



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

VALUTAZIONE DELLA
DISINTEGRABILITÀ DI UN
BIOPACKAGING E DELL'ECOTOSSICITÀ
DEI SUOI PRODOTTI DI COMPOSTAGGIO
SU *EISENIA FETIDA*

Disintegrability evaluation of a biopackaging and the
ecotoxicity of its composting products on *Eisenia fetida*

TIPO TESI: Sperimentale

Studente:
GIULIA GRASSI

Relatore:
PROF. COSTANTINO VISCHETTI

Correlatore:
DOTT.SSA ARIANNA DE BERNARDI

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

SOMMARIO

SOMMARIO	3
ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ELENCO DELLE FIGURE	6
SCOPO DELLA TESI.....	8
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE.....	9
1.1 Le bioplastiche.....	9
1.1.1 Inquinamento da plastica e soluzioni ecosostenibili.....	9
1.1.2 Il mondo delle bioplastiche.....	18
1.1.3 Bio-packaging.....	22
1.1.4 Norma tecnica UNI EN 13432:2002.....	24
1.2 Il compost.....	25
1.3 Ecotossicologia	31
1.4 Lombrichi.....	33
1.4.1 <i>Eisenia fetida</i>	35
CAPITOLO 2 MATERIALI E METODI	36
2.1 Bio-packaging.....	36
2.2 Compost.....	37
2.3 Disegno sperimentale e analisi.....	37
2.4 Analisi del compost.....	39
2.4.1 Determinazione della sostanza organica.....	39
2.4.2 Determinazione del pH.....	40
2.4.3 Determinazione del contenuto di metalli e microelementi	40
2.5 Test ecotossicologici con <i>Eisenia fetida</i>	41
2.5.1 Avoidance test.....	41
2.5.2 Test di riproduzione	42
2.5.3 Comet assay	43
2.6 Analisi statistica	46

CAPITOLO 3 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	47
3.1 Test di compostaggio e disintegrazione bioplastica.....	47
3.2 Analisi del compost.....	48
3.3 Avoidance test.....	50
3.4 Test di riproduzione	50
3.5 Comet assay	54
CONCLUSIONI	56
RINGRAZIAMENTI	56
BIBLIOGRAFIA	58
SITOGRAFIA	72

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1-1: Ammendante compostato misto	29
Tabella 1-2: Limiti metalli pesanti ammendanti	29
Tabella 2-1: Disegno sperimentale del test e della quantità di materiali in ogni sacca.....	37
Tabella 3-1: Valori di disintegrazione misurati per ciascuna prova ad ogni tempo di campionamento	47
Tabella 3-2: Analisi degli elementi nel compost al termine del processo di compostaggio	48
Tabella 3-3: Contenuto di sostanza organica (%) del compost nei diversi trattamenti.....	48
Tabella 3-4: Growth Rate dei lombrichi per ogni tesi a dopo 28 giorni di esposizione.....	50

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1: Struttura di un monomero (propilene) e del suo corrispettivo polimero (polipropilene).....	9
Figura 1-2: Alcuni esempi di polimeri con le relative strutture di base.....	10
Figura 1-3: Classificazione bioplastiche.....	21
Figura 1-4: Capacità di produzione globale di bioplastiche 2022-2027.....	23
Figura 1-5: Produzione di bioplastiche nel 2022 divisa per segmenti di mercato.....	23
Figura 1-6: Processo di compostaggio.....	25
Figura 2-1: Bio-packaging di partenza da testare.....	36
Figura 2-2: Materiale da testare sminuzzato per la prova di compostaggio.....	36
Figura 2-3: Sacche di prova e costruzione del cumulo di compostaggio.....	37
Figura 2-4: Disegno sperimentale del cumulo per il processo di compostaggio.....	38
Figura 2-5: Differenza di colorazione tra campione con bicromato in eccesso e difenilammina (viola) e campione con sale di Mohr (verde).....	40
Figura 2-6: Campioni posizionati nel bagno d'acqua durante la prova.....	41
Figura 2-7: Lombrico immerso nella soluzione di estrusione.....	44
Figura 2-8: Conta delle cellule al microscopio.....	44
Figura 2-9: Cellule da testare stratificate su vetrini pre-rivestiti con agarosio.....	45
Figura 2-10: Parametri valutati con il Comet assay.....	46
Figura 3-1: Temperature registrate in ogni strato del cumulo dall'inizio (27 aprile) alla fine (20 luglio) del compostaggio.....	47
Figura 3-2: Valori di pH in CaCl_2 del compost bianco (B) e del compost con il 2 % (2) e 6% (6) di bio-packaging a fine processo di compostaggio.....	49
Figura 3-3: Pesi medi dei lombrichi per ogni tesi.....	51
Figura 3-4: Cocooni rilevati dalla prova di riproduzione a 56 giorni.....	52
Figura 3-5: Giovani rilevati dalla prova di riproduzione a 56 giorni.....	52
Figura 3-6: Valori di schiusura o fertilità rilevati dalla prova di riproduzione a 56 giorni.....	53
Figura 3-7: Totale dei cocooni rinvenuti a 56 giorni nei vari trattamenti.....	54

Figura 3-8: Tail Length misurata nei celomociti dei lombrichi da ciascun trattamento dopo 28 giorni di esposizione 55

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi è stato quello di valutare la disintegrazione di un *bio-packaging* ideato per il trasporto di bottiglie di vino e costituito da paglia compressa rivestita da un film multistrato di differenti polimeri *bio-based*. La disintegrazione è stata testata applicando il protocollo UNI EN 13432:2002 che prevede l'utilizzo di un compost in prove con il *bio-packaging* sminuzzato e triturato a dimensioni comprese tra 2 e 5 cm.

Alla fine della prova è stata valutata anche l'ecotossicità, sia del compost sia delle particelle di bioplastica risultanti dalla disintegrazione, nei confronti dell'organismo test *Eisenia fetida* in prove di laboratorio con un terreno controllo a differenti dosi sia di *bio-packaging* (particelle > 2 mm) sia di compost. Le prove hanno riguardato la riproduzione del verme terricolo sia nel controllo che addizionato di *bio-packaging* e/o di compost a differenti dosi, misurando il numero di *cocoons* e di giovani ed anche la schiudibilità o fertilità.

Sono stati valutati infine i danni al DNA degli stessi organismi applicando la tecnica del Comet assay (Test della cometa) che rileva i danni in termini di lunghezza e intensità della coda generata da filamenti di DNA danneggiati.

Capitolo 1 INTRODUZIONE

1.1 Le bioplastiche

1.1.1 Inquinamento da plastica e soluzioni ecosostenibili

L'inquinamento da plastica rappresenta una delle interferenze umane più impattanti, diffuse e durature del nostro pianeta (Barnes et al., 2009), tanto da essere proposto come indicatore geologico chiave dell'Antropocene (Zalasiewicz et al., 2016).

Grazie alla loro resistenza, malleabilità, versatilità e bassi costi, i polimeri plastici sono utilizzati per numerose applicazioni scientifiche e tecnologiche (Andrady and Neal, 2009; Thompson et al., 2009), soprattutto negli imballaggi e nel settore edile (Geyer et al., 2017).

L'Unione Internazionale di Chimica Pura e Applicata (IUPAC) afferma che, utilizzando il termine plastiche, si fa riferimento a un materiale polimerico che può contenere altre sostanze per migliorare la loro performance e/o ridurre i costi (Chang et al., 2020).

Un polimero (dal greco poly- e -meros, letteralmente "che ha molte parti") è una macromolecola, ovvero una molecola dall'elevato peso molecolare, costituita da molte unità strutturali ripetute unite da un legame covalente.

Possiamo distinguere polimeri inorganici e organici, entrambi possono essere naturali o sintetici, questi ultimi creati in laboratorio (Saunders, 2012).

Esempi di polimeri organici naturali sono la cellulosa, la seta, il caucciù e il DNA (Geyer, 2020), mentre tra quelli organici sintetici troviamo proprio le materie plastiche, che derivano principalmente da idrocarburi ottenuti da petrolio greggio e gas naturale (Geyer et al., 2017).

I polimeri si formano attraverso la reazione di polimerizzazione, dove i reagenti sono rappresentati dai monomeri (Gedde, 1995).

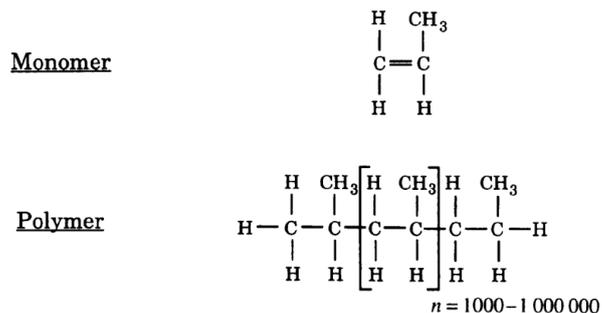


Figura 1-1: Struttura di un monomero (propilene) e del suo corrispettivo polimero (polipropilene).

Fonte: Gedde, 1995.

Il termine plastica deriva dal latino “plasticus” che a sua volta deriva dal greco “plastikos”, usato per descrivere qualcosa in grado di essere modellato o adattarsi in uno stampo. Questa terminologia era già in uso nel XVII secolo, molto prima che fu inventato il primo materiale plastico nel 1856, ovvero la Parkesina (PlasticsEurope, 2018). Nel 1907 venne prodotto il primo vero polimero sintetico, ovvero la bachelite, ma la prima plastica moderna fu il polivinilcloruro (PVC), che è stato reso utilizzabile negli anni Venti miscelandolo con additivi per migliorarne la plasticità (Geyer, 2020).

Oggi utilizziamo il termine plastiche per descrivere una famiglia estremamente ampia di materiali molto diversi fra loro, ognuno con caratteristiche, proprietà e usi differenti.

Possiamo distinguere due categorie: materiali termoplastici e termoindurenti. I termoplastici fondono quando vengono riscaldati e induriscono quando vengono raffreddati. Questo processo mediante l’applicazione del calore è reversibile, il che rende questo gruppo di materie plastiche potenzialmente riciclabile. Come esempi abbiamo il polietilene (PE), polipropilene (PP), il PVC, polietilene tereftalato (PET), polistirene (PS) e poliammide (PA). I termoindurenti, invece, subiscono un cambiamento chimico quando vengono riscaldati formando una rete tridimensionale irreversibile. Di conseguenza non possono essere rifusi e riformati, il che è un grosso problema in termini di riciclabilità. Alcuni esempi di termoindurenti sono i poliuretani (PUR), il poliesteri insaturo, il silicone, il vinilestere e le resine acriliche (Geyer, 2020; PlasticsEurope, 2018).

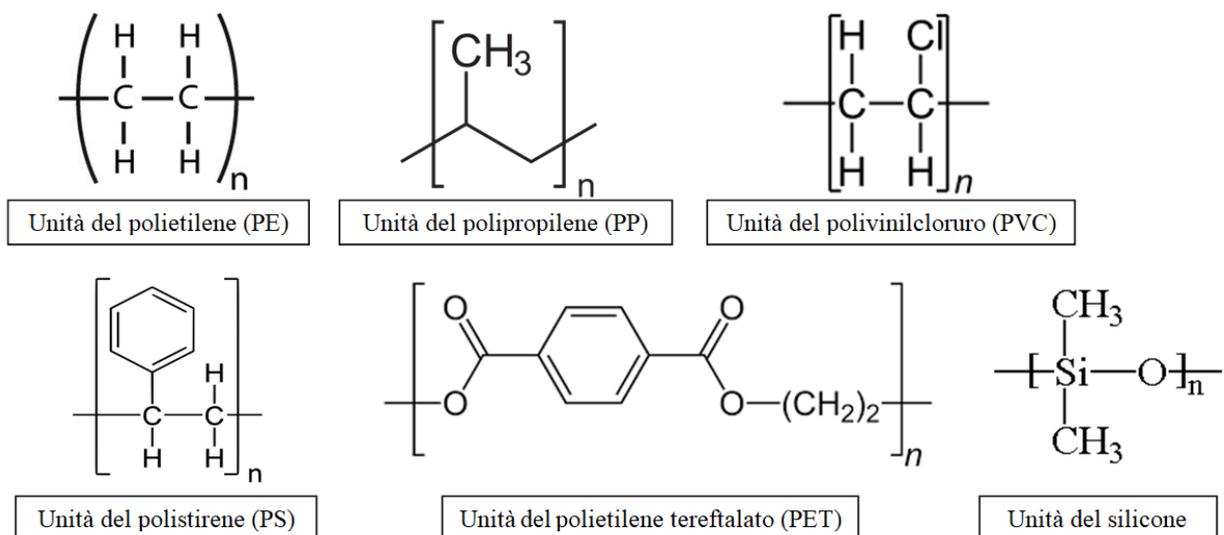


Figura 1-2: Alcuni esempi di polimeri con le relative strutture di base.

Fonte: Materie plastiche wikipedia https://it.wikipedia.org/wiki/Materie_plastiche

Sebbene abbiano incominciato a svilupparsi commercialmente negli anni Trenta, la produzione in larga scala di polimeri organici sintetici iniziò realmente solo nel 1950. Da allora sono cresciuti rapidamente fino a superare la produzione di tutti gli altri materiali sintetici ad eccezione di quelli del settore edile.

Si stima che dal 1950 al 2015 nel mondo siano state prodotte 6,3 miliardi di tonnellate di plastiche, di cui circa un 9% è stato riciclato, il 12% incenerito e il restante 79% depositato in discarica o rilasciato direttamente nell'ambiente naturale, come negli oceani e nel suolo (Geyer et al., 2017).

Essendo un materiale resistente alla corrosione, chimicamente stabile e di difficile degradazione, i rifiuti di plastica non correttamente gestiti possono impiegare anche più di 1000 anni per degradarsi completamente (Shen et al., 2019). Una volta che la plastica si accumula nell'ambiente, la sua frammentazione dà origine a particelle di dimensioni inferiori, andando a formare gradualmente microplastiche (5mm-100nm) e nanoplastiche (<100 nm) (Horton et al., 2017b), che vanno a rappresentare la maggiore minaccia ambientale.

Le piccole particelle di plastica che vengono sintetizzate dall'industria e si trovano nei prodotti di consumo come ad esempio nelle vernici, nei cosmetici e negli indumenti sintetici sono chiamate particelle di plastica primaria. Mentre le micro e nanoplastiche che derivano dalla rottura di detriti di plastica più grandi sono le particelle di plastica secondarie (Auta et al., 2017). Queste ultime sono predominanti, rappresentando l'80% del particolato totale di plastica presente nell'ambiente (Cole et al., 2011).

La degradazione può avvenire attraverso processi abiotici e biotici (Zhang K. et al., 2021). Tra i processi abiotici rientrano le forze meccaniche, la radiazione solare (fotodegradazione), il calore (degradazione termica), l'acqua (idrolisi) e l'ossigeno (foto ossidazione). La fotodegradazione, in particolare quella da radiazione ultravioletta, è un processo essenziale per degradare la maggior parte delle materie plastiche, che richiedono reazioni mediate dai radicali liberi e sono innescate dalla radiazione solare (Liu et al., 2019). Il radicale presente sulla catena polimerica poi reagisce con l'ossigeno per produrre un idroperossido, che continua a formare più radicali, catalizzando il processo (Ammala et al., 2011). Se la plastica fosse sepolta in sedimenti anossici, il tasso di degradazione sarebbe drasticamente ridotto: sia la luce UV che l'ossigeno sarebbero esclusi (Gabbott et al., 2020).

La biodegradazione avviene ad opera di macro e microrganismi per via fisica (mordendo, masticando e ingerendo il materiale) o per via enzimatica (Zhang K. et al., 2021). In quest'ultimo caso, gli enzimi extracellulari, attraverso una degradazione idrolitica e

ossidativa, provocano la scissione della catena polimerica, producendo polimeri a catena corta e piccoli frammenti molecolari come oligomeri, dimeri e monomeri. I piccoli prodotti di degradazione molecolare poi possono essere assorbiti e metabolizzati all'interno dei microrganismi (Chen et al., 2019). Alla fine, la plastica può essere mineralizzata in CO₂ e H₂O in condizioni aerobiche e in CH₄, CO₂, acidi organici, H₂O e NH₄ in condizioni anaerobiche, portando alla crescita della biomassa microbica. Tuttavia, la biodegradazione della plastica in condizioni anaerobiche è energeticamente sfavorevole rispetto a quella in condizioni aerobiche e può richiedere un tempo molto più lungo per la completa mineralizzazione (Gu 2003; Zhang K. et al., 2021).

Le micro e nanoplastiche sono state identificate come inquinanti ambientali ubiquitari, essendo largamente diffuse nell'ambiente acquatico, terrestre e anche nell'atmosfera (do Sul and Costa, 2014). Sono presenti anche in aree considerate poco o per nulla influenzate dall'uomo, come nelle profondità marine, nel ghiaccio del mare glaciale Artico e in remote isole disabitate (Lavers e Bond, 2017; Peeken et al., 2018; Van Cauwenberghe et al., 2013). Considerando che il 50% della popolazione globale risiede entro 31 km di costa (Small e Cohen, 2004), le zone costiere risultano essere fortemente urbanizzate e industrializzate e quindi è più probabile che contribuiscano in modo significativo all'input di plastica in questi ambienti, dove localmente a incidere sono soprattutto le attività ricreative e il turismo (Thushari, e Senevirathna, 2020).

Il rilascio di plastica nell'ambiente marino avviene attraverso diverse vie: una minima parte viene rilasciata direttamente in mare tramite attività quali l'acquacoltura, la navigazione e la pesca, mentre circa l'80% proviene dalla terra ferma (Andrady, 2011) dove si accumula nei corpi idrici, come fiumi e torrenti, per poi essere trasportata fino agli oceani (Lebreton et al., 2017). Uno studio ha stimato che solo nel 2010 tra le 4,8 e 12,7 milioni di tonnellate di plastica siano state scaricate in mare dai paesi costieri (Jambeck et al., 2015).

Una quota rilevante di micro e nanoplastiche fluviali deriva dai canali di scolo dei terreni agricoli o dalle acque reflue urbane (Horton et al., 2017a), che trasportano particelle provenienti, ad esempio, dalle fibre di lavaggio dei vestiti sintetici (Browne et al., 2011) e dai cosmetici (Napper et al., 2015), dall'usura degli pneumatici dei veicoli (Kole et al., 2017) e dai frammenti di vernici per la segnaletica orizzontale (Horton et al., 2017a).

Quindi gli oceani vengono considerati come il bacino finale di raccolta delle materie plastiche (Lebreton et al., 2017), poi trasportate su grandi distanze dai venti e dalle correnti oceaniche (Van Sebille et al., 2012).

Sono state documentate più di 690 specie faunistiche che si sono scontrate con i rifiuti presenti nell'ambiente marino, dove il 92% degli incontri è avvenuto proprio con le plastiche. Il loro impatto è stato ampiamente descritto in letteratura (Laist, 1997; Derraik, 2002), dove l'elevato numero di casi di intrappolamento e di ingestione di questo materiale fanno sì che rappresenti una seria minaccia della biodiversità di questo tipo di habitat. Uccelli, tartarughe marine e balene sono solo alcune delle specie a subirne le conseguenze. Ad esempio, potrebbero mangiare sacchetti di plastica scambiandoli per prede o rimanere imprigionate in reti da pesca e corde, con ripercussioni quali lacerazioni, ridotta capacità di movimento, di alimentazione e riproduttiva, fino nei casi più gravi la morte (Gall and Thompson, 2015).

