13, 14, 15, 16).

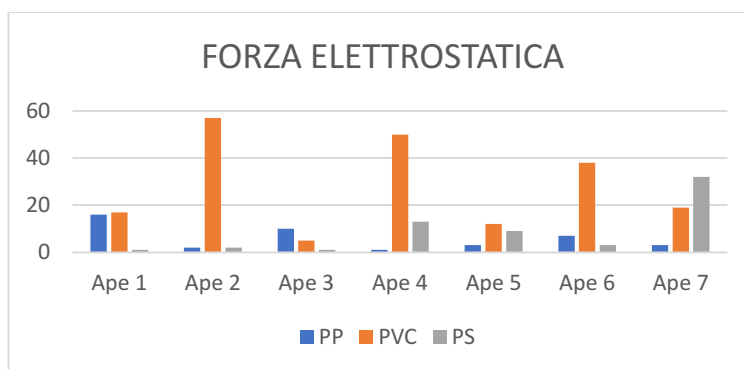


Figura 13. Microplastiche adese al corpo delle api per forza elettrostatica



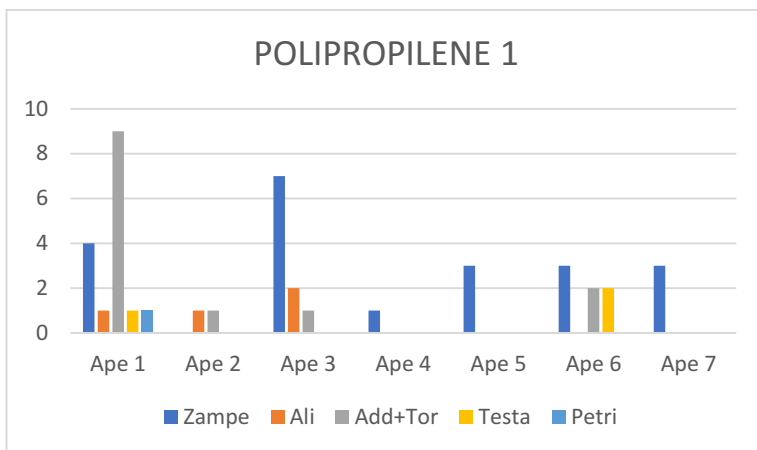


Figura 14. Grafico riassuntivo del esperimento 1 relativo a PP

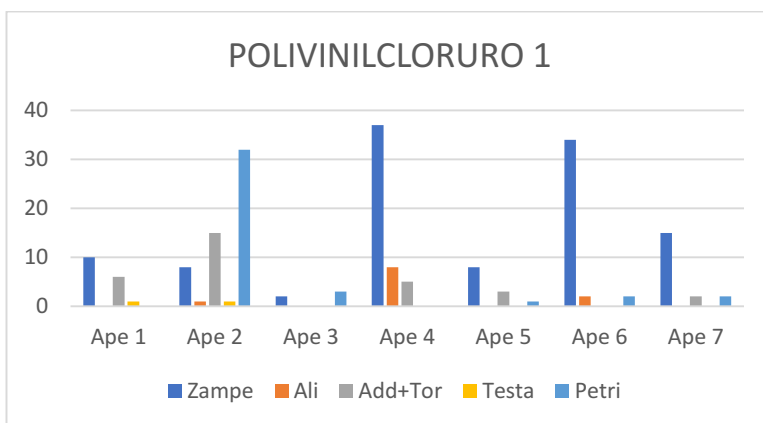


Figura 15. Grafico riassuntivo dell'esperimento 1 relativo a PVC

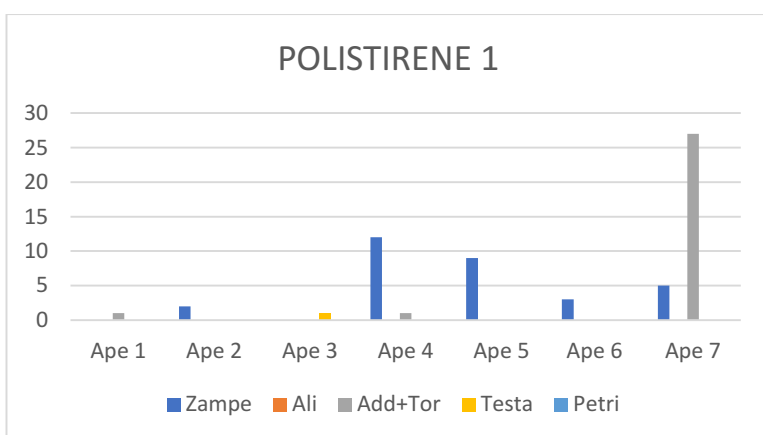


Figura 16. Grafico riassuntivo dell'esperimento 1 relativo a PS

## 2.2 Contatto

Le stesse analisi statistiche sono state condotte per il secondo esperimento, ossia quello nel quale la contaminazione risultava il frutto della forza elettrostatica unita al contatto con l'inquinante.

I risultati del conteggio dei residui presenti nel primo test sono elencati nelle tabelle 5, 6, 7 e 8.

Tabella 5. Numero totale di microplastiche presenti nel corpo delle api

	<b>PP</b>	<b>PVC</b>	<b>PS</b>
<b>Ape 1</b>	2	86	54
<b>Ape 2</b>	25	98	108
<b>Ape 3</b>	23	112	45
<b>Ape 4</b>	16	175	20
<b>Ape 5</b>	44	130	12
<b>Ape 6</b>	39	352	20
<b>Ape 7</b>	3	127	5
<i>Media</i>	<i>21,7</i>	<i>154,2</i>	<i>37,7</i>

Tabella 6. Numero di microplastiche presenti nelle api contaminate con PP, divise in base alla zona del corpo

<b>PP</b>	<b>Zampe</b>	<b>Ali</b>	<b>Addome+Torace</b>	<b>Testa</b>	<b>Petri</b>	<b>Totale</b>
<b>Ape 1</b>	1	0	1	0	0	2
<b>Ape 2</b>	21	0	1	1	2	25