L'ingestione di microplastiche risulta essere particolarmente insidiosa in quanto, dato le loro ridotte dimensioni, tutti gli organismi, di ogni livello di grandezza e con diverse strategie di alimentazione, possono assumerle (Carbery et al., 2018). Sono state riscontrate ad esempio nei mammiferi marini (Lusher et al., 2015), nei pesci (Lusher et al., 2013), nei crostacei (Murray e Cowie, 2011), nei bivalvi (Van Cauwenberghe e Janssen, 2014) e nello zooplancton (Cole et al., 2013), accumulandosi così lungo la catena alimentare (Wright et al., 2013). Quindi, nonostante il pesce sia una fonte riconosciuta di contaminanti per la dieta umana, la presenza di microplastiche non è stata ancora né quantificata né regolamentata (Ziccardi et al., 2016).

Anche le nanoplastiche potrebbero entrare nella catena trofica attraverso alghe e batteri o da organismi filtratori (Koelmans et al., 2015; Mattsson et al., 2018). Queste piccolissime particelle destano notevole preoccupazione in quanto sono in grado di permeare le membrane biologiche, influenzando il funzionamento della fotosintesi e delle cellule del sangue (Galloway, 2015). Attualmente non ci sono studi che riportano metodi analitici consolidati per rilevare le nano plastiche negli organismi marini o di acqua dolce, anche a causa dei limiti delle apparecchiature tecniche. Di conseguenza, la reale quantità di nano plastiche nell'ambiente rimane sconosciuta (Carbery et al., 2018).

Ci sono anche altri problemi che insorgono con l'assunzione dei frammenti plastici. Infatti, con la digestione vengono rilasciati gli additivi, che tendono ad accumularsi nel corpo degli organismi causando diversi effetti negativi. In aggiunta, in acqua sono presenti inquinanti organici persistenti che, essendo idrofobi, si vanno a concentrare sui rifiuti plastici, specialmente sulle microplastiche avendo un'alta superficie specifica, diventando così vettori di queste sostanze.

In entrambi i casi, queste sostanze tossiche una volta ingerite potrebbero provocare disturbi al sistema endocrino, avendo ripercussioni sulla mobilità, sullo sviluppo e riproduzione, e anche sulla carcinogenesi (Andrady, 2011; Cole et al., 2011; LI et al., 2016).

Numerosi studi si sono focalizzati sull'inquinamento che infetta l'ambiente marino; le conoscenze, invece, riguardo la presenza e gli effetti della plastica nel suolo sono ancora scarse.

Le fonti di micro e nano plastiche presenti nel suolo agrario sono molteplici: possono essere introdotte sia direttamente con le pratiche colturali, attraverso l'irrigazione con acque reflue e l'ammendamento con compost o fanghi di depurazione, sia indirettamente con la degradazione dei teli pacciamanti e da rifiuti presenti ai margini delle strade (Bläsing e Amelung, 2018; Iqbal et al., 2020).

La frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU) e i fanghi di depurazione fognari vengono normalmente utilizzati in agricoltura in quanto ricchi di carbonio organico ed elementi nutritivi, con la finalità di migliorare la fertilità del suolo e aumentare le produzioni, garantendo in questo modo una maggiore sostenibilità ambientale (Bandini et al., 2022a; Bläsing e Amelung, 2018).

In Europa e in Nord America il 50% circa dei fanghi di depurazione fognari viene distribuito nei terreni agricoli. Lo spandimento viene regolamentato da normative in quanto è noto che racchiudono diversi inquinanti, con limiti che riguardano il contenuto di agenti patogeni e metalli pesanti. Da alcuni studi incentrati sull'efficienza degli impianti di trattamento delle acque reflue, è emerso che dall'acqua viene rimossa fino al 90% della microplastica, rimanendo così nei fanghi. Tuttavia, né la normativa europea né quella statunitense pongono restrizioni su questo materiale (Bläsing e Amelung, 2018).

Considerando i tassi di distribuzione dei fanghi e stimando il loro quantitativo di microplastiche, è stato calcolato un apporto annuale che oscilla da 63.000 a 430.000 tonnellate nei terreni agricoli europei e da 44.000 a 300.000 in quelli nordamericani (Nizzetto et al., 2016).

La FORSU costituisce quasi il 50% dei rifiuti generati a livello globale (Tyagi et al., 2018). In Italia, secondo un'analisi pubblicata dall'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), nel 2020 la frazione organica rappresentava circa il 40% della raccolta differenziata. Di questa frazione, un quantitativo pari al 71,6% è dato dai rifiuti biodegradabili di cucine e mense, il 27,8% dai rifiuti biodegradabili di parchi e giardini e il restante 0,6% dai rifiuti dei mercati.

Inoltre, viene riportata anche la ripartizione percentuale delle diverse tipologie di trattamento biologico dei rifiuti organici: il 48,1% viene gestito in impianti di compostaggio, il 5,1% finisce negli impianti di digestione anaerobica, mentre il 46,8% è avviato al trattamento integrato anaerobico/aerobico. In quest'ultimo caso, per essere destinato alla produzione di ammendanti, il digestato proveniente dalla fase anaerobica viene sottoposto al processo di compostaggio, che avviene all'interno dello stesso impianto (ISPRA, 2021).

La frazione organica può essere contaminata da materiali plastici, causati da smaltimento improprio e da un'insufficiente separazione dei rifiuti (Rodrigues et al., 2020). Di conseguenza, con l'utilizzo di compost e digestato derivati da questa matrice è probabile che si vadano ad apportare micro/nano plastiche e bioplastiche nell'agroecosistema. Infatti, sebbene la maggior parte degli impianti di compostaggio preveda fasi di pretrattamento, è ancora possibile trovare frammenti plastici nel prodotto finale (Bläsing e Amelung, 2018).

In aggiunta, la FORSU potrebbe essere in codigestione anaerobica con i fanghi di depurazione delle acque reflue, che potrebbero contenere diversi tipi di rifiuto tra cui le plastiche. Per evitare che queste impurità vadano a danneggiare il processo, il materiale viene sottoposto a separazione meccanica, macinazione e triturazione. Così facendo però rimangono comunque micro e nano plastiche che non vengono completamente degradate con il trattamento (Bandini et al., 2022a).

L'irrigazione rappresenta un probabile input di plastica nel suolo, soprattutto per quanto riguarda le microplastiche. L'apporto nei suoli agrari è molto variabile e chiaramente dipende dalla loro concentrazione nell'acqua in questione, con acque reflue non trattate che presentano il quantitativo maggiore, seguite dalle acque reflue trattate, da quelle dei fiumi e dei laghi.

La scarsità d'acqua sta diventando un problema sempre più grave in molti paesi del mondo a causa del cambiamento climatico, dell'urbanizzazione e della crescita della popolazione. Di conseguenza, nei paesi in via di sviluppo è in aumento l'uso di acque reflue parzialmente trattate o addirittura non trattate e potrebbe diventare l'unica fonte idrica per molti agricoltori. Si stima che venga già utilizzata per il 7% della superficie totale irrigata e che con questa venga prodotto il cibo per il 10% della popolazione mondiale (Bläsing e Amelung, 2018).

I teli plastici per la pacciamatura vengono molto utilizzati in agricoltura in quanto presentano numerosi vantaggi: aiutano a controllare le infestanti, aumentano la temperatura del suolo e dell'aria, evitano che i frutti si imbrattino di terra, riducono l'evaporazione e l'erosione (Sintim e Flury, 2017). Questa tecnica si è poi ampiamente diffusa in molti paesi tanto da

interessare 20 milioni di ettari in tutto il mondo, con la Cina che la pratica sul 90% dei suoi terreni agricoli (Steinmetz et al., 2016).

Il polimero più comunemente utilizzato è il polietilene (PE), incluso quello ad alta densità (HDPE), a bassa densità (LDPE) e lineare a bassa densità (LLDPE) (Steinmetz et al., 2016). Solo in Cina, Giappone e Corea del Sud (che insieme vanno a costituire l'80% dei suoli pacciamati con teli plastici a livello globale) vengono utilizzate ogni anno 700.000 tonnellate di LDPE (Espí, 2006).

Il tempo di impiego di questi film plastici di solito dura pochi mesi e può essere ridotto se esposto a eventi atmosferici estremi come grandine e temporali, che causano la loro degradazione fisica e chimica. Più sottile è il film e più richiede tempo e lavoro per essere rimosso senza lasciare residui nel terreno alla fine del ciclo colturale. Per questo motivo, tutti o una parte di questi vengono lasciati sul campo, intenzionalmente o meno, per poi essere interrati con le lavorazioni (Steinmetz et al., 2016). Poi a seguito della degradazione rilasciano microplastiche, che tendono così ad accumularsi in questo ambiente (Huang et al., 2020).

Una volta che la plastica arriva nel suolo, la sua degradazione potrebbe essere molto lenta principalmente a causa della limitata esposizione ai raggi UV e agli agenti che provocano abrasione meccanica, rendendo difficile l'attacco da parte dei microrganismi (Krueger et al., 2015). Diversi studi hanno infatti riscontrato solo una degradazione minima dei polimeri plastici sintetici analizzati: ad esempio il PE ha perso solo dallo 0,1 allo 0,4% del peso in 800 giorni nel suolo (Albertsson, 1980), il polipropilene (PP) lo 0,4% in un anno (Arkatkar et al., 2009), mentre un campione di PVC sepolto da 32 anni nel terreno non presenta nessuna apparente biodegradazione (Otake et al., 1995).

Per quanto riguarda il movimento dei frammenti plastici nel suolo, è possibile che quelli con maggiori dimensioni rispetto al diametro dei pori del terreno vengano trattenuti, andando in questo modo ad accumularsi in superficie. In seguito, potrebbero spostarsi più in profondità per opera delle lavorazioni, delle fratture verticali o dei lombrichi, rischiando di arrivare alle acque sotterranee (Bläsing e Amelung, 2018; Rilling et al., 2017).

Sono diversi gli effetti correlati alla presenza di materiali plastici nel suolo, dove la loro tossicità è correlata specialmente alla composizione chimica, alla forma, alla loro concentrazione nell'ambiente e alla dimensione delle particelle.

Avvengono cambiamenti delle proprietà fisico-chimiche del suolo come la struttura, la densità, l'aerazione, la permeabilità dell'acqua e il pH, andando a influenzare la qualità della rizosfera (Zhang X. et al, 2021).

Però, attualmente la conoscenza degli effetti ecotossicologici della plastica nel suolo è ancora molto scarsa (Bläsing e Amelung, 2018). Dai primi risultati, sembrerebbe che l'aumento della concentrazione di microplastica nei campioni di suolo vada a ridurre il tasso di crescita, di riproduzione e ad aumentare la mortalità dei lombrichi (Cao et al., 2017; Huerta Lwanga et al., 2016; Rodriguez-Seijo et al., 2017), mentre è stato scoperto che agenti plastificanti come gli ftalati quando rilasciati vanno a inibire l'attività microbica del suolo (Wang et al., 2016).

Per quanto riguarda le piante, le particelle più piccole possono essere assorbite dalle radici e traslocate nella parte aerea. Microplastiche sono state rilevate nella frutta e verdura, suggerendo un accumulo di queste particelle nei tessuti della pianta, che poi vengono trasferite ai consumatori con la dieta (Conti et al., 2020).

L'inquinamento da plastica è diventato quindi un serio problema, andando a minacciare l'economia, gli ecosistemi e la salute umana. Per ridurre al minimo l'impatto ambientale dobbiamo mirare ad una gestione integrata dei rifiuti, non prendendo in considerazione un singolo approccio, ma utilizzando diverse strategie volte a gestire per intero il loro processo produttivo: dalla produzione, al consumo, fino poi ad arrivare alla loro destinazione finale, sempre nell'ottica di un'economia circolare. Questo sistema si basa su 4 concetti chiave: ridurre, riutilizzare, riciclare e smaltire.

La produzione della plastica, ad esempio, può essere ridotta andando a migliorare la progettazione del materiale (in modo tale da prolungare la vita del prodotto, consentirne la riparazione e il riutilizzo), con il divieto di alcuni tipi di plastica monouso e utilizzando materiali alternativi, riciclati o biodegradabili (Prata et al., 2019).

Per la conservazione dei prodotti alimentari vengono utilizzati maggiormente gli imballaggi monouso, ma globalmente solo il 14% viene raccolto per il riciclo, e solo il 5% di questo viene riciclato con successo in nuova plastica (Dauvergne, 2018; Hahladakis e Iacovidou, 2018). A tal fine l'Europa ha pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale la Direttiva 2019/904, anche detta direttiva SUP (Single Use Plastics) che impone divieti o limitazioni sulla vendita di alcuni prodotti di plastica monouso (ISPRA, 2021).

Diventa fondamentale, inoltre, diffondere gli effetti provocati dall'inquinamento di questo materiale per aumentare la consapevolezza dei consumatori e, soprattutto, educare ad una corretta separazione dei rifiuti in modo da garantire una gestione più efficiente (Prata et al., 2019). Infatti, se raccolta separatamente il tasso di riciclaggio della plastica è 13 volte maggiore (PlasticsEurope, 2022).

Quando non possono essere riutilizzati, questi materiali diventano rifiuti ed è importante ai fini di un'economia circolare che vengano riciclati, e solo quando non riciclabili destinati all'incenerimento con recupero di energia o in impianti di pirolisi per la produzione di combustibile, in modo tale che solo i residui finali vengano smaltiti in discarica.

Il riciclaggio prevede diversi passaggi: la raccolta differenziata dei rifiuti da parte dei consumatori o nei centri rifiuti, la separazione dei materiali riciclabili ed eliminazione dei contaminanti, la suddivisione in base al tipo di polimero e colore, l'estrusione in granuli e loro vendita alle aziende. I vantaggi ambientali comprendono il risparmio di materie prime e di energia, la riduzione delle emissioni inquinanti e del depositato in discarica. Tuttavia, l'alto costo del processo rispetto al basso costo delle materie prime, il basso valore commerciale della plastica riciclata e la bassa riciclabilità di alcuni prodotti (come tessuti, imballaggi flessibili o la plastica laminata) limitano la diffusione di questa pratica (Prata et al., 2019).

Nel 2021 a livello globale sono state prodotte 390,7 milioni di tonnellate di plastica, di cui solo l'8,3% è stato prodotto con plastica riciclata. L'Europa ha prodotto 57,2 milioni di tonnellate, pari al 15% circa del totale, e circa il 40% è rappresentato dal *packaging*. Nel 2020, solo per quanto riguarda gli imballaggi, sono stati prodotti 17,9 milioni di tonnellate di rifiuti, di cui il 46% è stato riciclato (con l'obiettivo di arrivare al 70% entro il 2030), il 37% incenerito e il 17% inviato in discarica (PlasticsEurope, 2022).

Visto che il packaging utilizzato nell'industria alimentare può essere difficilmente sostituito con altri materiali che non siano le plastiche, con l'obiettivo di sostituire i combustibili fossili con risorse rinnovabili, aumentare il riciclo e la gestione dei rifiuti, sono state sviluppate le bioplastiche (Ncube et al., 2021; Prata et al., 2019).

1.1.2 *Il mondo delle bioplastiche*

Con il termine bioplastiche facciamo riferimento ad una grande famiglia di materiali aventi diverse proprietà e applicazioni. Secondo *European Bioplastics*, associazione che rappresenta gli interessi dell'industria delle bioplastiche in Europa, una bioplastica è un tipo di plastica che può essere a base biologica, biodegradabile o possedere entrambe le caratteristiche.

Le plastiche a base biologica (o *bio-based*) sono create parzialmente o totalmente da biomassa, ovvero dalla "frazione biodegradabile dei prodotti, rifiuti e residui di origine biologica provenienti dall'agricoltura (comprendente sostanze vegetali e animali), dalla silvicoltura e dalle industrie connesse, comprese la pesca e l'acquacoltura, nonché la parte

biodegradabile dei rifiuti industriali e urbani” (European Bioplastics, 2022a; Gazzetta Ufficiale).

Queste plastiche vengono prodotte principalmente da colture ricche di carboidrati quali mais, grano, patate, tapioca, canna da zucchero, ma possono essere prodotte anche dalla fermentazione degli zuccheri, da oli vegetali, dai gusci di crostacei e dalle alghe (Kabasci, 2020).

La biomassa utilizzata per la produzione di queste plastiche può, quindi, derivare da varie materie prime che vengono classificate in tre generazioni:

- La prima generazione comprende materie prime che derivano da colture i cui prodotti sono edibili e che altrimenti sarebbero quindi destinati all'alimentazione umana;
- La seconda generazione comprende le materie prime ligno-cellulosiche che derivano da colture dedicate o da sottoprodotti non commestibili delle colture alimentari come paglia, stocchi di mais o rifiuti organici;
- La terza generazione comprende le materie prime ricavate dalla coltivazione di alghe e microrganismi (BioplasticsEurope).

Inoltre, le plastiche a base biologica possono essere:

- A base di polimeri naturali (anche detti biopolimeri): cioè polimeri sintetizzati direttamente da organismi (piante, animali, alghe, microrganismi) e poi estratti dall'uomo attraverso il processo di produzione. I polimeri naturali più utilizzati sono i polisaccaridi strutturali (cellulosa, chitina) e di riserva (amido) e la lignina.
- Sintetizzate da monomeri bioderivati: ovvero ottenute mediante polimerizzazione industriale a partire da monomeri ricavati da materie prime naturali. Si ricava in questo modo l'acido polilattico (PLA), una delle più importanti bioplastiche, formata dalla polimerizzazione dell'acido lattico, monomero naturale estratto da mais, tapioca o canna da zucchero (Kabasci, 2020).

La biodegradabilità è la capacità di un materiale di essere degradato, in modo naturale e grazie all'attività enzimatica di microrganismi, in molecole semplici quali acqua, anidride carbonica e metano, senza rilasciare sostanze inquinanti (Tecnopolo Bologna CNR). Il processo di biodegradazione dipende dalle condizioni (umidità, temperatura, ossigeno, presenza di microrganismi) dell'ambiente specifico (impianto di compostaggio industriale o domestico, suolo, acqua) e dal tipo di materiale.

La biodegradabilità di un materiale plastico non dipende dalla fonte da cui deriva, ma dalla sua struttura chimica. È per questo motivo che una plastica 100% a base biologica può non

essere biodegradabile, mentre può esserlo una plastica a base fossile (European Bioplastics, 2023a).

Una plastica biodegradabile non significa che sia necessariamente compostabile. La compostabilità riguarda il fine vita di un prodotto ed è la capacità di un materiale di essere biodegradabile in condizioni di compostaggio industriale o domestico, portando alla produzione di compost.

Per essere in possesso di questa qualità al termine del processo deve trasformarsi in CO₂, H₂O, composti inorganici e biomassa a un tasso coerente con altri materiali compostabili noti, come ad esempio la cellulosa, e non lasciare residui visibili, distinguibili o tossici (BioplasticsEurope; Gironi e Piemonte, 2011).

Attualmente a livello europeo esistono due norme che indicano i criteri tecnici che un materiale plastico deve soddisfare per essere certificato come “biodegradabile e compostabile”: la norma UNI EN 14995:2007 (per le materie plastiche in generale) e EN 13432:2002 (per gli imballaggi), entrambe specifiche per il compostaggio industriale (BioplasticsEurope). Questi impianti sono in grado di fornire condizioni controllate, garantendo elevate temperature e areazione forzata, indispensabili per svolgere il processo in modo rapido e ottimale. Condizioni che non si possono ricreare con il compostaggio domestico e che, chiaramente, non si verificano nell’ambiente naturale (Gironi e Piemonte, 2011). Infatti, da uno studio basato sulla biodegradazione di bottiglie di PLA è emerso che l’efficienza di degradazione in un ambiente naturale è pari a circa il 10-20% dell’efficienza in un ambiente controllato (Kale et al 2007).

Chiariti questi concetti, possiamo tornare alla suddivisione accennata a inizio paragrafo.

Possiamo distinguere 3 gruppi di bioplastiche:

- Plastiche a base biologica non biodegradabili: sono a base biologica, ma chimicamente identiche alle loro controparti fossili e quindi non biodegradabili. Tecnicamente chiamate “*drop-in*”. Degli esempi sono il bio PET (polietilene tereftalato) e il bio PE (polietilene), entrambi derivati dalla canna da zucchero, e il bio PA (poliacrilato), prodotto da oli vegetali. Utilizzate soprattutto negli imballaggi.
- Plastiche derivate da fonti fossili biodegradabili: ad esempio il PBAT (polibutilene adipato tereftalato), che potrebbero in futuro diventare almeno in parte bio-based.
- Plastiche a base biologica biodegradabili: ad esempio la PLA e le miscele di amidi (in cui rientra il Mater-Bi) (European Bioplastics, 2022a).

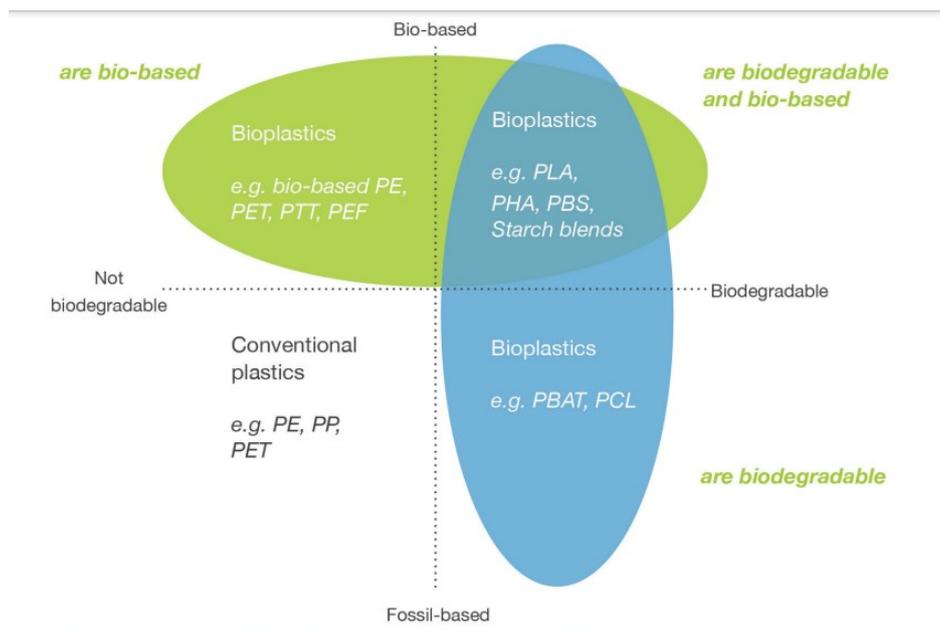


Figura 1-3: Classificazione bioplastiche.

Fonte: What are bioplastics? European Bioplastics, 2022a.

Lo strumento più importante per esaminare l’impatto ambientale di una bioplastica è la valutazione del ciclo di vita (LCA). Questo tipo di analisi si basa sulla ricerca di alcuni fattori considerati cruciali nella valutazione dell’impatto che un determinato prodotto può avere sull’ambiente, analizzandone l’intero ciclo di vita “dalla culla alla tomba”, ovvero dalla produzione allo smaltimento (Gironi e Piemonte, 2011).

Rispetto alle plastiche tradizionali, le plastiche a base biologica hanno il vantaggio di ridurre la dipendenza da fonti fossili e le emissioni di gas serra. Le piante sequestrano l’anidride carbonica dall’atmosfera durante la loro crescita e utilizzandole per la produzione di bioplastiche, questa quota rimane immagazzinata per l’intera vita utile del prodotto, prolungandosi se il materiale viene riciclato (European Bioplastics, 2023a).

Ma il beneficio si paga in termini ambientali a causa dell’impatto sulla qualità dell’ecosistema dato dall’acidificazione del suolo e l’eutrofizzazione, principalmente a causa dell’uso di fertilizzanti e fitormaci per aumentare le produzioni, e dal consumo di suolo e acqua.

Quindi, si potranno privilegiare le bioplastiche o le plastiche convenzionali a seconda di ciò che si considera essere l’impatto ambientale più importante (Gironi e Piemonte, 2011).

Inoltre, uno svantaggio è rappresentato dalla confusione che i consumatori hanno nel distinguere le varie tipologie di bioplastica. La forte carenza di informazioni in questo ambito non permette una corretta gestione di questi materiali, che spesso vengono differenziati in modo sbagliato. Per fare chiarezza:

- Le plastiche a base biologica non biodegradabili possono essere riciclate meccanicamente insieme alle plastiche tradizionali, quindi andranno conferite nella raccolta della plastica.
- Un prodotto che presenta solo la dicitura biodegradabile dovrebbe essere conferito nell'indefferenziato.
- Un materiale certificato biodegradabile e compostabile andrebbe smaltito con i rifiuti organici, quindi nell'umido, che sarà poi indirizzato agli impianti di compostaggio industriale (European Bioplastics, 2023; Tecnopolo Bologna CNR).

In secondo luogo, gli impianti di trattamento dei rifiuti alimentari (compostaggio e digestione anaerobica) già in funzione devono essere valutati per la loro efficienza nella gestione delle bioplastiche, che sono state dichiarate compostabili e sono presenti nei rifiuti organici (Calabrò e Grosso, 2018). Questo per evitare una discrepanza tra le condizioni previste dalle norme e quelle industriali, così da non lasciare residui nel compost finale (Bandini et al., 2022).

1.1.3 Bio-packaging

Il mercato delle bioplastiche è in continua crescita e tende a salire di anno in anno, con la produzione globale che dovrebbe slittare da circa 2,2 milioni di tonnellate nel 2022 a circa 6,3 milioni di tonnellate nel 2027.

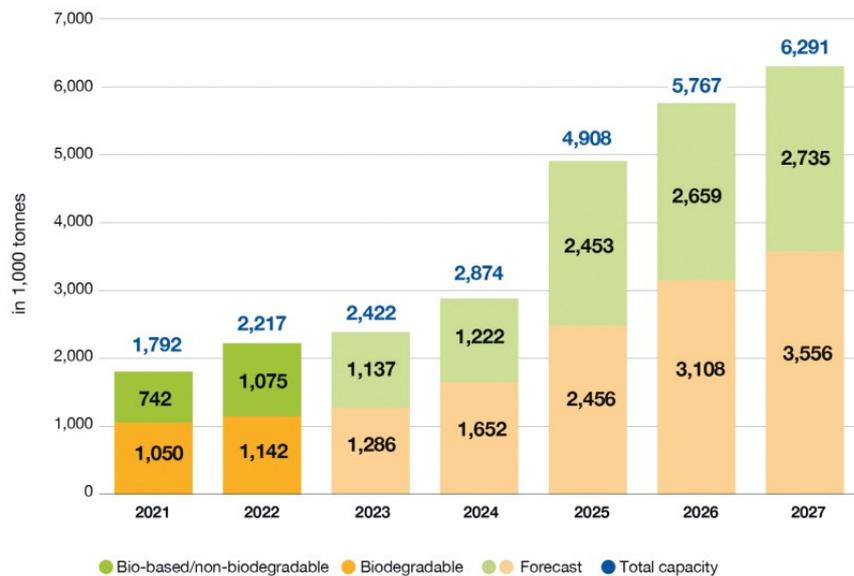


Figura 1-4: Capacità di produzione globale di bioplastiche 2022-2027.

Fonte: European bioplastics, 2022b. Bioplastics market development update 2022.

I campi di applicazione spaziano in diversi settori: da quello medico al tessile, dall'elettronico all'automobilistico, da quello agricolo per poi arrivare agli imballaggi. Come nel caso delle plastiche tradizionali, il *packaging* risulta essere il segmento di mercato dominante, rappresentando il 48% (quasi 1.1 milioni di tonnellate) della produzione realizzata nel 2022 (European Bioplastics, 2022b).

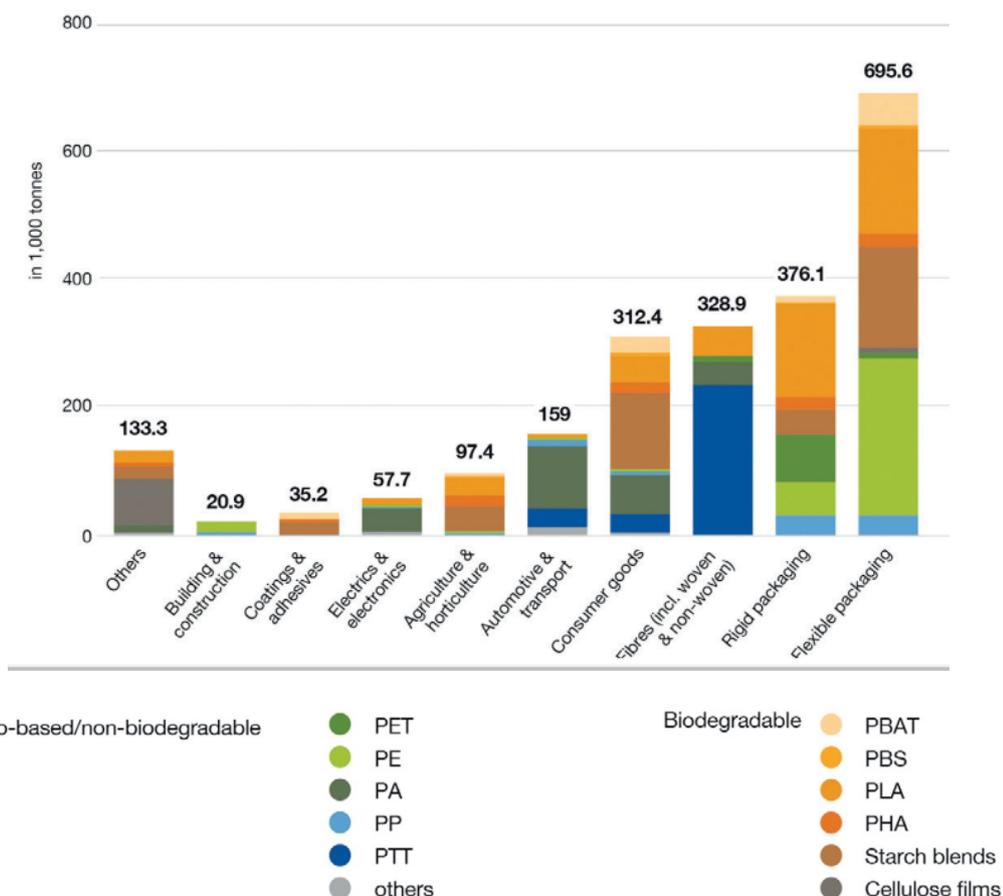


Figura 1-5: Produzione di bioplastiche nel 2022 divisa per segmenti di mercato.

Fonte: European bioplastics, 2022b. Bioplastics market development update 2022.

Sul mercato possiamo trovare due tipologie di imballaggi:

- Rigidi: in cui rientrano, ad esempio, vari tipi di contenitori e bottiglie. In questa sezione vengono utilizzati materiali come PLA, bio-PE o bio-PET.
- Flessibili: in cui vengono utilizzate diverse tipologie di bioplastiche, come bio-PE, PLA e le miscele di amidi. In particolare, la biodegradabilità è una caratteristica spesso ricercata quando si tratta di imballaggi alimentari per prodotti deperibili. Film e vassoi sono particolarmente adatti per prodotti freschi come frutta e verdura in quanto consentono una maggiore durata di conservazione e di presentarsi in modo più attraente per il consumatore.

Il *packaging* è fondamentale sotto più aspetti. Innanzitutto, è un eccellente vettore per la pubblicità del prodotto e permette di trasmettere informazioni importanti al consumatore, incentivandolo all'acquisto. Inoltre, senza le varie soluzioni di imballaggio disponibili, molte merci deperibili avrebbero una bassa *shelf-life* (vita di scaffale, cioè vita commerciale del prodotto) o rischierebbero di essere danneggiate durante il trasporto, aumentando lo spreco alimentare (European Bioplastics, 2023b).

1.1.4 Norma tecnica UNI EN 13432:2002

La UNI EN 13432:2002, intitolata “*Requisiti per imballaggi recuperabili mediante compostaggio e biodegradazione – Schema di prova e criteri di valutazione per l'accettazione finale degli imballaggi*”, è una norma tecnica italiana armonizzata a livello europeo e definisce i requisiti che un imballaggio deve possedere per potersi definire biodegradabile e compostabile.

Vengono prese in considerazione quattro caratteristiche:

1) Biodegradabilità;

Entro 6 mesi dall'inizio della prova la percentuale di biodegradazione del materiale deve essere pari almeno al 90% in totale o al 90% della degradazione massima di una sostanza di riferimento idonea, dopo che sia stato raggiunto un livello di biodegradazione costante sia per il materiale di prova che per la sostanza di riferimento.

2) Disintegrazione durante il compostaggio;

Dopo l'esposizione al processo di compostaggio per un massimo di 12 settimane, non più del 10% della massa secca originale del materiale deve non superare la prova del passaggio attraverso uno staggio avente luce maglia ≤ 2 mm.

3) Effetto sul processo di compostaggio;

4) Effetto sulla qualità del compost risultante.

Il compost ottenuto alla fine della prova di disintegrazione può essere utilizzato per prove di controllo di qualità analitiche e biologiche. Quando sono eseguite prove sulla ecotossicità è importante utilizzare compost da prove di disintegrazione condotte con e senza materiale di prova per confrontare direttamente i risultati delle prove e per scoprire eventuali effetti ecotossici correlati.

Ci sono dei prerequisiti che dovrebbero essere considerati per il compostaggio degli imballaggi prima della loro immissione sul mercato, anche se non fanno parte del procedimento di prova analitica. Uno di questi è la macinazione/frammentazione.

La frammentazione di imballaggi utilizzati con macchinari e procedimenti comunemente utilizzati negli impianti di compostaggio, non dovrebbe essere disturbata e dovrebbe portare a particelle dalle dimensioni minori di 10 cm in senso longitudinale, adatte per il processo di compostaggio (UNI EN 13432:2002).

1.2 Il compost

Il compostaggio è un metodo biologico utilizzato per trasformare i rifiuti organici in ammendanti organici stabili e umificati (Adani et al., 1999). Il termine compostaggio (dal latino “compositum”, cioè miscela) si riferisce a un processo di biodegradazione di un miscuglio di substrati effettuato da una comunità microbica, composta da varie popolazioni, in condizioni aerobiche e allo stato solido. Un ruolo fondamentale è operato, quindi, dai microrganismi che traggono energia per il loro metabolismo dalla materia organica, liberando alla fine anidride carbonica, acqua, sali minerali e sostanza organica stabilizzata ricca di sostanze umiche, ovvero il compost (Chiumenti, R. e Chiumenti, A., 2002; Insam e De Bertoldi, 2007).

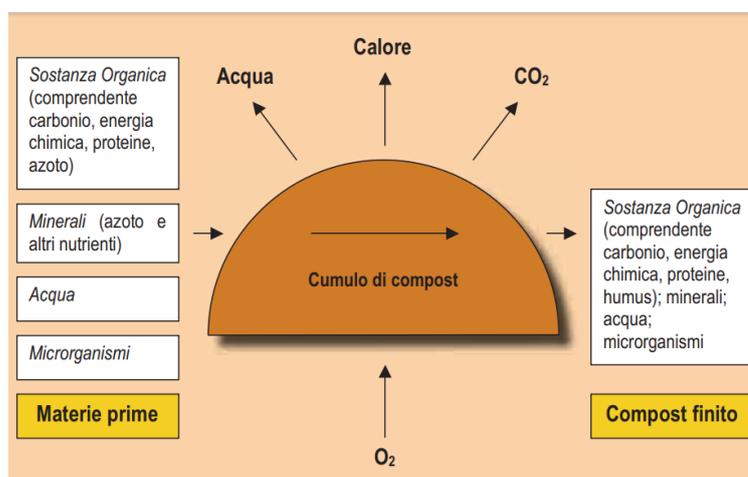


Figura 1-6: Processo di compostaggio.

Fonte: https://www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/COMPOST_E287/Low_01.pdf

La trasformazione della materia organica fresca in compost viene effettuata principalmente per tre ragioni:

- 1) per superare la fitotossicità della materia organica fresca non stabilizzata;
- 2) ridurre la presenza di agenti (virus, batteri, funghi, parassiti) patogeni per l'uomo, gli animali e le piante ad un livello tale da non costituire ulteriormente un rischio per la salute;
- 3) produrre un fertilizzante organico o un ammendante, riciclando rifiuti organici e biomassa (Insam e De Bertoldi, 2007).

Il compost migliora le proprietà fisiche, chimiche e microbiologiche del suolo (Sánchez et al., 2017). Come altri fertilizzanti organici, il suo effetto principale non è quello di arricchire immediatamente il terreno di elementi nutritivi essenziali per la crescita e lo sviluppo delle piante come azoto, fosforo e potassio, ma di contribuire al miglioramento della struttura e di consentire la mobilitazione dei nutrienti alle piante, portando al raggiungimento di un equilibrio del suolo. L'alto contenuto di sostanza organica favorisce la formazione di aggregati, che consentono una permeabilità del suolo maggiore all'aria e all'acqua, e incrementa la ritenzione idrica, particolarmente importante per il recupero e la prevenzione della desertificazione dei suoli (De Bertoldi et al., 1983; Sánchez et al., 2017). Permette di legare elementi minerali facilmente dilavabili ai colloidi della frazione umificata, rilasciati poi gradualmente attraverso l'azione microbica stimolata dalla presenza di materia organica (De Bertoldi et al., 1983). Consente, inoltre, una riduzione della concentrazione di fitofarmaci nel suolo attraverso la formazione di legami con le molecole organiche del compost. Tutti questi benefici portano ad un incremento della crescita delle piante e dei microrganismi della rizosfera.

Infine, il compost gioca un ruolo fondamentale per quanto riguarda la mitigazione dei gas serra in ambito agricolo, in quanto consente:

- il sequestro di carbonio nei suoli agrari;
- la riduzione di fertilizzanti chimici e dell'uso di fitofarmaci, evitando così le emissioni associate alla loro produzione;
- miglioramento della lavorabilità dei suoli che potrebbe portare a meno consumo di combustibili (Favoino e Hogg, 2008).