<b>Ape 3</b>	12	0	6	2	3	23
<b>Ape 4</b>	15	0	1	0	0	16
<b>Ape 5</b>	23	2	0	0	19	44
<b>Ape 6</b>	1	5	9	4	20	39
<b>Ape 7</b>	2	0	0	0	1	3

Tabella 7. Numero di microplastiche presenti nelle api contaminate con PVC, divise in base alla zona del corpo

<b>PVC</b>	<b>Zampe</b>	<b>Ali</b>	<b>Addome+Torace</b>	<b>Testa</b>	<b>Petri</b>	<b>Totale</b>
<b>Ape 1</b>	63	6	2	3	12	86
<b>Ape 2</b>	70	0	8	4	16	98
<b>Ape 3</b>	77	1	13	4	17	112

<b>Ape 4</b>	94	0	11	4	66	175
<b>Ape 5</b>	73	9	47	1	0	130
<b>Ape 6</b>	231	9	52	24	36	352
<b>Ape 7</b>	81	17	18	0	11	127

Tabella 8. Numero di microplastiche presenti nelle api contaminate con PS, divise in base alla zona del corpo

<b>PS</b>	<b>Zampe</b>	<b>Ali</b>	<b>Addome+Torace</b>	<b>Testa</b>	<b>Petri</b>	<b>Totale</b>
<b>Ape 1</b>	37	2	2	0	13	54
<b>Ape 2</b>	53	10	12	1	32	108
<b>Ape 3</b>	30	1	7	0	7	45
<b>Ape 4</b>	16	0	2	0	2	20
<b>Ape 5</b>	0	0	5	7	0	12
<b>Ape 6</b>	16	0	0	3	1	20
<b>Ape 7</b>	4	0	1	0	0	5

Dall'osservazione nei dati raccolti già si può notare, come d'altronde ci si poteva aspettare, che le tre microplastiche mantengono le precedenti capacità di inquinamento dei campioni, conservando le proporzioni relative all'esperimento precedente. Il PVC si riconferma il polimero con la capacità contaminante maggiore (Figura 17), per secondo vi è PS (Figure 20, 21, 23, 24) e terzo PP (Figura 22).



Figura 17. Zampa metatoracica con frammenti di PVC presenti in tutte le sue parti



Figura 18. Zampa metatoracica la cui cestella del polline risulta contaminata da PS



Figura 19. Frammento di PS ritrovato nella piastra Petri



Figura 20. Addome contaminato da PS



Figura 21. Ala di *Apis mellifera* con frammento di PS

Le quantità rilevate sono altresì maggiori di quelle relative alle api della prova della forza elettrostatica senza contatto. Utilizzando le tabelle in alto ho eseguito di nuovo il test ANOVA. Le zampe si riconfermano la zona maggiormente soggetta a contaminazione, anche perché in questo caso gli insetti atterrano sul letto di microplastiche, entrando così in diretto contatto con l'inquinante. La piastra Petri, rispetto al precedente esperimento, risulta più inquinata; le api quindi tendono a disperdere le particelle inquinanti da esse trasportate.



Figura 22. Particella di PP ritrovata sulla superficie interna della piastra Petri

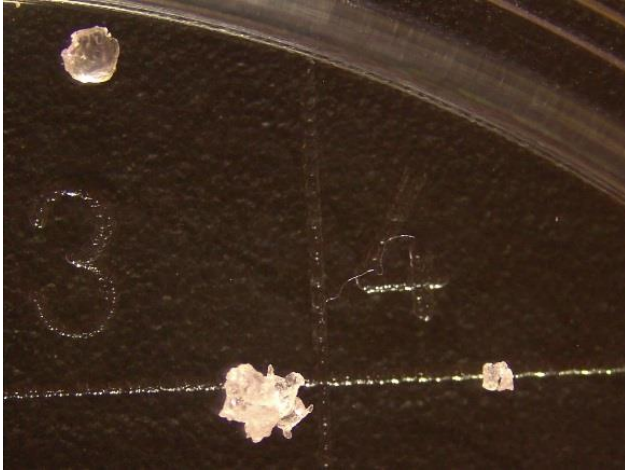


Figura 23. Particella di PS ritrovata sulla superficie interna della piastra Petri



Figura 24. Frammento di PS di notevoli dimensioni trovato nella piastra Petri accanto a zampa metatoracica

Un'ipotesi verosimile che giustificerebbe la maggiore dispersione di microplastiche nella Petri, oltre ovviamente alla maggiore esposizione degli insetti per via del contatto, sarebbe il fatto che la forza elettrostatica, finito l'effetto della carica, tenderebbe al far distaccare i frammenti, lasciandoli cadere sulla superficie del contenitore. Potrebbero essere proprio queste le particelle plastiche che, rimanendo facilmente adese al corpo degli insetti, vanno ad inquinare le matrici all'interno dell'alveare. Per quanto riguarda il test ANOVA relativo al secondo esperimento possiamo dire che le medie del totale di particelle ritrovate in ciascuna ape sono più elevate, le api sono quindi complessivamente più esposte all'inquinante. La varianza è molto elevata nel caso del PVC, diminuisce per PS e diventa considerevolmente bassa per PP. Ciò sta a significare che la variabilità del livello di inquinamento per il PVC è molto alta, probabilmente questo fatto è dovuto alla capacità adesiva del polimero al corpo

dell'insetto, che porta le particelle ad aderire in quantità elevatissima anche solo volando leggermente più in basso, e quindi vicino, al letto di frammenti sistemato durante l'esperimento. PP invece potrebbe rappresentare l'effetto opposto, ossia un polimero avente frammenti più "pesanti" o comunque diversamente volatili rispetto al PVC, che quindi tende ad inquinare i campioni in maniera più omogenea e costante, senza risentire troppo delle variabili in gioco che si presentano durante il volo delle api sopra i frammenti.

Nei grafici sottostanti (Figure 25, 26, 27 e 28) viene riproposta schematicamente la situazione riassuntiva dell'esperimento precedentemente descritto.