Il processo di compostaggio prevede essenzialmente due fasi:

- Fase di decomposizione, caratterizzata da un'intensa attività microbica che porta alla degradazione della maggior parte dei materiali biodegradabili; si ottiene compost fresco.
- Fase di maturazione, in cui avviene la trasformazione di parte del restante materiale organico in sostanze umiche; si ottiene compost maturo (Chiumenti, R. e Chiumenti, A., 2002).

La prima fase si realizza con la creazione del cumulo di compostaggio, la popolazione microbica inizia a degradare i composti prontamente metabolizzabili (molecole semplici come zuccheri, acidi organici e aminoacidi) e all'aumentare dell'attività dei microrganismi si consumano dosi elevate di ossigeno e si produce calore, anidride carbonica e acqua. La liberazione di energia sotto forma di calore si accumula all'interno del cumulo e la temperatura continua ad aumentare costantemente, passando dai valori caratteristici dell'ambiente (fase mesofila: 25-45 °C) a 60 °C e oltre (fase termofila: più di 45 °C). La fase termofila, nota come high rate phase, è desiderabile per uccidere gli agenti patogeni e devitalizzare i semi delle piante infestanti. Ha una durata che può variare da qualche settimana a più di un mese in funzione delle caratteristiche del substrato e della tecnica di compostaggio adottata. Poiché temperature superiori a circa 65 °C portano all'inattivazione della maggior parte dei microrganismi, diventa indispensabile dissipare il calore attraverso l'aerazione forzata o il rivoltamento del cumulo per consentire il raffreddamento del substrato, oltre che per mantenere valori di ossigenazione adeguati. Durante questa fase si ha un temporaneo rilascio di sostanze fitotossiche, tra cui azoto ammoniacale e acidi grassi volatili a corta catena (acido acetico, propionico e butirrico), che vengono velocemente metabolizzate con il susseguirsi del processo. Quando i composti più facilmente biodegradabili incominciano ad esaurirsi, a seguito della morte di parte della popolazione microbica per carenza di nutrimento, la temperatura del compost diminuisce gradualmente e i microrganismi mesofili dominano ancora una volta il cumulo. Alla fine della fase di decomposizione otteniamo il compost fresco.

Nella seconda fase i processi metabolici, che interessano le molecole organiche di difficile degradazione, avvengono più lentamente e questa fase può durare anche alcuni mesi. La temperatura continua a diminuire, per poi stabilizzarsi poco al di sopra della temperatura ambiente, passando da una popolazione microbica mesofila a psicrofila. Già nella fase mesofila compaiono gli attinomiceti, che degradano molecole complesse come amido, cellulosa e lignina, indispensabili per la sintesi delle sostanze umiche. Il materiale viene

colonizzato anche dalla microfauna (come collemboli, acari, millepiedi) che contribuiscono a rimescolare e sminuzzare i composti organici e minerali. Alla fine del processo di maturazione, noto come curing phase, otteniamo compost maturo, ovvero stabilizzato (Chiumenti, R. e Chiumenti, A., 2002; Sayara et al., 2020).

La qualità del compost è strettamente correlata alla sua stabilità e maturità.

La maturità viene utilizzata per determinare l'idoneità del compost per scopi agricoli, considerando il suo effetto sulla crescita delle piante e gli aspetti di fitotossicità, mentre la stabilità indica l'assenza di materiale biodegradabile. Queste caratteristiche vengono spesso correlate insieme poiché i composti fitotossici sono prodotti dell'attività microbica della materia organica instabile (Oviedo-Ocaña et al., 2015; Siles-Castellano et al., 2020).

I parametri principali utilizzati per valutare la stabilità e maturità del compost sono:

- l'indice di germinazione: per la valutazione delle sostanze fitotossiche, deve essere almeno del 60%;
- l'indice di respirazione: basata sul consumo di ossigeno da parte dell'attività microbica, è inversamente proporzionale alla stabilità;
- l'indice di mineralizzazione dell'azoto: inizialmente presenta valori più alti per la trasformazione delle frazioni azotate più biodegradabili in azoto minerale, per poi diminuire con l'evolversi del processo;
- l'indice di umificazione: in cui aumenta la formazione delle sostanze umiche e diminuisce la frazione estraibile della sostanza organica; il rapporto tra la frazione non umificata e quella umificata è in genere inferiore al 0,5% per compost maturi (Chiumenti, R. e Chiumenti, A., 2002).

Il corretto andamento del processo di compostaggio dipende da tutti quei fattori che vanno a influenzare l'attività dei microrganismi che operano nelle diverse fasi, quali:

- la porosità del substrato: è la misura degli spazi vuoti all'interno della biomassa, occupati in parte da aria e in parte da acqua, con valori ottimali compresi tra il 35 e il 50%. Viene determinata attraverso il rapporto tra il volume occupato dagli spazi vuoti all'interno dalla biomassa e quello occupato dalla biomassa stessa. La percentuale di volume occupata dall'aria, definita porosità libera, è influenzata da fattori come la granulometria, il contenuto di umidità e lo spessore dello strato di materiale. Questa risulta fondamentale per mantenere il giusto grado di ossigeno all'interno del cumulo;
- l'umidità del materiale: l'acqua è fondamentale per la vita dei microrganismi che agiscono nel processo. Il valore di umidità ottimale è compresa tra il 40 e il 65%, in

- quanto valori inferiori al 40% causano un rallentamento dell'attività biologica (con il blocco sotto il 30%), mentre superando il 65% si instaurano condizioni anossiche;
- la presenza di ossigeno: durante la prima fase del processo l'attività microbica è molto intensa e necessita una concentrazione di ossigeno più elevato compreso tra il 5 e il 15%, mentre per la fase di maturazione è sufficiente dall'1 al 5%;
 - la temperatura;
 - il rapporto C/N e la disponibilità di nutrienti: elementi come carbonio, azoto, fosforo e potassio sono fonti di energia per i microrganismi e sono contenuti nella maggior parte delle matrici compostabili. In generale, all'inizio del processo il rapporto ottimale C/N dovrebbe essere circa 30, considerando che vengono utilizzati 30 atomi di carbonio per ogni atomo di azoto. Con $C/N > 30$ aumenta la durata del processo in quanto avviene un rallentamento dell'attività microbica, mentre con $C/N < 20$ l'azoto in eccesso viene liberato per volatilizzazione di ammoniaca. Con la perdita di carbonio a seguito della liberazione di CO_2 , il rapporto C/N diminuisce nel tempo fino ad arrivare a valori di 15-20 alla fine del processo di compostaggio;
 - il pH: variabile durante il processo: all'inizio a seguito della formazione di acidi organici e CO_2 il pH tende verso valori acidi, successivamente con l'aerazione del cumulo il pH sale fino a 8-9, per poi arrivare a valori neutri o leggermente alcalini verso la fine del tempo di compostaggio;
 - la presenza di sostanze inibitrici (Chiumenti, R. e Chiumenti, A., 2002).

L'articolo 183 del Decreto legislativo 152/2006 e s.m.i. (GU n.88 del 14/04/2006), noto come Testo Unico Ambientale, fornisce la seguente definizione di compost: *“prodotto ottenuto dal compostaggio, o da processi integrati di digestione anaerobica e compostaggio, dei rifiuti organici raccolti separatamente, di altri materiali organici non qualificati come rifiuti, di sottoprodotti e altri rifiuti a matrice organica che rispettino i requisiti e le caratteristiche stabilite dalla vigente normativa in tema di fertilizzanti e di compostaggio sul luogo di produzione”*.

Il Decreto legislativo 75/2010 e s.m.i. (GU n.121 del 26 maggio 2010) comprende tra le categorie di compost commercializzabili l'ammendante compostato misto, studiato nella presente tesi. L'ammendante compostato misto viene definito come: *“prodotto ottenuto attraverso un processo di trasformazione e stabilizzazione di rifiuti organici che possono essere costituiti dalla frazione organica degli RSU proveniente da raccolta differenziata, da rifiuti di origine animale compresi liquami zootecnici, da rifiuti di attività agroindustriali e*

da lavorazione del legno e del tessile naturale non trattati, da reflui e fanghi, nonché dalle matrici previste per l'ammendante compostato verde”.

Tabella 1-1: Caratteristiche ammendante compostato misto.

Fonte: Decreto legislativo 75/2010

Caratteristiche da dichiarare	Requisiti richiesti	Note
Umidità pH C organico su s.s. C umico e fulvico su s.s. N organico su s.s. C/N Cu totale su s.s. Zn totale su s.s. Salinità	max 50% compreso tra 6 e 8,5 min. 30% min. 2,5% min. 80% del N totale max 50 max 150 mg/kg max 500 mg/kg -	È consentito dichiarare i titoli in altre forme di azoto, fosforo totale e potassio totale. Il tenore dei materiali plastici vetro e metalli (frazione di diametro ≥ 2 mm) non può superare lo 0,5% ss. Inerti litoidi (frazione di diametro ≥ 5 mm) non può superare il 5% s.s. Sono inoltre fissati i seguenti parametri di natura biologica: -Salmonella: assenza in 25 g di campione t.q. -Escherichia coli: in 1 g di campione t.q.; n(1)=5; c(2)=1; m(3)=1000 CFU/g; M(4)=5000 CFU/g Indice di germinazione (diluizione al 30%) deve essere $\geq 60\%$ -Tallio: meno di 2 mg/kg sul secco (solo per Ammendanti con alghe).

Per questa tipologia di ammendanti i tenori massimi consentiti in metalli pesanti espressi in mg/kg e riferiti alla sostanza secca sono i seguenti:

Tabella 1-2: Limiti metalli pesanti ammendanti.

Fonte: Decreto legislativo 75/2010

Metalli	Ammendanti
Piombo totale	140
Cadmio totale	1,5
Nichel totale	100
Zinco totale	500
Rame totale	230
Mercurio totale	1,5
Cromo esavalente totale	0,5

Esistono più tipologie di compost utilizzabili come ammendanti, che presentano caratteristiche differenti essendo costituiti da diverse matrici di origine. Diventa quindi fondamentale ridurre al minimo la presenza di sostanze tossiche facendo una preselezione del materiale in ingresso, che andrebbero a contaminare il compost prodotto. È quindi

importante valutare la qualità del prodotto finale al fine di tutelare la qualità delle colture e/o dell'ambiente. Viene data particolare attenzione alla presenza di materiali inerti, plastiche, vetro, oggetti metallici non sono compatibili con il compostaggio, contenuto di metalli pesanti e presenza di patogeni. Inoltre, come riportato in precedenza il compost deve essere stabile e maturo, sia per eliminare i composti intermedi fitotossici sia per favorire l'umificazione della materia organica (Gomez, 1998; Sayara et al., 2020; Sharma et al 1997).

1.3 Ecotossicologia

L' ecotossicologia unisce i campi dell'ecologia e della tossicologia; in particolare è stata definita come la branca della tossicologia che si occupa dello studio degli effetti tossici, provocati da inquinanti naturali o sintetici, sui costituenti degli ecosistemi, animali (compreso l'uomo), vegetali e microbici, in un contesto integrale (Forbes, 1993).

I test tossicità possono essere classificati in base al tempo di esposizione (tossicità acuta o cronica), alla modalità di effetto (morte, crescita, riproduzione) o alla risposta effettiva (letale o subletale).

La tossicità acuta copre solo un periodo relativamente breve del ciclo di vita dell'organismo testato e le risposte vengono espresse attraverso i valori LC50 (*Lethal Concentration*) o EC50 (*Effective Concentration*), che indicano rispettivamente la concentrazione che provoca la morte o un cambiamento specifico del comportamento normale nel 50% degli individui della popolazione dopo un certo periodo di esposizione. I test di tossicità cronica vengono utilizzati per valutare gli effetti di lunga durata che non provocano la morte. Ne sono un esempio gli studi che abbracciano l'intero ciclo di vita dell'organismo o gli effetti sul genotipo (Nordberg et al., 2009; Kapanen e Itävaara, 2001).

I principi dell'ecotossicologia possono essere applicati anche al compost, in quanto potrebbe contenere sostanze dannose per l'ambiente (Pivato et al., 2014).

Come analizzato precedentemente, il compost deve soddisfare precisi requisiti di qualità per poter essere definito un ammendante, compresi test analitici e biologici. Queste analisi di solito includono un test ecotossicologico che utilizza piante superiori per la determinazione di una eventuale inibizione della crescita (Kapanen e Itävaara, 2001). Tuttavia, nel Decreto legislativo attualmente in vigore sui fertilizzanti non è prevista alcuna valutazione degli effetti sulla fauna del suolo (Pivato et al., 2014).

Ad oggi, inoltre, gli studi più importanti riguardanti gli indicatori biologici si sono concentrati nell'uso di piante (indici di germinazione e di crescita delle piantine) e microrganismi (tassi di respirazione, cambiamenti nelle attività enzimatiche e nelle comunità

microbiche), mentre scarsa attenzione è stata dedicata agli invertebrati del suolo (Domene et al., 2011; Pivato et al., 2014).

La norma UNI EN 13432, che fornisce le linee guida per la valutazione della biodegradabilità e compostabilità degli imballaggi biodegradabili, include la valutazione dell'ecotossicità eventualmente originatosi dopo il compostaggio per dimostrare la sicurezza ambientale. In particolare, prevede uno studio sulla qualità del compost risultante dalla prova di disgregazione del materiale mediante analisi dei parametri chimico-fisici e determinazione degli effetti ecotossicologici almeno sulle piante superiori. In generale, per una valutazione più completa, le materie plastiche possono essere testate sia su specie vegetali che animali (Briassoulis et al., 2010; Frits, 2006).

Possono essere utilizzati diversi metodi per determinare l'ecotossicità del compost. Esponendo il materiale testato su diversi organismi può essere preso in considerazione:

- il bioaccumulo: si riferisce all'accumulo di un contaminante in un organismo; risultato dall'esposizione diretta (ad esempio dall'acqua, dal suolo e dall'aria) e dall'esposizione da alimenti contaminati;
- la bioconcentrazione: si riferisce all'accumulo di un contaminante in un organismo specifico solo dal suo ambiente in cui vive (cioè acqua, suolo e aria). Viene considerato solo il contatto diretto come la respirazione o il contatto con la pelle;
- la biomagnificazione: viene utilizzato quando la concentrazione di un contaminante in un organismo è superiore alla concentrazione in un organismo di livello trofico inferiore (Bour et al., 2015; Popa et al., 2022).

I lombrichi sono particolarmente adatti per studiare l'impatto di macro, micro o nano particelle sulla fauna del suolo perché sono in grado di ingerirle, accumularle e trasportarle negli ecosistemi del suolo. Per questo motivo sono gli organismi utilizzati nei test di ecotossicità finalizzati alla valutazione dell'effetto delle plastiche e bioplastiche sul biota del suolo.

Per descrivere e quantificare gli impatti di questi materiali vengono applicati diversi *endpoint*, ovvero i vari obiettivi di misurazione di un test di tossicità, come la mortalità, la crescita, la riproduzione, le attività enzimatiche e altre risposte metaboliche e comportamentali (Liwarska-Bizukojc, 2021; Nordberg et al., 2009).

Degli studi incentrati sulla plastica non degradabile hanno evidenziato effetti avversi sui lombrichi, tra cui mortalità, riduzione del tasso di crescita, risposte immunitarie allo stress, danni alle cellule intestinali e al DNA (Ding et al., 2021). Tuttavia, nel complesso la quantità e il progresso della ricerca sull'ecotossicità dei rifiuti plastici nell'ecosistema del suolo è

ancora molto limitata, in particolare per quanto riguarda le bioplastiche (Liwarska-Bizukoje, 2021).

La presenza di contaminanti nel suolo disturba le principali funzioni fisiologiche dei lombrichi e questi effetti dipendono dalla matrice, dal tempo di esposizione e dalle dosi degli inquinanti nell'ambiente. Le reazioni all'inquinamento possono essere monitorate a vari livelli: a livello dell'intero organismo (vitalità, perdita di peso, riduzione della riproduzione e reazione di fuga), a livello di organi e tessuti (alterazioni istopatologiche), a livello cellulare (diminuzione delle condizioni fisiologiche delle cellule) e a livello molecolare (Roubalová et al., 2015).

I contaminanti hanno effetti sulle barriere naturali di difesa e sul sistema immunitario dei lombrichi.

In condizioni di stress (ad es. esposizioni a radiazioni UV, contaminanti organici e inorganici, temperature estreme e stress biotico), le concentrazioni di ROS (specie reattive all'ossigeno) aumentano, con conseguente sviluppo di stress ossidativo e danno alle strutture cellulari. Questi organismi hanno sviluppato un efficiente sistema di difesa antiossidante, con enzimi che proteggono le macromolecole dal danno ossidativo. Per determinare, quindi, gli effetti degli inquinanti sui lombrichi vengono spesso utilizzate sia le attività enzimatiche che i livelli di espressione genica degli enzimi antiossidanti.

I celemociti, termine con il quale si fa riferimento a diverse tipologie di cellule presenti nel fluido celomico, vengono spesso utilizzati nella valutazione dell'ecotossicologia del suolo essendo in grado di rispondere ad un'ampia gamma di inquinanti. Molte di queste sostanze esercitano attività genotossiche, che provocano danni al DNA dei celemociti, spesso evidenziati attraverso il comet assay (De Bernardi et al., 2022; Mincarelli et al., 2016; Mincarelli et al., 2019; Roubalová et al., 2015).

Anche la valutazione del microbiota intestinale (GUT) risulta importante, essendo strettamente correlato alla salute dell'ospite, al metabolismo e all'immunità, nonché ai processi di decomposizione del suolo. Tuttavia sono pochi gli studi eseguiti sugli effetti delle microplastiche sul microbiota intestinale degli organismi terrestri, in quanto inquinante emergente dell'ecosistema suolo (Cheng et al., 2021).

1.4 Lombrichi

I lombrichi sono gli invertebrati più abbondanti nei suoli delle regioni temperate. Vengono definiti ingegneri ecosistemici in quanto partecipano al ciclo dei nutrienti negli ecosistemi terrestri e alla formazione del profilo del suolo dal punto di vista fisico, chimico e

microbico. Grazie alla loro attività di scavo migliorano la struttura aumentando la macroporosità, influenzando la quantità di aria e acqua nel suolo (Roubalová et al., 2015). Favoriscono l'incorporazione di residui vegetali negli aggregati del suolo e partecipano alla decomposizione della materia organica, con formazione di humus. Inoltre, convertono materiali biodegradabili e rifiuti organici in vermicast, ricco di nutrienti per le piante contenente ormoni, enzimi, microrganismi, materiali inorganici e organici che acquisisce durante il passaggio del suolo attraverso l'intestino del lombrico (Singh et al., 2016).

Al genere *Lombricus* appartengono circa 700 specie di anellidi terrestri; queste possono essere classificate, in base alla frazione del suolo che vanno ad occupare e in base al loro comportamento alimentare, in (Richardson et al., 2015; Huang et al., 2021):

- Specie epigeica: i lombrichi si trovano in prossimità della superficie del suolo a circa 0-2,5 cm di profondità e sono fitofagi, principalmente nutrendosi di frammenti vegetali in via di decomposizione, presentando un'alimentazione molto rapida e attiva. Sono noti, infatti, per l'efficienza di biodegradazione, possono incrementare il tasso di decomposizione e influenzare la popolazione di altri organismi presenti nella lettiera in modo notevole (Dominguez et al. 2003);
- Specie endogeica: i lombrichi si trovano ad una profondità di 10-30 cm e si nutrono di composti organici e minerali;
- Specie anecica: i lombrichi scavano verticalmente arrivando fino a 2 m di profondità, ma poi risalgono in superficie per nutrirsi della lettiera in decomposizione, andando così a migliorare la qualità del suolo a causa della considerevole quantità di materia organica che viene in questo modo incorporata.

Tra tutti gli organismi presenti nell'ecosistema suolo, i lombrichi meritano particolare attenzione per il loro ruolo ecologico nella biocenosi del suolo. I lombrichi sono comuni in una vasta gamma di tipologie di suolo e possono rappresentare il 60-80% della biomassa totale (Mincarelli et al., 2019). Inoltre, sono permanentemente in stretto contatto con particelle di suolo e microrganismi presenti nel terreno, attraverso sia il derma altamente permeabile sia il tratto alimentare (Roubalová et al., 2015). Proprio a causa dell'importanza ecologica dei lombrichi, della loro elevata biomassa e della loro sensibilità all'inquinamento ambientale, sono stati identificati come organismi modello per la valutazione dei rischi ecotossicologici degli inquinanti negli ecosistemi terrestri (Sun et al., 2021).

Inoltre, molte specie sono facilmente allevabili e identificabili, per cui sono state prese come riferimento dalla comunità internazionale per lo studio dell'impatto ambientale di

contaminanti di origine antropica, come pesticidi, idrocarburi e metalli pesanti (Mincarelli et al., 2019).

Per la valutazione degli effetti ecotossicologici delle plastiche sul biota del suolo, le specie più utilizzate sono *Lombricus terrestris*, *Eisenia andrei* e *Eisenia fetida* (Liwarska-Bizukojc, 2021).

1.4.1 *Eisenia fetida*

Eisenia fetida, una delle specie terrestri più diffuse, è un lombrico appartenente al Phylum degli Anellida, Classe Clitellata, Sottoclasse Oligochaeta, Ordine Haplotaxida, Famiglia Lumbricidae (Wang, et. al., 2015). È facilmente riconoscibile grazie al suo aspetto striato a bande larghe alternate di colore rosso-marrone scuro o bande più strette di colore rosa pallido. In media raggiunge dimensioni dai 2-6 mm di larghezza e dai 26-130 di lunghezza e in individui adulti e sessualmente maturi, ovvero quando capaci di generare le tipiche uova definite *cocoons*, troviamo la presenza evidente del clitello (Singh, et. al., 2020).

E. fetida è un lombrico epigeico che ricopre un ruolo rilevante nell'ecologia del suolo, essendo in grado di trasformare giornalmente la lettiera vegetale in nutrienti disponibili per le piante in quantità superiore al proprio peso (Sharma et al., 2018; Srivastava et al., 2021).

Questa specie è utilizzata da molti anni per i test di tossicità perché può essere facilmente allevata su un'ampia varietà di rifiuti organici con tempi di generazione brevi (Pelosi et al., 2013; Roubalová et al., 2015).

Inoltre, per testare la tossicità dei residui di plastica biodegradabile sugli animali, generalmente vengono utilizzati i lombrichi da compost, tra cui *E. fetida* (Briassoulis et al., 2010).

Capitolo 2 MATERIALI E METODI

2.1 Bio-packaging

Il *bio-packaging* utilizzato per il processo di compostaggio è un prototipo indicato per la consegna delle bottiglie di vino, costituito da paglia compressa rivestita esternamente da un film bioplastico multistrato. Il film bioplastico è composto da copoliestere aromatico alifatico a base dei monomeri: 1,4-butandiolo, acido adipico e acido tereftalico nella catena polimerica, ed è caratterizzato da uno spessore totale di 50 μm (BASF, ecovio® M2351, Aprile 2016).



Figura 2-1: Bio-packaging di partenza da testare.

All'inizio delle prove discusse nella presente tesi il *bio-packaging* da testare è stato sminuzzato in pezzetti di grandezza approssimativa 2x5 cm per simulare le sollecitazioni meccaniche (quali triturazione, rivoltamento, vagliatura ecc...) previste dal processo di compostaggio industriale. In questo modo è stato possibile effettuare la misurazione del rapporto tra bioplastica e fibre di paglia, che era rispettivamente 1 a 5 (p/p).



Figura 2-2: Materiale da testare sminuzzato per la prova di compostaggio.

2.2 Compost

Il cumulo di compost è stato realizzato da un substrato di partenza costituito da una miscela di materiali organici, tutti vagliati e privi di bioplastiche. Il substrato misto (MS) comprende, in proporzione uguali, le seguenti matrici:

- scarti alimentari domestici della frazione organica, provenienti dalla raccolta differenziata urbana;
- scarti vegetali del mercato ortofrutticolo locale;
- scarti della manutenzione del verde urbano quali residui di potatura, ramaglie, erba e foglie.

2.3 Disegno sperimentale e analisi

Con il substrato misto è stato creato un cumulo di volume 1 m³, collocato su una piattaforma in cemento coperta da un tetto in legno impermeabile per ovviare all'eventuale presenza di precipitazioni durante la prova. Il cumulo è stato rivoltato durante la prima settimana e ad ogni campionamento per garantire un'areazione ottimale della massa.

Per monitorare la disintegrazione, il *bio-packaging* triturato è stato mescolato al substrato misto in percentuali diverse, rispettivamente al 2 e 6% p/p sul tal quale, o lasciato inalterato come controllo negativo. Ognuna di queste tre tesi è stata organizzata in 16 repliche rappresentate da sacche a rete con maglie 1 mm contenenti ciascuna l'equivalente di 1 kg di substrato secco.

Il cumulo è stato suddiviso in quattro strati principali, (denominati strati 1, 2, 3 e 4 dal basso verso l'alto), dove all'interno di ognuno sono state posizionate in modo casuale 12 sacche, (quattro controlli, quattro con *bio-packaging* al 2% e quattro al 6%), in modo tale che ad ogni tempo di prelievo e da ogni strato è stato possibile prelevare una sacca per tesi, per un totale di quattro repliche distruttive per tesi ad ogni prelievo.



Figura 2-3: Sacche di prova e costruzione del cumulo di compostaggio.

Tabella 2-1: Disegno sperimentale del test e della quantità di materiali in ogni sacca.

Tesi	Repliche	Sacche per tempo di prelievo	% campione in peso	Peso MS (g)	Peso bio-packaging (g)
Bio-packaging 2%	16	4	2%	980	20
Bio-packaging 6%	16	4	6%	940	60
Controllo	16	4	-	1000	-

Il compostaggio ha avuto una durata complessiva di 12 settimane (84 giorni) come previsto dalla normativa (UNI EN 13432:2002). I campionamenti sono stati effettuati rispettivamente a 21, 42, 63 e 84 giorni dall'inizio della prova per valutare la disintegrazione del materiale. Le misurazioni effettuate durante lo svolgimento del processo sono state eseguite per valutare l'ipotesi di disintegrazione accelerata, che rappresenterebbe un vantaggio per il materiale in esame visto che gli impianti industriali prevedono tempistiche inferiori rispetto gli standard citati.

Durante la prova è stata monitorata la temperatura per verificare con precisione il corretto andamento del compostaggio. Sono state collocate due sonde di temperatura per ogni strato, rispettivamente in posizione centrale e laterale del cumulo, in modo tale da poter stimare il potenziale gradiente di temperatura tra le due zone. Le sonde data logger impiegate registravano i valori ogni 15 minuti.

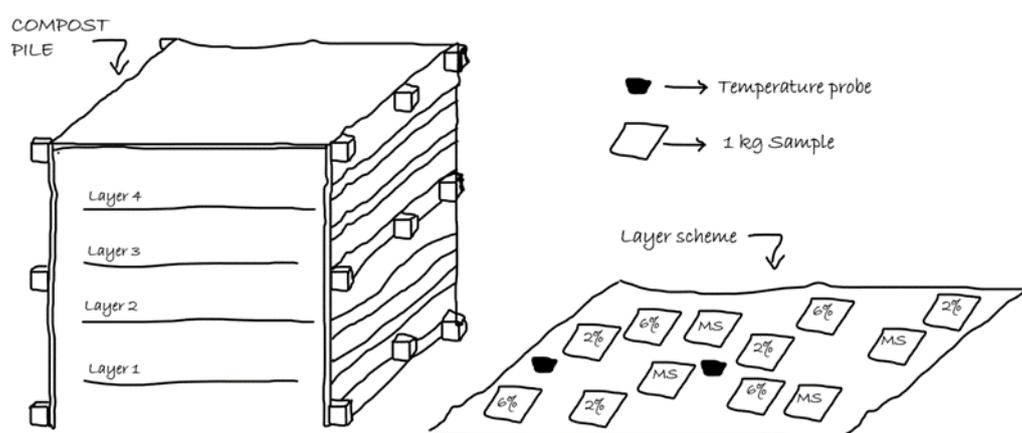


Figura 2-4: Disegno sperimentale del cumulo per il processo di compostaggio.

Ad ogni campionamento il contenuto del sacchetto è stato setacciato a 2 mm, pesato e confrontato con il campione iniziale per valutare il grado di disintegrazione della bioplastica da testare (secondo la UNI EN 16929:2021) con la seguente formula:

$$D = \frac{m_i - m_r}{m_i} \times 100$$

dove:

m_i rappresenta la massa secca iniziale della bioplastica;

m_r rappresenta la massa secca della bioplastica persistente con diametro > 2 mm.

2.4 Analisi del compost

2.4.1 Determinazione della sostanza organica

La determinazione della sostanza organica (metodo Walkley-Black) consiste nell'ossidazione del carbonio organico presente nel campione di suolo ad anidride carbonica, attraverso una soluzione di bicromato di potassio in ambiente acido.

L'analisi è stata effettuata in 6 repliche sui seguenti campioni: sul compost bianco, sul compost dalle tesi al 2 e al 6% di *bio-packaging* a fine compostaggio.

Il procedimento prevede diversi passaggi:

- a 0,25 g di compost secco stacciato a 2 mm sono stati aggiunti 20 ml di bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) 1 N e 20 ml di acido solforico (H_2SO_4) per rendere l'ambiente acido, facendoli percolare lentamente lungo le pareti della beuta;
- si lascia a riposo per 30 minuti, in cui avviene l'ossidazione e si sviluppa calore;
- la reazione viene poi bloccata con acqua deionizzata e vengono aggiunti acido fosforico (H_3PO_4) per evidenziare il viraggio e l'indicatore di fenilammina;
- titolare con sale di Mohr (sale di ferro ferroso) 0,5 N per determinare il bicromato in eccesso fino a viraggio da viola a verde.

Contemporaneamente è stata effettuata la prova in bianco per annullare la variazione del titolo del sale di Mohr, dato che con il tempo il Fe tende ad ossidarsi, attraverso la determinazione del fattore di correzione (rapporto tra ml teorici e ml reali).

Per calcolare la percentuale di sostanza organica è sufficiente moltiplicare il carbonio organico percentuale trovato per 1,72 (si considera sia in media il 58% della sostanza organica totale).



Figura 2-5: Differenza di colorazione tra campione con bicromato in eccesso e difenilammina (viola) e campione con sale di Mohr (verde).

2.4.2 Determinazione del pH

La misurazione è stata effettuata sul compost bianco e su quello al 2 e 6% di *bio-packaging* a fine processo di compostaggio. Il pH viene determinato per via potenziometrica, dopo la taratura dello strumento, nella sospensione compost fresco stacciato a 10 mm - CaCl_2 0,01 M in proporzione 1:10 (m/m). Agitare il campione con una bacchetta e lasciare a riposo per un'ora (Bundesgütegemeinschaft Kompost, 1994).

2.4.3 Determinazione del contenuto di metalli e microelementi

Gli elementi Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, Pb e Zn sono stati determinati seguendo il protocollo in acqua regia di Kasassi et al. (2008), con alcune modifiche: 0,5 g di compost secco e 2 ml di acido cloridrico (HCl) sono stati lasciati reagire *overnight*, poi è stato effettuato l'attacco acido aggiungendo 7 ml di acido nitrico (HNO_3). Le provette sono state poi posizionate in un bagno d'acqua preriscaldato (>85 °C) per 15 ore, al termine delle quali sono stati filtrati i campioni. L'analisi degli estratti è stata effettuata mediante spettrometria di emissione ottica al plasma accoppiato induttivamente (ICP-OES, Agilent mod. 5800).

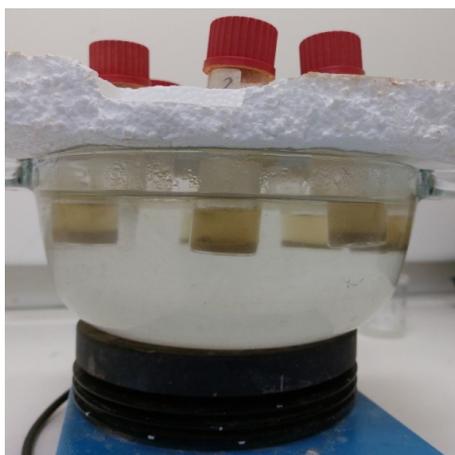


Figura 2-6: Campioni posizionati nel bagno d'acqua durante la prova.

2.5 Test ecotossicologici con *Eisenia fetida*

Lombrichi della specie *Eisenia fetida* sono stati acquistati dall'azienda "Lombricoltura Bella Farnia" (Sabaudia, LT, Italia), poi allevati in laboratorio ad una temperatura 20 ± 1 °C in contenitori con compost organico e alimentati con avena e ortaggi biologici. Gli adulti con clitello ben visibile (massa umida compresa tra i 300-600 mg) sono stati selezionati e acclimatati in terreno artificiale per una settimana (OECD, 2004).

Il suolo artificiale utilizzato per lo studio è stato preparato miscelando sabbia (70%), caolino (20%) e torba stacciata a 2 mm (10%). In seguito sono stati addizionati carbonato di calcio (CaCO_3) e acqua deionizzata per correggere il pH e regolare il contenuto di umidità. Secondo le analisi il terreno presentava le seguenti caratteristiche: contenuto di sostanza organica del 3,3%, 6,5 pH (H_2O), conducibilità elettrica di 2,6 dS/m, contenuto di nutrienti come N e P rispettivamente di 0,6 e 7,1 g/kg.

2.5.1 Avoidance test

L'*avoidance test* permette di valutare l'influenza di contaminanti e sostanze chimiche presenti nel suolo sul comportamento dei lombrichi. La prova è stata effettuata in cinque repliche seguendo le linee guida ISO (ISO 17512-1, 2008), in cui è stato messo a confronto il suolo artificiale e il compost ottenuto dagli 84 giorni di compostaggio aerobico precedentemente descritto in assenza di residui di bioplastica.

Sono stati utilizzati contenitori tester di circa 18x9x9 cm di dimensioni, separati inizialmente da un divisore in due sezioni uguali dove in una è stato introdotto il compost (250 g) e

nell'altra l'artificiale (250 g). Una volta rimosso il separatore sono stati posizionati 10 lombrichi adulti in corrispondenza della linea di confine delle due sezioni. Il contenitore è stato poi chiuso con un coperchio provvisto di piccoli fori, in modo tale da garantire gli scambi gassosi e al tempo stesso evitare la fuoriuscita dei lombrichi.

Dopo 48 ore è stato reinserto nuovamente il divisore ed è stata effettuata la conta dei lombrichi presenti nelle due metà.

I risultati sono espressi come Net Response (NR) secondo l'equazione:

$$NR = [(C - T)/N] * 100$$

dove C, T e N indicano rispettivamente il numero di lombrichi osservati nel substrato di controllo (ART), nel substrato trattato (compost) e in totale in ogni contenitore.

Una NR negativa indica che i lombrichi preferiscono il suolo testato mentre una NR positiva indica un comportamento di evitamento dello stesso.

2.5.2 Test di riproduzione

Il test di riproduzione è stato effettuato testando sei trattamenti:

- una tesi con terreno artificiale inalterato (A) utilizzato come controllo;
- due tesi, ovvero A2 e A6, in cui il terreno A è stato miscelato rispettivamente con tutti i residui di bioplastica provenienti dal compost al 2 e 6%, che rappresentavano quantitativamente lo 0,2 e 0,7% della miscela finale testata;
- tre tesi in cui al terreno A è stato aggiunto rispettivamente il 20% (C2), il 40% (C4) e l'80% (C8) di compost ottenuto dalle prove del 2 e 6 % esente da residui di bioplastiche superiori ai 2 mm opportunamente ed in egual misura mescolati insieme.

In questo modo è stato possibile valutare separatamente gli eventuali effetti dei residui del *bio-packaging* sopra vaglio di 2 mm o del compost ottenuto sui lombrichi.

L'analisi della capacità riproduttiva e di altri *endpoints* sub-letali (comportamento insolito e anomalie corporee) hanno seguito le linee guida OECD 222 (OECD, 2016). Sono state preparate tre repliche per ciascun trattamento; in ogni contenitore sono stati inseriti 500 g di substrato e 10 lombrichi adulti provvisti di clitello, prelevati e pesati individualmente prima dell'inizio del saggio. I mesocosmi, chiusi con coperto forato, sono stati posti all'interno di una camera termostata a 20 ± 1 °C e umidità del 60% per un totale di 56 giorni.

Trascorsi 28 giorni, i lombrichi adulti sopravvissuti sono stati pesati nuovamente e rimossi dai contenitori mentre il substrato contenente giovani e *cocoons* è stato incubato per altre quattro settimane nelle stesse condizioni.

Dopo 56 giorni, il substrato è stato setacciato e sono stati registrati i giovani e i *cocoons* per ogni replica. Il tasso di crescita (Growth Rate) è stato calcolato come variazione percentuale di peso tra l'inizio e la fine prova come segue:

$$GR = [(W_t - W_0)/W_0] * 100\%$$

dove W_0 indica il peso medio dei lombrichi ad inizio prova e W_t è il peso medio dei lombrichi dopo 28 giorni. Un tasso di crescita positivo indica un incremento di peso, al contrario un tasso negativo indica l'inibizione della crescita (Xie et al., 2013).

2.5.3 Comet assay

Una volta trascorsi i 28 giorni per la prova di riproduzione, un lombrico adulto di ciascuna replica è stato utilizzato per la valutazione della genotossicità attraverso il test di mutagenesi dell'elettroforesi su singola cellula (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) noto anche come Comet assay.

Il Comet assay è uno strumento semplice, sensibile e rapido per la valutazione del danno al DNA nelle singole cellule eucariotiche (Dhawan et al., 2009) ed è ampiamente utilizzato in ecotossicologia poiché permette di rilevare le rotture della catena del DNA (Mincarelli et al., 2016; Tice et al., 2000; Vischetti et al., 2020).