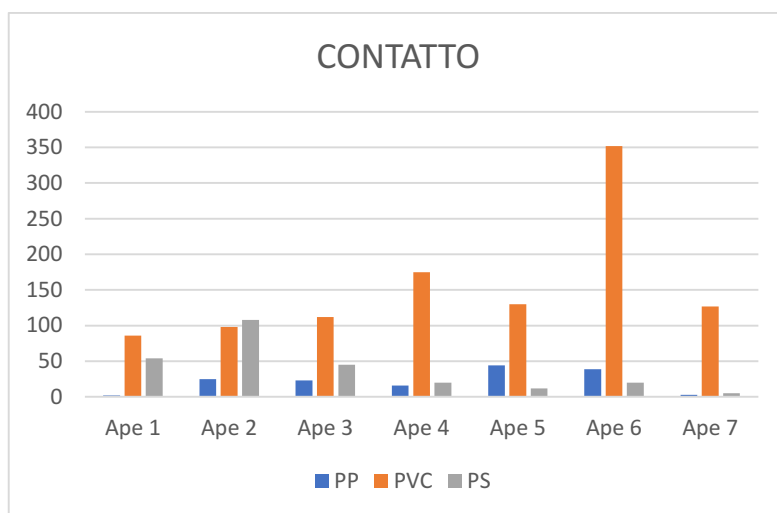


Figura 25. Grafico riassuntivo dell'esperimento 2

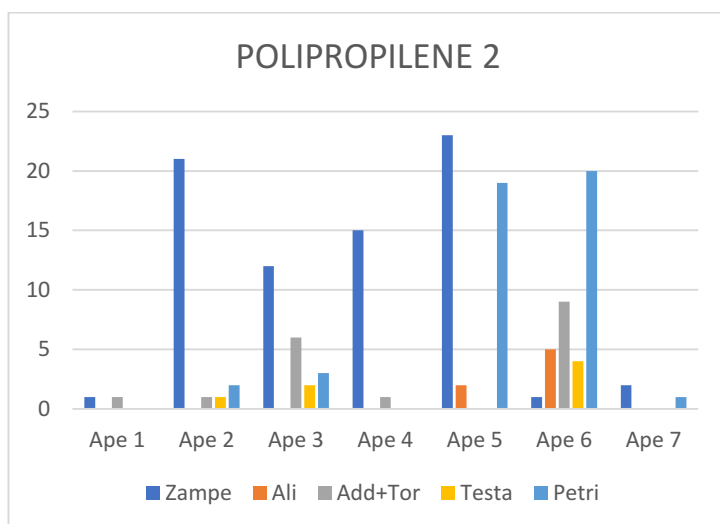


Figura 26. Grafico riassuntivo dell'esperimento 2 relativo a PP

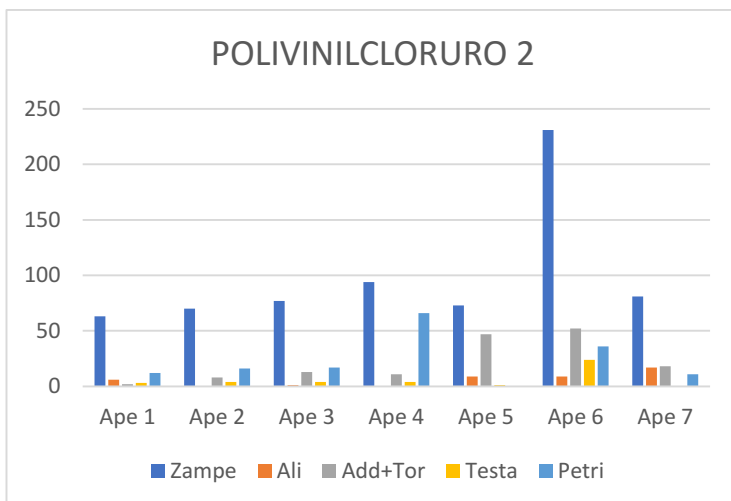


Figura 27. Grafico riassuntivo dell'esperimento 2 relativo a PVC

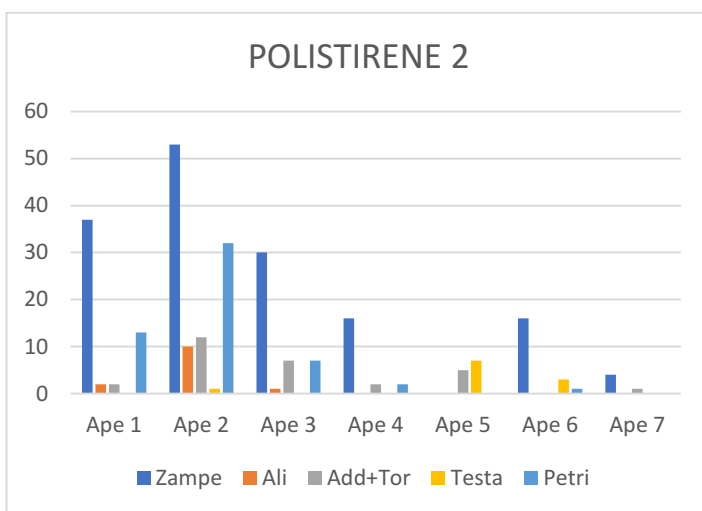


Figura 28. Grafico riassuntivo dell'esperimento 2 relativo a PS



## CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati ottenuti è stato dimostrato il fatto che *Apis mellifera* possa essere considerato un valido bioindicatore per la presenza di microplastiche presenti nell'ambiente. La contaminazione, come abbiamo verificato, può avvenire sia a seguito del contatto con i polimeri, ma anche per vicinanza attraverso la forza derivante dall'interazione elettrostatica tra l'insetto e i frammenti plastici. Il livello di adesività, e di conseguenza di contaminazione, cambia abbastanza considerevolmente a seconda della circostanza e del polimero. Nell'esperimento riguardante la forza elettrostatica si è rilevato nelle api campionate un grado di presenza di microplastiche generalmente minore rispetto a quello rilevato nell'esperimento del contatto; il motivo è facilmente individuabile nel fatto che la prova del contatto con l'inquinante comporta che la quantità di frammenti individuati negli insetti campione risulti una sommatoria degli effetti attrattivi della forza elettrostatica con quelli derivanti dal fatto che le api venivano fatte atterrare sopra la Petri contaminata.

I nostri dati, osservati ed analizzati complessivamente, potrebbero avere implicazioni per la pratica e la ricerca futura nel campo del biomonitoraggio di microplastiche tramite *Apis mellifera*. Secondo quanto riportato dalle tabelle e dagli schemi, partendo da una quantità identica di inquinante, il rapporto tra grado di esposizione al polimero e grado di inquinamento rilevato non è costante. Andando nello specifico si può notare come il