In breve, il protocollo dell'analisi prevede:

- preparazione della soluzione di estrusione costituita da 5% di etanolo, 95% di fosfato salino (PBS), 2,5 mg/ml di sale disodico etilendiaminotetracetico diidrato ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) e 10 mg/ml di glicol gliceril etere, poi stabilizzata a pH 7,3 con idrossido di sodio (NaOH);
- immergere ogni lombrico in 5 ml di soluzione per 4 minuti a temperatura ambiente, così da garantire l'estrusione dei celemociti;

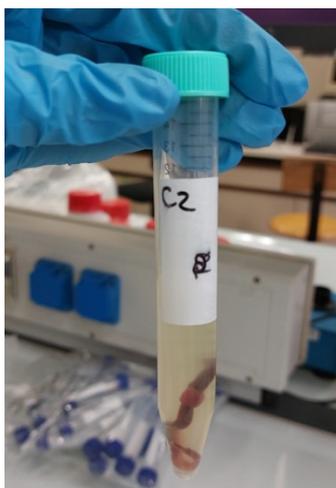


Figura 2-7: Lombrico immerso nella soluzione di estrusione.

- si procede poi alla rimozione dei lombrichi e alla centrifugazione del mezzo (300 rpm, 10 minuti, 4 °C) per raccogliere i celemociti. Eliminato il surnatante, i celemociti appartenenti ai lombrichi di una stessa prova vengono uniti e lavati con PBS 1x per due volte;
- le cellule lavate sono state contate tramite microscopio, risospese in agarosio (LMA 1%) a 37 °C e stratificate su vetrini HT Trevigen pre-rivestiti con 1% di agarosio (NMA 1%). Ogni spot è prodotto stratificando 35 μ l di agarosio LMA contenente 3000 cellule, ciascun campione stratificato in tre repliche;



Figura 2-8: Conta delle cellule al microscopio.



Figura 2-9: Cellule da testare stratificate su vetrini pre-rivestiti con agarosio.

- dopo la solidificazione dell'agarosio (al buio, per 10 minuti, a 4 °C) i vetrini sono stati immersi in una soluzione di lisi alcalina (pH 10) costituita da cloruro di sodio (NaCl) 2,5 mol/L, sale disodico EDTA (Na₂-EDTA) 0,1 mol/L, tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (Tris-HCl) 10 mmol/L, dimetilsolfossido (DMSO) al 10% e Triton X-1000 1% (tensioattivo non ionico) e mantenuti a 4 °C per almeno un'ora (Mincarelli et al., 2016);
- prima dell'elettroforesi, lasciare i vetrini in unwinding per 20 minuti, al buio, a 4 °C, in un buffer elettroforetico alcalino a pH 13 (1 mmol/L EDTA e 300 mmol/L NaOH);
- l'elettroforesi è stata condotta a 11 V/cm per 20 minuti in una stanza refrigerata a 4°C;
- i vetrini sono stati prima lavati in acqua per 10 secondi, poi in un buffer di neutralizzazione per 5 minuti (0.4 M Tris-HCl stabilizzato a pH 7.5) e infine disidratati in metanolo al 75% per 10 secondi (Valverde et al., 1999; Mincarelli et al., 2016).

Successivamente i vetrini sono stati colorati con Sybr Gold e sono state acquisite automaticamente le immagini utilizzando un microscopio automatizzato Lionheart FX. Le osservazioni sono state eseguite con un ingrandimento di 200×. Sono state acquisite immagini delle comete per ciascun trattamento, poi elaborate con un apposito software appositamente creato in grado di rilevare automaticamente la cometa e calcolare i principali indici di danneggiamento del DNA: la lunghezza della coda della cometa (TL), il momento della coda (TM) e l'intensità della coda (TI) (Tiano et al., 2005; Orlando et al., 2018).

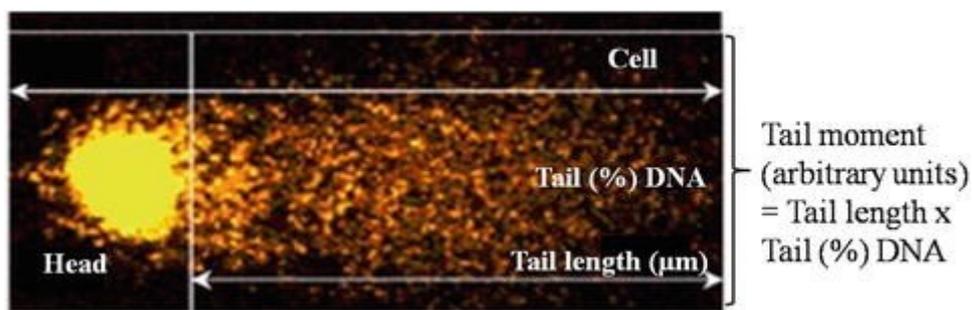


Figura 2-10: Parametri valutati con il Comet assay.

Fonte: Bajpayee et al., 2013. The comet assay: assessment of in vitro and in vivo DNA damage. *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols*, 325-345.

2.6 Analisi statistica

Differenze significative ($\alpha = 0,05$) tra i trattamenti nei test applicati sono state valutate utilizzando il test parametrico post-hoc di Tukey in cui sono state rispettate le ipotesi ANOVA; in altri casi sono stati utilizzati i test non parametrici di Kruskal-Wallis e di Dunn post-hoc. I trattamenti che non condividono alcuna lettera sono significativamente diversi. Quando non sono state riportate le lettere minuscole, non sono state riscontrate differenze statistiche tra i gruppi.

Capitolo 3 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Test di compostaggio e disintegrazione bioplastica

La figura 3-1 mostra l'andamento della temperatura registrata da ciascuna sonda durante gli 84 giorni del processo di compostaggio. Si notano bruschi cali della temperatura in corrispondenza dei rivoltamenti e dei campionamenti.

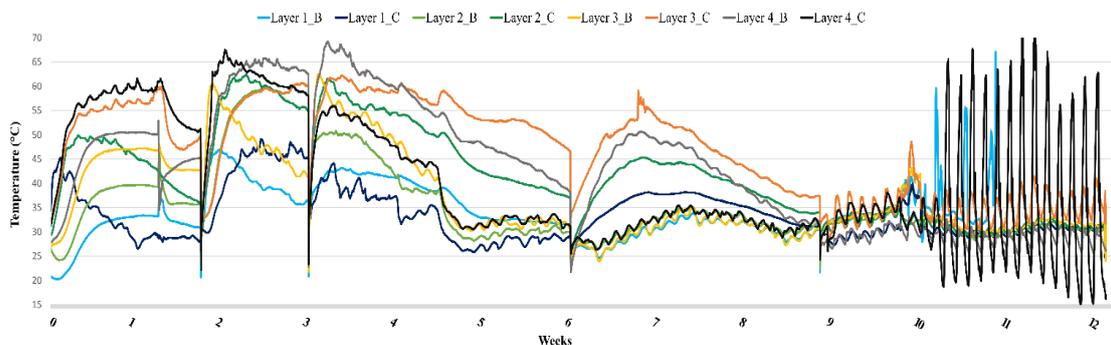


Figura 3-1: Temperature registrate in ogni strato del cumulo dall'inizio (27 aprile) alla fine (20 luglio) del compostaggio. I codici B e C fanno riferimento alle sonde posizionate rispettivamente al bordo del cumulo o in posizione centrale.

Sebbene siano stati rilevati andamenti di temperatura molto variabili tra la parte più esterna (sonde al bordo B) e la parte più interna (sonde al centro C) del cumulo, si può notare che in tutti gli strati siano stati raggiunti i 60 °C per almeno due settimane, valore soglia per l'attivazione dei processi di degradazione come descritto dalla normativa.

In tabella 3-1 sono riportati i valori di disintegrazione misurati ad ogni tempo di campionamento.

Tabella 3-1: Valori di disintegrazione misurati per ciascuna prova ad ogni tempo di campionamento.

Tempo di campionamento (giorni)	Disintegrazione bioplastica (%)	
	2 % bio-packaging	6 % bio-packaging
21	87,10 ± 8,60	90,05 ± 0,98
42	90,70 ± 1,46	90,31 ± 1,63
63	92,28 ± 1,80	92,00 ± 5,61
84	91,41 ± 2,98	93,13 ± 2,17

Come si evince dalla tabella, in entrambe le tesi sono stati raggiunti valori vicini al 90% già al primo tempo di campionamento. Lo standard prevede il superamento del 90% di disintegrazione al termine del compostaggio, parametro acquisito in entrambe le tesi a partire dal secondo tempo di campionamento ovvero a 42 giorni.

3.2 Analisi del compost

In tabella 3-2 sono riportati i risultati delle analisi dei metalli pesanti e microelementi effettuate sul compost prelevato dalle sacche di controllo (MS) e dalle sacche di prova con il 2 e il 6% di *bio-packaging* al termine del processo di compostaggio. I metalli Pb, Cd, Cu, Ni, Zn e Hg sono stati trovati in concentrazioni inferiori alle soglie indicate dal Decreto Legislativo del 2010 (Gazzetta Ufficiale 75/2010).

Tabella 3-2: Analisi degli elementi nel compost al termine del processo di compostaggio.

Trattamenti	Elementi (mg kg ⁻¹)									
	Cd	Cr	Cu	Fe	K	Mn	Ni	Pb	Zn	Hg
MS	<0,01	38,72	40,59	6849,1	21770,5	252,5	36,58	5,74	116,9	0,04
2%	<0,01	32,27	37,49	6265,7	23510,3	237,7	31,48	5,04	119,6	0,03
6%	<0,01	43,92	35,84	6465,7	20362,0	238,3	33,63	4,59	112,8	0,05

In tabella 3-3 sono indicati i valori della sostanza organica rilevata nei diversi trattamenti al termine del processo di compostaggio. Non sono state riscontrate differenze significative del contenuto di sostanza organica tra il compost bianco e quello con il 2 e il 6% di *bio-packaging*.

Tabella 3-3: Contenuto di sostanza organica (%) del compost nei diversi trattamenti.

Trattamenti	Repliche	Media	Deviazione standard
MS	6	20,14	5,73
2%	6	18,89	1,71
6%	6	19,78	1,78

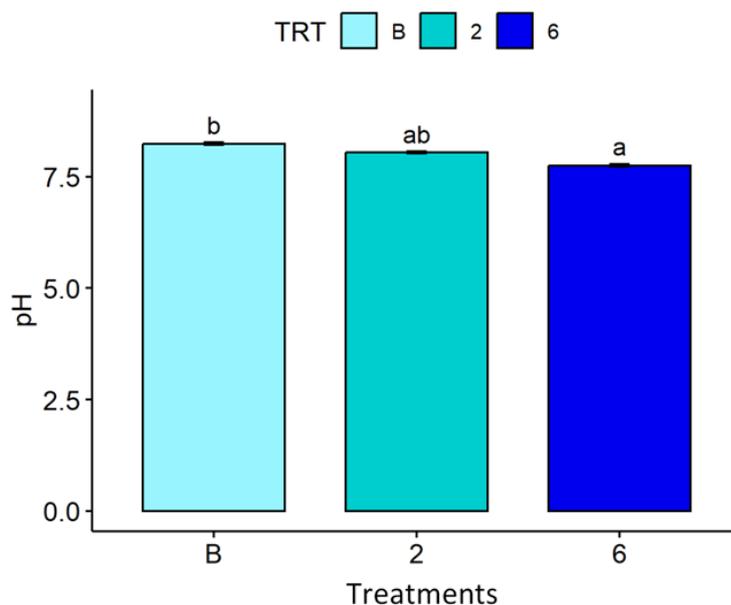


Figura 3-2: Valori di pH in CaCl₂ del compost bianco (B) e del compost con il 2% (2) e 6% (6) di bio-packaging a fine processo di compostaggio. Diverse lettere minuscole rappresentano differenze significative tra i trattamenti.

Come emerge dalla figura 3-2, ci sono differenze significative di pH tra il compost bianco e il compost con il 6% di *bio-packaging*. In particolare, si può notare come il pH scenda all'aumentare della concentrazione delle bioplastiche nel compost. Tuttavia i valori di pH registrati sono intorno a 8 in tutti i campioni e il compost non presentava odori sgradevoli; pertanto sono stati raggiunti gli standard richiesti (UNI CEN/TS 16202:2013).

Inoltre, sui campioni di compost bianco sono stati determinati anche altri parametri quali N (21,2 g kg⁻¹), P (3,65 g kg⁻¹) e conducibilità elettrica (8,58 dS m⁻¹).

3.3 Avoidance test

I risultati dell'avoidance test preliminare indicano un NR medio del $70 \pm 29,2$ % (mediana 80%), che dimostra che i lombrichi preferiscono il terreno artificiale al compost, con un tasso di evitamento dell' $85 \pm 14,6$ % (mediana 90%). Infatti, secondo la normativa (ISO-17512-1, 2008) valori di NR superiori al 70% indicano che il substrato in esame rappresenta un habitat non idoneo per i lombrichi: questo suggerisce che nel compost c'è qualcosa di nocivo.

Confrontando le caratteristiche del terreno e del compost derivanti dalle analisi svolte, è stata riscontrata un'elevata salinità del compost di 8,58 dS m⁻¹ come riportato nel paragrafo precedente. A questo proposito, uno studio di Owojori et al., (2009) ha evidenziato come i lombrichi della specie *E. fetida* iniziano a morire con valori di salinità a partire da 1,3 dS m⁻¹, individuando come valore soglia: 2 dS m⁻¹ (Owojori et al., 2008). E' quindi possibile che i valori molto elevati di NR riscontrati nell'esperimento possano essere dovuti all'elevata salinità del compost utilizzato.

3.4 Test di riproduzione

Con la prova di riproduzione è stato possibile confrontare singolarmente gli effetti del compost ottenuto e dei residui sopra i 2 mm del *bio-packaging*.

Nella figura 3-3 sono riportati i pesi medi dei lombrichi adulti ad inizio e al termine della prova (giorno 28) per ogni tesi. Mentre nella tabella 3-4 vengono riportati i valori di tasso di crescita (GR).

Tabella 3-4: Growth Rate dei lombrichi per ogni tesi a dopo 28 giorni di esposizione.

GR (%)	Trattamenti					
	A	A2	A6	C2	C4	C8
	-11,83 ±	-11,34 ±	-10,61 ±	0,85 ±	-7,09 ±	-3,36 ±
	2,47	1,18	2,83	3,44	2,41	5,39

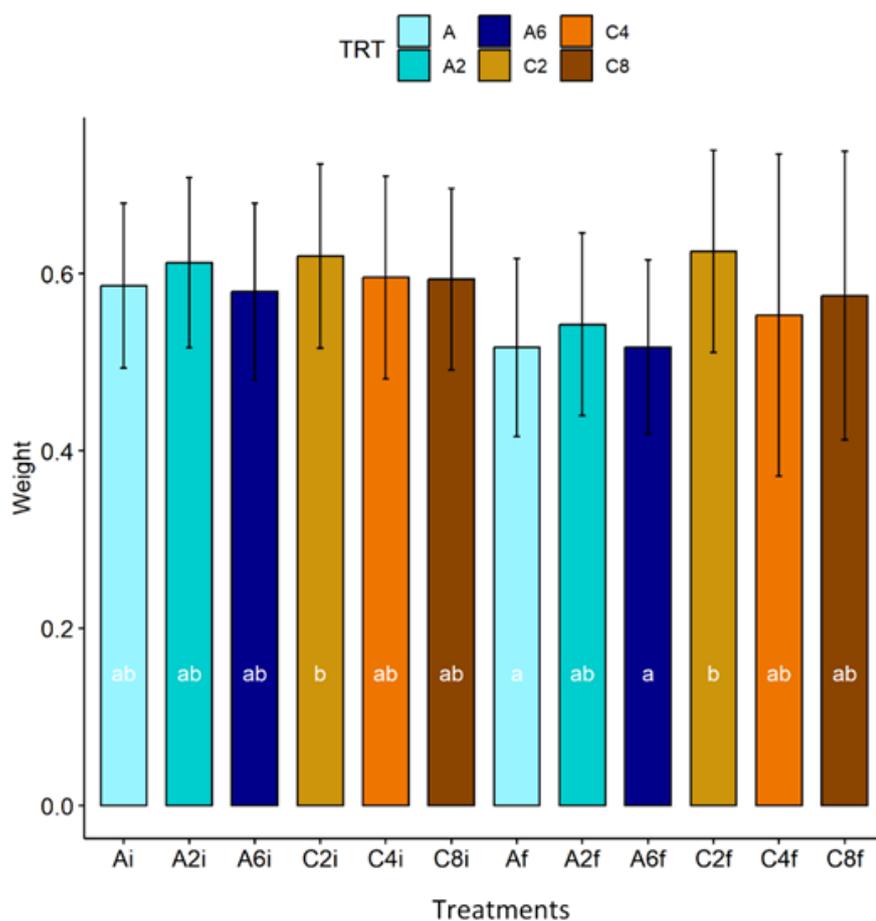


Figura 3-3: Pesi medi dei lombrichi per ogni tesi.

A: artificiale; A2: artificiale con 2 % di bioplastiche; A6: artificiale con 6 % di bioplastiche; C2: artificiale con 20 % di compost; C4: artificiale con 40 % di compost; C8: artificiale con 80 % di compost a inizio (“i”) e fine prova (“f”).

L’analisi statistica non ha evidenziato differenze significative del Growth Rate (GR) tra le varie tesi e solo nella prova con l’80% di compost sono stati registrati dei morti, con una mortalità media stimata del 13,33%. Probabilmente l’elevata presenza di sostanza organica nel compost ha consentito la sopravvivenza e la crescita di una parte dei lombrichi. Infatti, nel caso del compost addizionato alla dose minore (20%) è stato misurato un Growth Rate positivo, sebbene non ci siano differenze statistiche.

A seguire sono riportati i grafici della risposta riproduttiva dei lombrichi per ciascun trattamento come la produzione di *cocoons*, il numero di giovani e la fertilità rilevati a 56 giorni.

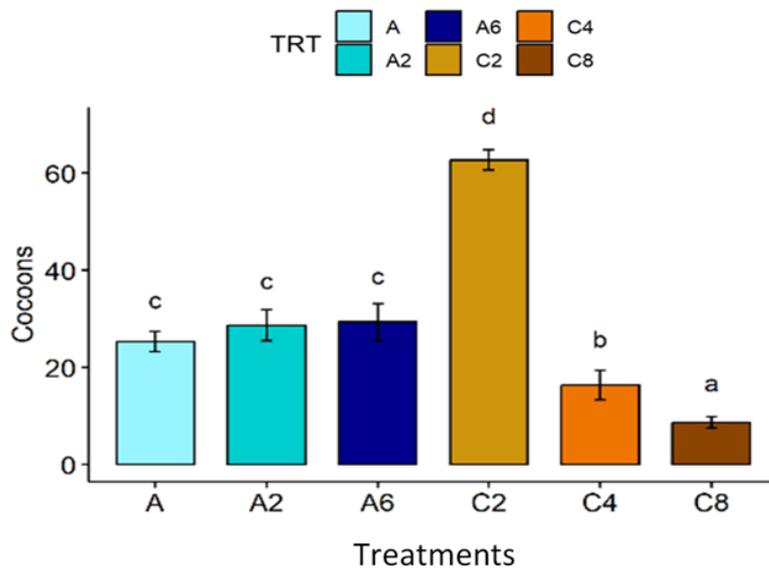


Figura 3-4: Cocoons rilevati dalla prova di riproduzione a 56 giorni.