PVC rimanga notevolmente più adeso rispetto al PS, e come lo stesso PS sia più presente nei campioni rispetto a PP. Inoltre, i rapporti tra le medie delle particelle totali ritrovate in ogni singola ape per tipologia di polimero restano simili, sia nella prova di forza elettrostatica, sia in quella del contatto. Questo scenario lascia aperte varie ricerche future e varie ipotesi; una tra tutte potrebbe essere quella che, partendo dal presupposto che non tutti i polimeri sono rappresentati alla stessa maniera dai bioindicatori, si possa risalire al grado di inquinamento di un determinato areale misurando il livello di contaminazione degli insetti e contestualizzando il dato alla luce del rapporto tra l'inquinante presente realmente nell'ambiente e il suo potenziale di adesività agli organismi campionati. In particolare nel caso di PP, la sua capacità di aderire alle api è molto minore rispetto a quella di PVC, dunque se si dovessero ritrovare due insetti appartenenti alla specie *Apis mellifera* in natura, aventi attaccati al loro corpo lo stesso numero

di particelle di plastica, una con solo PP ed una con solo PVC, allora potremmo teoricamente dedurre che la presenza nell'ambiente di PP sarebbe di gran lunga superiore di quella di PVC, proprio perché la rappresentatività di quest'ultimo in questo tipo di biomonitoraggio sarebbe considerevolmente superiore a quella di PP.

Nel complesso l'insetto si conferma una valida sentinella per le microplastiche, in particolare per la sua capacità di esplorazione e per il fatto che, caricandosi elettricamente durante il volo (Altmann & Warnke , 1979), riesca ad "attirare" a sé i frammenti senza necessariamente dovervi venire in contatto. Tuttavia, per la sua natura e morfologia da impollinatore, qualora dovesse toccare delle microplastiche, i peli piumosi o le zampe oppure qualsiasi altra parte del suo corpo riuscirebbero probabilmente a trattenere i frammenti, proprio come avviene per i granelli di polline in natura.