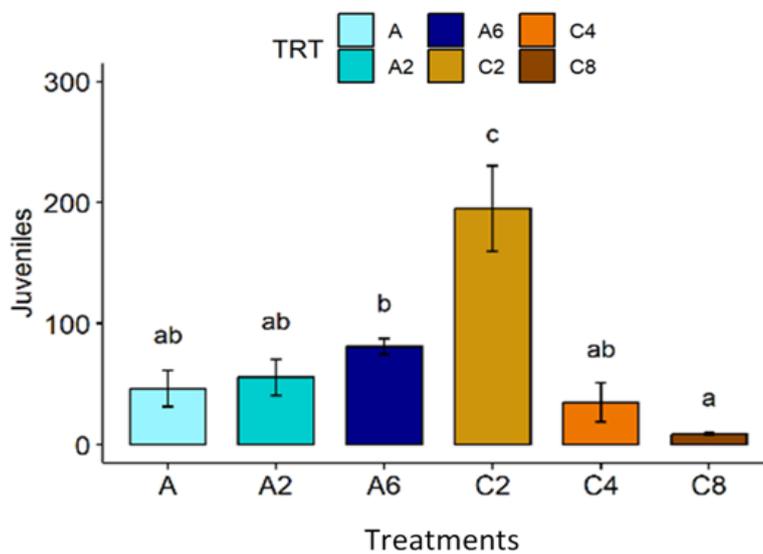


Figura 3-5: Giovani rilevati dalla prova di riproduzione a 56 giorni.

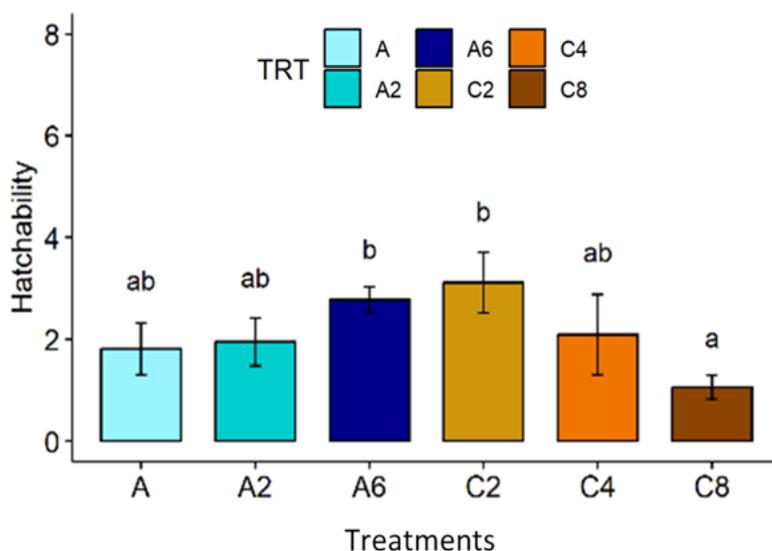


Figura 3-: Valori di schiusura o fertilità rilevati dalla prova di riproduzione a 56 giorni.

I risultati evidenziano come l'attività riproduttiva di *E. fetida* sia significativamente influenzata dalla concentrazione di compost all'interno delle prove. Si può notare come la tesi con il 20% di compost presenta un numero di *cocoons* assai maggiore rispetto il suolo artificiale con o senza bioplastiche (tra cui non vi è nessuna distinzione evidente) e ai trattamenti con il 40 e 80% di compost nei quali la quantità di *cocoons* è drasticamente ridotta in modo proporzionale alla dose. La figura 3-7 mostra la quantità di *cocoons* presenti nelle varie prove, confermando a livello visivo quanto descritto nella figura 3-4.

Questo esito sembrerebbe confermare la tossicità del compost per i lombrichi a dosi elevate, mentre non risulta alcun effetto delle bioplastiche sulla produzione di *cocoons* rispetto al terreno artificiale di controllo.

La tesi con la dose inferiore di compost risulta avere un effetto positivo anche per quanto riguarda il numero dei giovani, mentre nel parametro di schiusura tende ad avvicinarsi al valore registrato negli altri trattamenti. Si noti come i risultati dell'attività riproduttiva della tesi con l'80% di compost siano i più bassi in tutte le prove.

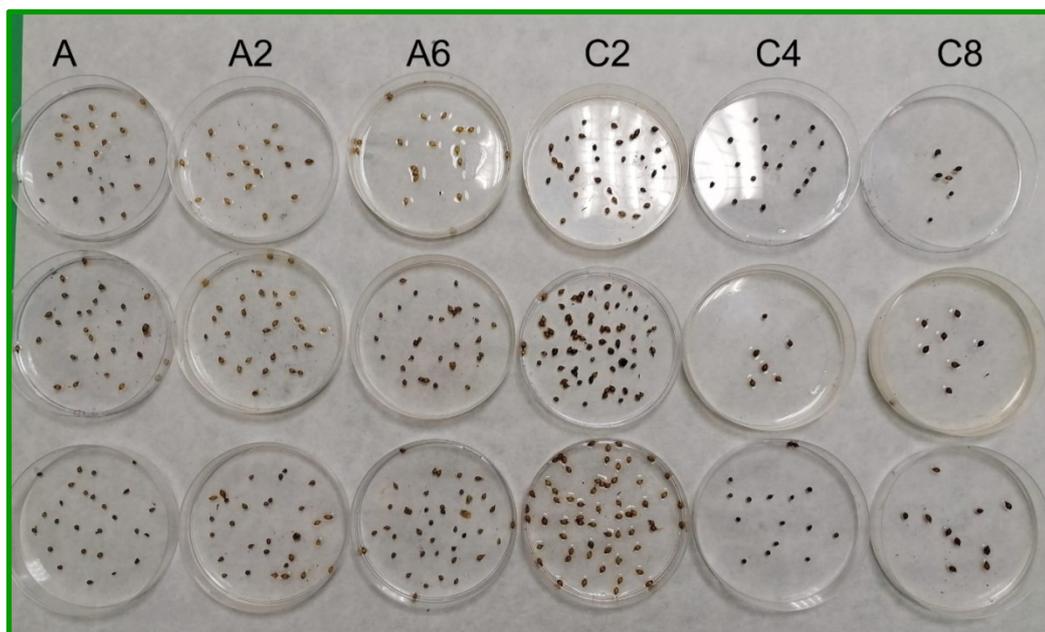


Figura 3-7: Totale dei cocoons rinvenuti a 56 giorni nei vari trattamenti.

3.5 Comet assay

La figura 3-8 mostra i valori di *Tail Length* indicativi del danno genotossico misurato con Comet assay sui celomociti di lombrichi dopo 28 giorni di esposizione.

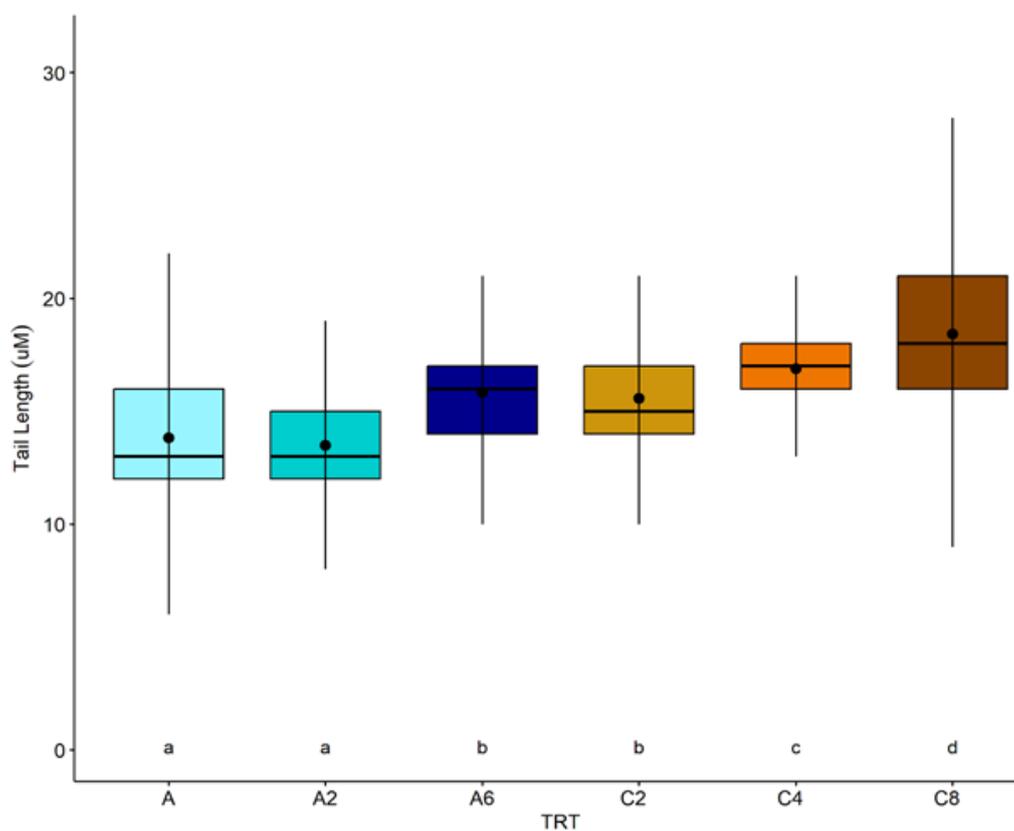


Figura 3-8: Tail Length misurata nei celomociti dei lombrichi da ciascun trattamento dopo 28 giorni di esposizione. Diverse lettere minuscole rappresentano differenze significative tra i trattamenti ($\alpha = 0,05$) secondo il test parametrico ANOVA-Tukey. Legenda codici trattamenti: terreno artificiale (A), terreno artificiale con bio-packaging a concentrazione minore (A2), terreno artificiale con bio-packaging a concentrazione maggiore (A6), terreno artificiale con 20% compost (C2), terreno artificiale con 40 % compost (C4), terreno artificiale con l'80% di compost

Dalla figura 3-8 si nota una tendenza dose-dipendente del compost in termini di danno al DNA. Secondo questo parametro sensibile una certa risposta di danno è osservabile anche nei lombrichi sottoposti a presenza di residui di *bio-packaging* addizionati allo 0,7% (A6) rispetto al controllo e alla tesi A2.

CONCLUSIONI

Il presente esperimento ha permesso di valutare la disintegrabilità di un *bio-packaging* appositamente ideato per il trasporto di bottiglie di vino. Questo parametro è risultato ottimale e sempre superiore al 90% in entrambe le tesi con il 2% e il 6% di *bio-packaging* addizionato al compost, come previsto nella norma UNI EN 13432:2002.

Le prove ecotossicologiche condotte con l'organismo sentinella *Eisenia fetida* hanno permesso di rilevare una scarsa o nulla ecotossicità dei frammenti di *bio-packaging* derivanti dalla disintegrazione, in termini di fertilità, mentre osservando il parametro più sensibile riguardante i danni genotossici, è stato misurato un effetto negativo nei lombrichi esposti ai residui di *bio-packaging* alla dose più alta testata.

Il compost addizionato al suolo controllo a diverse dosi ha avuto un effetto molto diverso sul lombrico, risultando stimolante per la riproduzione alla dose del 20% e inibente in maniera proporzionale alle dosi del 40 e dell'80%, il test del Comet assay ha mostrato invece un chiaro andamento dose-risposta.

Il *bio-packaging* testato a queste concentrazioni e dimensioni su suolo artificiale sembra non avere impatti negativi sull'attività riproduttiva dei lombrichi, nonostante questo alla dose maggiore testata si nota un principio di danno a livello del DNA, sarebbero dunque auspicabili ulteriori studi anche per quanto riguarda gli eventuali residui di dimensioni minori che potrebbero essere presenti nel compost.

RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato, mi è doveroso ringraziare tutti coloro che mi hanno sostenuto durante il mio percorso universitario e nella realizzazione della presente tesi.

Vorrei innanzitutto ringraziare il mio relatore, il Prof. Costantino Vischetti, che mi ha guidato nella stesura di questa tesi, fin dalla scelta dell'argomento, sempre con infinita disponibilità e attenzione.

Un sentito ringraziamento alla mia correlatrice, la Dott.ssa Arianna De Bernardi, che mi ha seguito in questi mesi passo dopo passo, sempre con gentilezza e puntualità, chiarendo costantemente ogni mia incertezza.

Grazie anche alle Dott.sse Enrica Marini e Francesca Tagliabue per le giuste indicazioni fornite.

Ringrazio la mia famiglia per avermi dato la possibilità di seguire i miei sogni e mi ha sempre supportato in tutte le scelte intraprese.

Ringrazio i miei amici più cari che sono il mio porto sicuro.

Desidero esprimere la mia sincera gratitudine ai miei colleghi di corso, che mi hanno continuamente aiutato e motivato a fare sempre meglio durante questi anni di studio.

BIBLIOGRAFIA

Adani, F., Genevini, P. L., Gasperi, F., & Tambone, F. (1999). Composting and humification. *Compost Science & Utilization*, 7(1), 24-33.

Albertsson, A. C. (1980). The shape of the biodegradation curve for low and high density polyethenes in prolonged series of experiments. *European Polymer Journal*, 16(7), 623-630.

Ammala A, Bateman S, Dean K, Petinakis E, Sangwan P, Wong S, et al. An overview of degradable and biodegradable polyolefins. *Prog Polym Sci* 2011;36(8):1015e49.

Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 62(8), 1596-1605.

Andrady, A.L., Neal, M.A., 2009. Applications and societal benefits of plastics. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 1977–1984.

Arkatkar, A., Arutchelvi, J., Bhaduri, S., Uppara, P. V., & Doble, M. (2009). Degradation of unpretreated and thermally pretreated polypropylene by soil consortia. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(1), 106-111.

Auta, H. S., Emenike, C. U., & Fauziah, S. H. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment international*, 102, 165-176.

Bandini, F., Taskin, E., Bellotti, G., Vaccari, F., Misci, C., Guerrieri, M. C., ... & Puglisi, E. (2022a). The treatment of the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) as a possible source of micro-and nano-plastics and bioplastics in agroecosystems: a review. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 9(1), 1-17.

Bandini, F., Taskin, E., Vaccari, F., Soldano, M., Piccinini, S., Frache, A., ... & Puglisi, E. (2022b). Anaerobic digestion and aerobic composting of rigid biopolymers in bio-waste treatment: fate and effects on the final compost. *Bioresource Technology*, 351, 126934.

Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 1985–1998.

Bläsing, M., & Amelung, W. (2018). Plastics in soil: Analytical methods and possible sources. *Science of the total environment*, 612, 422-435.

Bour, A., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L., & Pinelli, E. (2015). Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: a review. *Journal of hazardous materials*, 283, 764-777.

Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., & Thompson, R. (2011). Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. *Environmental science & technology*, 45(21), 9175-9179.

Briassoulis, D., Dejean, C., & Picuno, P. (2010). Critical review of norms and standards for biodegradable agricultural plastics part II: Composting. *Journal of Polymers and the Environment*, 18, 364-383.

Calabrò, P. S., & Grosso, M. (2018). Bioplastics and waste management. *Waste Management*, 78, 800-801.

Cao, D., Wang, X., Luo, X., Liu, G., & Zheng, H. (2017, April). Effects of polystyrene microplastics on the fitness of earthworms in an agricultural soil. In *IOP conference series: earth and environmental science* (Vol. 61, No. 1, p. 012148). IOP Publishing.

Carbery, M., O'Connor, W., & Palanisami, T. (2018). Trophic transfer of microplastics and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health. *Environment international*, 115, 400-409.

Chang, X., Xue, Y., Li, J., Zou, L., Tang, M., 2020. Potential health impact of environmental micro- and nano-plastics pollution. *J. Appl. Toxicol.* 40, 4e15.

Chen, X., Xiong, X., Jiang, X., Shi, H., & Wu, C. (2019). Sinking of floating plastic debris caused by biofilm development in a freshwater lake. *Chemosphere*, 222, 856-864.

Cheng, Y., Song, W., Tian, H., Zhang, K., Li, B., Du, Z., ... & Zhu, L. (2021). The effects of high-density polyethylene and polypropylene microplastics on the soil and earthworm *Metaphire guillelmi* gut microbiota. *Chemosphere*, 267, 129219.

Chiumenti, R., & Chiumenti, A. (2002). La tecnologia del compostaggio.

Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental science & technology*, 47(12), 6646-6655.

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine pollution bulletin*, 62(12), 2588-2597.

Conti, G. O., Ferrante, M., Banni, M., Favara, C., Nicolosi, I., Cristaldi, A., ... & Zuccarello, P. (2020). Micro-and nano-plastics in edible fruit and vegetables. The first diet risks assessment for the general population. *Environmental Research*, 187, 109677.

Dauvergne, P. (2018). Why is the global governance of plastic failing the oceans?. *Global Environmental Change*, 51, 22-31.

De Bernardi, A., Marini, E., Casucci, C., Tiano, L., Marcheggiani, F., & Vischetti, C. (2022). Copper Monitoring in Vineyard Soils of Central Italy Subjected to Three Antifungal Treatments, and Effects of Sub-Lethal Copper Doses on the Earthworm *Eisenia fetida*. *Toxics*, 10(6), 310.

De Bertoldi, M. D., Vallini, G., & Pera, A. (1983). The biology of composting: a review. *Waste Management & Research*, 1(2), 157-176.

Dhawan, A., Bajpayee, M., & Parmar, D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell biology and toxicology*, 25, 5-32.

Derraik, J. G. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine pollution bulletin*, 44(9), 842-852.

Ding, W., Li, Z., Qi, R., Jones, D. L., Liu, Q., Liu, Q., & Yan, C. (2021). Effect thresholds for the earthworm *Eisenia fetida*: Toxicity comparison between conventional and biodegradable microplastics. *Science of the Total Environment*, 781, 146884.

Domene, X., Solà, L., Ramírez, W., Alcañiz, J. M., & Andrés, P. (2011). Soil bioassays as tools for sludge compost quality assessment. *Waste Management*, 31(3), 512-522.

Domínguez, J., Parmelee, R. W., & Edwards, C. A. (2003). Interactions between *Eisenia andrei* (Oligochaeta) and nematode populations during vermicomposting. *Pedobiologia*, 47(1), 53-60.

do Sul, J. A. I., & Costa, M. F. (2014). The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental pollution*, 185, 352-364.

Espi, E., Salmerón, A., Fontecha, A., García, Y., & Real, A. I. (2006). Plastic films for agricultural applications. *Journal of Plastic Film & Sheeting*, 22(2), 85-102.

Forbes, T. L. (1993). *Ecotoxicology in theory and practice*. Springer Science & Business Media.

Frits, J. (2006). Ecotoxicological Aspects in the Biodegradation Process of Polymers. *Handbook of Biodegradable Polymers*.

Gabbott, S., Key, S., Russell, C., Yonan, Y., & Zalasiewicz, J. (2020). The geography and geology of plastics: Their environmental distribution and fate. In *Plastic Waste and Recycling* (pp. 33-63). Academic Press.