Alla luce di quanto detto possiamo concludere dicendo che la mano dell'uomo lascia il proprio segno anche dove l'occhio umano fatica ad arrivare; con le microplastiche in particolare vengono contaminati ambienti caratterizzati da dimensioni infinitesimali, tuttavia, gli insetti impollinatori e, nel caso del nostro studio, *Apis mellifera*, attraverso la meticolosità del suo operare, può fungere per noi studiosi da cartina tornasole della salute dell'ecosistema, aiutandoci in tal modo a comprendere il grado di contaminazione dell'ambiente in cui essa vive.

## BIBLIOGRAFIA

- Altmann, G. & Warnke , U., 1979. Effects of electric environmental factors on the behaviour of encaged honey bees. *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz*.
- Anon., s.d. *Apis mellifera*. *Wikipedia*.
- Ballesteros, I. et al., 2020. Co-option of Neutrophil Fates by Tissue Environments. *Cell*.
- Bonardo, L., 2022. Danzare per comunicare: il linguaggio delle api. *Geopop*.
- Boots, B., William Russell, C. & Senga Green, D., 2019. Effects of Microplastics in Soil Ecosystems: Above and Below Ground. *Environmental Science & Technology*.
- Brahney, J. et al., 2020. Plastic rain in protected areas of the United States. *Science*.
- C. Rillig, M., de Souza Machado, A. A., Lehmann, . A. & Klümper, U., 2018. Evolutionary implications of microplastics for soil biota. *Environmental Chemistry*.
- Carr, C. E., Heiligenberg, W. & Rose, G. J., 1986. A time-comparison circuit in the electric fish midbrain. I. Behavior and physiology. *Journal of Neuroscience*.
- Chae, Y. & Youn-Joo , A., 2018. Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem. *Environmental Pollution*.
- Clarke , D., Whitney, H., Sutton, G. & Daniel, R., 2013. Detection and Learning of Floral Electric Fields by Bumblebees. *Science*.
- Cox , K. et al., 2019. Human Consumption of Microplastics. *Environmental Science & Technology*.
- Davodpour, R. et al., 2019. Honeybees (*Apis mellifera* L.) as a Potential Bioindicator for Detection of Toxic and Essential Elements in the Environment (Case Study: Markazi Province, Iran). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.
- De Falco, F., Di Pace, E. & Cocca, M., 2019. The contribution of washing processes of synthetic clothes to microplastic pollution. *Scientific Reports*, Issue 6633.

- Edo, C. et al., s.d. Honeybees as active samplers for microplastics. *Science of The Total Environment*.
- Greggers, U. et al., 2013. Reception and learning of electric fields in bees. *Proceedings of the Royal Society B*.
- Gregory, J. E., Iggo, A., McIntyre, A. K. & Proske, U., 1989. Responses of electroreceptors in the platypus bill to steady and alternating potentials.. *The Journal of Physiology*.
- Honig, B. & Nicholls, A., 1995. Classical Electrostatics in Biology and Chemistry. *Science*.
- Kalmijn, A., 1971. The electric sense of sharks and rays. *Journal of Experimental Biology*.
- Kedzierski, M. et al., 2020. Microplastic contamination of packaged meat: Occurrence and associated risks. *Food Packaging and Shelf Life*.
- Mai , L., Zeng, E. & Y. Zeng, E., 2022. Dog poop bags: A non-negligible source of plastic pollution. *Environmental Pollution*.
- Qiu , Q. et al., 2016. Extraction, enumeration and identification methods for monitoring microplastics in the environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*.
- S. Galloway, T., Cole, M. & Ceri, L., 2017. Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nature Ecology & Evolution volume*, Issue 0116.
- Sendra , M. et al., 2020. Nanoplastics: From tissue accumulation to cell translocation into *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. resilience of immune cells exposed to nanoplastics and nanoplastics plus *Vibrio splendidus* combination. *Journal of Hazardous Materials*.
- Whitacre, B., Gallardo, R. & Strover, S., 2014. Broadband's contribution to economic growth in rural areas: Moving towards a causal relationship. *Telecommunications Policy*.
- Zhang, F., Zhang, W., Qi, J. & Li , F.-M., 2018. A regional evaluation of plastic film mulching for improving crop yields on the Loess Plateau of China. *Agricultural and Forest Meteorology*.
- Zhu, Y. et al., 2019. Hierarchical hexachiral auxetics for large elasto-plastic deformation. *Materials Research Express*.