- Gall, S. C., & Thompson, R. C. (2015). The impact of debris on marine life. *Marine pollution bulletin*, 92(1-2), 170-179.
- Galloway, T. S. (2015). Micro-and nano-plastics and human health. *Marine anthropogenic litter*, 343-366.
- Gedde, U. L. F. (1995). *Polymer physics*. Springer Science & Business Media. (pp. 1)
- Geyer, R. (2020). Production, use, and fate of synthetic polymers. In *Plastic waste and recycling* (pp. 13-32). Academic Press.
- Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* 3 (7), e1700782.
- Gironi, F., & Piemonte, V. (2011). Bioplastics and petroleum-based plastics: strengths and weaknesses. *Energy sources, part a: recovery, utilization, and environmental effects*, 33(21), 1949-1959.
- Gomez, A. (1998). The evaluation of compost quality. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 17(5), 310-314.
- Gu, J. D. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International biodeterioration & biodegradation*, 52(2), 69-91.
- Favoino, E., & Hogg, D. (2008). The potential role of compost in reducing greenhouse gases. *Waste Management & Research*, 26(1), 61-69.
- Hahladakis, J. N., & Iacovidou, E. (2018). Closing the loop on plastic packaging materials: What is quality and how does it affect their circularity?. *Science of the Total Environment*, 630, 1394-1400.

Horton, A. A., Svendsen, C., Williams, R. J., Spurgeon, D. J., & Lahive, E. (2017a). Large microplastic particles in sediments of tributaries of the River Thames, UK—Abundance, sources and methods for effective quantification. *Marine pollution bulletin*, *114*(1), 218-226.

Horton, A.A., Walton, A., Spurgeon, D.J., Lahive, E., Svendsen, C., 2017b. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Sci. Total Environ.* *586*, 127–141.

Huang, Y., Liu, Q., Jia, W., Yan, C., & Wang, J. (2020). Agricultural plastic mulching as a source of microplastics in the terrestrial environment. *Environmental Pollution*, *260*, 114096.

Huang, C., Ge, Y., Yue, S., Qiao, Y., & Liu, L. (2021). Impact of soil metals on earthworm communities from the perspectives of earthworm ecotypes and metal bioaccumulation. *Journal of Hazardous Materials*, *406*, 124738.

Huerta Lwanga, E., Gertsen, H., Gooren, H., Peters, P., Salánki, T., Van Der Ploeg, M., ... & Geissen, V. (2016). Microplastics in the terrestrial ecosystem: implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Environmental science & technology*, *50*(5), 2685-2691.

Insam, H., & De Bertoldi, M. (2007). Microbiology of the composting process. In *Waste management series* (Vol. 8, pp. 25-48). Elsevier.

ISO 17512-1, Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*), 2008.

ISO 16929:2021, Plastics - Determination of the degree of disintegration of plastic materials under defined composting conditions in a pilot-scale test.

Unraveling consequences of soil micro-and nano-plastic pollution on soil-plant system: Implications for nitrogen (N) cycling and soil microbial activity. *Chemosphere*, *260*, 127578.
Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., ... & Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, *347*(6223), 768-771.

Kabasci, S. (2020). Biobased plastics. In *Plastic waste and recycling* (pp. 67-96). Academic Press.

Kale, G., Auras, R., & Singh, S. P. (2007). Comparison of the degradability of poly (lactide) packages in composting and ambient exposure conditions. *Packaging Technology and Science: An International Journal*, 20(1), 49-70.

Kapanen, A., & Itävaara, M. (2001). Ecotoxicity tests for compost applications. *Ecotoxicology and environmental safety*, 49(1), 1-16.

Kasassi A., Rakimbei P., Karagiannidis A., Zabaniotou A., Tsiouvaras K. e Nastis, A., Soil contamination by heavy metals: Measurements from a closed unlined landfill, 2008.

Koelmans, A.A., Besseling, E., Shim, W.J., 2015. Nanoplastics in the aquatic environment. Critical review. In: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), *Marine Anthropogenic Litter*. Springer International Publishing, Cham, pp. 325–340

Kole, P. J., Löhr, A. J., Van Belleghem, F. G., & Ragas, A. M. (2017). Wear and tear of tyres: a stealthy source of microplastics in the environment. *International journal of environmental research and public health*, 14(10), 1265.

Krueger, M. C., Harms, H., & Schlosser, D. (2015). Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 8857-8874.

Laist, D. W. (1997). Impacts of marine debris: entanglement of marine life in marine debris including a comprehensive list of species with entanglement and ingestion records. *Marine debris: sources, impacts, and solutions*, 99-139.

Lavers, J. L., & Bond, A. L. (2017). Exceptional and rapid accumulation of anthropogenic debris on one of the world's most remote and pristine islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(23), 6052-6055.

- Lebreton, L. C., Van Der Zwet, J., Damsteeg, J. W., Slat, B., Andrady, A., & Reisser, J. (2017). River plastic emissions to the world's oceans. *Nature communications*, 8(1), 15611.
- LI, W. C., Tse, H. F., & Fok, L. (2016). Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. *Science of the total environment*, 566, 333-349.
- Liu, K., Wang, X., Wei, N., Song, Z., Li, D., 2019. Accurate quantification and transport estimation of suspended atmospheric microplastics in megacities: implications for human health. *Environ. Int.* 132, 105127.
- Liwarska-Bizukojc, E. (2021). Effect of (bio) plastics on soil environment: A review. *Science of the Total Environment*, 795, 148889.
- Lusher, A. L., Hernandez-Milian, G., O'Brien, J., Berrow, S., O'Connor, I., & Officer, R. (2015). Microplastic and macroplastic ingestion by a deep diving, oceanic cetacean: the True's beaked whale *Mesoplodon mirus*. *Environmental pollution*, 199, 185-191.
- Lusher, A. L., Mchugh, M., & Thompson, R. C. (2013). Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine pollution bulletin*, 67(1-2), 94-99.
- Mattsson, K., Jovic, S., Doverbratt, I., & Hansson, L. A. (2018). Nanoplastics in the aquatic environment. *Microplastic contamination in aquatic environments*, 379-399.
- Mincarelli, L., Vischetti, C., Craft, J., & Tiano, L. (2016). DNA damage in different *Eisenia andrei* coelomocytes sub-populations after in vitro exposure to hydrogen peroxide. *SpringerPlus*, 5, 1-7.
- Mincarelli, L., Tiano, L., Craft, J., Marcheggiani, F., & Vischetti, C. (2019). Evaluation of gene expression of different molecular biomarkers of stress response as an effect of copper exposure on the earthworm *Eisenia Andrei*. *Ecotoxicology*, 28, 938-948.
- Murray, F., & Cowie, P. R. (2011). Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Marine pollution bulletin*, 62(6), 1207-1217.

Napper, I. E., Bakir, A., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2015). Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Marine pollution bulletin*, 99(1-2), 178-185.

Ncube, L. K., Ude, A. U., Ogunmuyiwa, E. N., Zulkifli, R., & Beas, I. N. (2021). An overview of plastic waste generation and management in food packaging industries. *Recycling*, 6(1), 12.

Nordberg, M., Templeton, D. M., Andersen, O., & Duffus, J. H. (2009). Glossary of terms used in ecotoxicology (IUPAC Recommendations 2009). *Pure and Applied Chemistry*, 81(5), 829-970.

OECD, 2004. Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*).

OECD, 2016. Guideline for testing of chemicals “Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/ *Eisenia andrei*)” 222.

Orlando P., Silvestri S., Galeazzi R., Antonicelli R., Marcheggiani F. e Cirilli I., Effect of ubiquinol supplementation of biochemical and oxidative stress indexes after intense exercise in young athletes, 2018.

Otake, Y., Kobayashi, T., Asabe, H., Murakami, N., & Ono, K. (1995). Biodegradation of low-density polyethylene, polystyrene, polyvinyl chloride, and urea formaldehyde resin buried under soil for over 32 years. *Journal of Applied Polymer Science*, 56(13), 1789-1796.

Oviedo-Ocaña, E. R., Torres-Lozada, P., Marmolejo-Rebellon, L. F., Hoyos, L. V., Gonzales, S., Barrena, R., ... & Sanchez, A. (2015). Stability and maturity of biowaste composts derived by small municipalities: Correlation among physical, chemical and biological indices. *Waste Management*, 44, 63-71.

Owojori, O.J., Reinecke, A.J., Rozanov, A.B., 2008. Effects of salinity on partitioning, uptake and toxicity of zinc in the earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 2385–2393.

Owojori, O.J., Reinecke, A.J., Voua-Otomo, P., Reinecke, S.A., 2009. Comparative study of the effects of salinity on life-cycle parameters of four soil-dwelling species (*Folsomia candida*, *Enchytraeus doerjesi*, *Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*). *Pedobiologia* 52, 351–360.

Peeken, I., Primpke, S., Beyer, B., Gütermann, J., Katlein, C., Krumpfen, T., ... & Gerdt, G. (2018). Arctic sea ice is an important temporal sink and means of transport for microplastic. *Nature communications*, 9(1), 1505.

Pivato, A., Raga, R., Vanin, S., & Rossi, M. (2014). Assessment of compost quality for its environmentally safe use by means of an ecotoxicological test on a soil organism. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 16, 763-774.

POPA, E. E., GEICU-CRISTEA, M., POPESCU, P. A., MITELUȚ, A. C., DRĂGHICI, M. C., DĂNĂILĂ-GUIDEA, S. M., & POPA, M. E. (2022). METHODS USED FOR ECOTOXICITY ASSESSMENT OF POLYMERIC PACKAGING MATERIALS. *Scientific Papers. Series A. Agronomy*, 65(1).

Prata, J. C., Silva, A. L. P., Da Costa, J. P., Mouneyrac, C., Walker, T. R., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2019). Solutions and integrated strategies for the control and mitigation of plastic and microplastic pollution. *International journal of environmental research and public health*, 16(13), 2411.

Richardson, J. B., Görres, J. H., Jackson, B. P., & Friedland, A. J. (2015). Trace metals and metalloids in forest soils and exotic earthworms in northern New England, USA. *Soil Biology and biochemistry*, 85, 190-198.

Rillig, M. C., Ziersch, L., & Hempel, S. (2017). Microplastic transport in soil by earthworms. *Scientific reports*, 7(1), 1362.

Rodrigues, L. C., Puig-Ventosa, I., López, M., Martínez, F. X., Ruiz, A. G., & Bertrán, T. G. (2020). The impact of improper materials in biowaste on the quality of compost. *Journal of cleaner production*, 251, 119601.

Rodríguez-Seijo, A., Lourenço, J., Rocha-Santos, T. A. P., Da Costa, J., Duarte, A. C., Vala, H., & Pereira, R. (2017). Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouché. *Environmental Pollution*, 220, 495-503.

Roubalová, R., Procházková, P., Dvořák, J., Škanta, F., & Bilej, M. (2015). The role of earthworm defense mechanisms in ecotoxicity studies. *Invertebrate Survival Journal*, 12(1), 203-213.

Sánchez, Ó. J., Ospina, D. A., & Montoya, S. (2017). Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste management*, 69, 136-153.

Saunders, K. J. (2012). *Organic polymer chemistry: an introduction to the organic chemistry of adhesives, fibres, paints, plastics and rubbers*. Springer Science & Business Media. (pp. 1-2).

Sayara, T., Basheer-Salimia, R., Hawamde, F., & Sánchez, A. (2020). Recycling of organic wastes through composting: Process performance and compost application in agriculture. *Agronomy*, 10(11), 1838.

Sharma, V. K., Caudatelli, M., Fortuna, F., & Cornacchia, G. J. E. C. (1997). Processing of urban and agro-industrial residues by aerobic composting. *Energy Conversion and Management*, 38(5), 453-478.

Sharma K. e Garg K. V., Comparative analysis of vermicompost quality produced from rice straw and paper waste employing earthworm *Eisenia fetida*, 2018.

Shen, M., Zhu, Y., Zhang, Y., Zeng, G., Wen, X., Yi, H., ... & Song, B. (2019). Micro (nano) plastics: unignorable vectors for organisms. *Marine pollution bulletin*, 139, 328-331.

Siles-Castellano, A. B., López, M. J., López-González, J. A., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M., Estrella-González, M. J., & Moreno, J. (2020). Comparative analysis of phytotoxicity and compost quality in industrial composting facilities processing different organic wastes. *Journal of Cleaner Production*, 252, 119820.

Singh, S., Singh, J., & Vig, A. P. (2016). Earthworm as ecological engineers to change the physico-chemical properties of soil: soil vs vermicast. *Ecological Engineering*, 90, 1-5.

Singh D. A., Mahima G. P., Sharma S. e Sakshi S., Impact of glyphosate and pendimethalin herbicides on qualitative and quantitative parameters coelomocytes in earthworm *Eisenia fetida*, 2020.

Sintim, H. Y., & Flury, M. (2017). Is biodegradable plastic mulch the solution to agriculture's plastic problem?.

Small, C., & Cohen, J. (2004). Continental physiography, climate, and the global distribution of human population. *Current Anthropology*, 45(2), 269-277.

Srivastava V., Squartini A., Masi A., Sarkar A. e Singh P. R., Metabarcoding analysis of the bacterial succession during vermicomposting of municipal solid waste employing the earthworm *Eisenia fetida*, 2021

Steinmetz, Z., Wollmann, C., Schaefer, M., Buchmann, C., David, J., Tröger, J., ... & Schaumann, G. E. (2016). Plastic mulching in agriculture. Trading short-term agronomic benefits for long-term soil degradation?. *Science of the total environment*, 550, 690-705.

Sun, W., Meng, Z., Li, R., Zhang, R., Jia, M., Yan, S., ... & Zhu, W. (2021). Joint effects of microplastic and dufulin on bioaccumulation, oxidative stress and metabolic profile of the earthworm (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, 263, 128171.

Thompson, R.C., Moore, C.J., Saal, F.S.V., Swan, S.H., 2009. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 2153–2166.

Thushari, G. G. N., & Senevirathna, J. D. M. (2020). Plastic pollution in the marine environment. *Heliyon*, 6(8), e04709.

Tiano L., Littarru G. P., Principi F., Orlandi M., Santoro L. e Carnevali P., Assessment of DNA damage in down syndrome patients by means of a new, optimised single cell gel electrophoresis technique, 2005.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., ... & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3), 206-221.

Tyagi, V. K., Fdez-Güelfo, L. A., Zhou, Y., Álvarez-Gallego, C. J., Garcia, L. R., & Ng, W. J. (2018). Anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Progress and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 93, 380-399.

UNI CEN/TS 16202:201. Fanghi, rifiuti organici trattati e suolo - Determinazione di impurità e pietrame (ciottolame).

Valverde M., Ostrosky-Wegman P., Ph D., Rojas E. e Fortoul T., The application of single cell gel electrophoresis or comet essay to human monitoring studies, 1999.

Van Cauwenberghe, L., & Janssen, C. R. (2014). Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental pollution*, 193, 65-70.

Van Cauwenberghe, L., Vanreusel, A., Mees, J., & Janssen, C. R. (2013). Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environmental pollution*, 182, 495-499.

Van Sebille, E., England, M. H., & Froyland, G. (2012). Origin, dynamics and evolution of ocean garbage patches from observed surface drifters. *Environmental Research Letters*, 7(4), 044040.

Vischetti, C., Casucci, C., De Bernardi, A., Monaci, E., Tiano, L., Marcheggiani, F., ... & Puglisi, E. (2020). Sub-lethal effects of pesticides on the DNA of soil organisms as early ecotoxicological biomarkers. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1892.

Wang K., Pang S., Mu X., Qi S., Cui F. e Wang C., Biological response of eartworm, *Eisenia fetida*, to five neonicotinoid insecticides, 2015.

Wang, J., Lv, S., Zhang, M., Chen, G., Zhu, T., Zhang, S., ... & Luo, Y. (2016). Effects of plastic film residues on occurrence of phthalates and microbial activity in soils. *Chemosphere*, 151, 171-177.

Wright, S. L., Rowe, D., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Current Biology*, 23(23), R1031-R1033.

Xie X., Qian Y., Wu Y., Yin J. e Zhai J., Effects of decabromodiphenyl ether (BDE209) on the avoidance response, survival, growth and reproduction of earthworms (*Eisenia fetida*), 2013.

Zalasiewicz, J., Waters, C.N., Ivar do Sul, J.A., Corcoran, P.L., Barnosky, A.D., Cearreta, A., Edgeworth, M., Gałuszka, A., Jeandel, C., Leinfelder, R., McNeill, J.R., Steffen, W., Summerhayes, C., Wapreisch, M., Williams, M., Wolfe, A.P., Yonan, Y., 2016. The geological cycle of plastics and their use as a stratigraphic indicator of the Anthropocene. *Anthropocene* 13, 4–17.

Zhang, K., Hamidian, A. H., Tubić, A., Zhang, Y., Fang, J. K., Wu, C., & Lam, P. K. (2021). Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review. *Environmental Pollution*, 274, 116554.

Zhang, X., Li, Y., Ouyang, D., Lei, J., Tan, Q., Xie, L., ... & Yan, W. (2021). Systematical review of interactions between microplastics and microorganisms in the soil environment. *Journal of hazardous materials*, 418, 126288.

Ziccardi, L. M., Edgington, A., Hentz, K., Kulacki, K. J., & Kane Driscoll, S. (2016). Microplastics as vectors for bioaccumulation of hydrophobic organic chemicals in the marine environment: A state-of-the-science review. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(7), 1667-1676.

SITOGRAFIA

- BioplasticsEurope. What are “bio-plastics”? URL <https://bioplasticseurope.eu/about>
- European bioplastics, 2022a. What are bioplastics? URL https://docs.european-bioplastics.org/publications/fs/EuBP_FS_What_are_bioplastics.pdf
- Bundsgütegemeinschaft Kompost, 1994. Methods Book for the Analysis of Compost. Determination of the pH value (pp 29-30). URL https://www.kompost.de/fileadmin/docs/shop/Grundlagen_GS/Methods_Book_2002.pdf
- European bioplastics, 2022b. Bioplastics market development update 2022. URL https://docs.european-bioplastics.org/publications/market_data/2022/Report_Bioplastics_Market_Data_2022_short_version.pdf
- European bioplastics, 2023a. Faq 2023 URL https://docs.european-bioplastics.org/publications/EUBP_FAQ_on_bioplastics.pdf
- European bioplastics, 2023b. Bioplastics Packaging URL https://docs.european-bioplastics.org/publications/fs/EUBP_FS_Packging.pdf
- Gazzetta Ufficiale. Definizione di Biomassa all'Art.2 della Direttiva 2009/28/CE URL <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2011/03/28/011G0067/sg>
- Gazzetta Ufficiale n.121 del 26 maggio 2010 (Decreto legislativo 75/2010) <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/gu/2010/05/26/121/so/106/sg/pdf>
- Gazzetta ufficiale n.88 del 14/04/2006 (Articolo 183 del Decreto legislativo 152/2006) <https://www.gazzettaufficiale.it/dettaglio/codici/materiaAmbientale>

ISPRA, 2021. Rapporto rifiuti urbani

URL:https://www.isprambiente.gov.it/files2022/pubblicazioni/rapporti/rapportorifiutiurbani_ed-2021-n-355-conappendice_agg18_01_2022.pdf

PlasticsEurope, 2022. Plastics – the Facts 2022. URL https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2022/10/PE-PLASTICS-THE-FACTS_V7-Tue_19-10-1.pdf

PlasticsEurope, 2018. Plastics-the Facts 2018: an analysis of European plastics production, demand and waste data. URL <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/10/2018-Plastics-the-facts.pdf>

Tecnopolo Bologna CNR. Bioplastiche, come smaltirle? Differenze tra compostabile e biodegradabile, 2023. <https://tecnopolo.bo.cnr.it/bioplastiche-come-smaltirle-differenze-compostabile-e-biodegradabile/>