



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

Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Marina

**Applicazione di approcci ecotossicologici nella valutazione
dell'impatto ambientale di piattaforme offshore nel Mar Adriatico**

**Application of ecotoxicological approaches in the assessment of
environmental impact of offshore platforms in the Adriatic Sea**

Tesi magistrale di:

Sara Tartaglione

Relatore:

Chiar. Prof. Francesco Regoli

Sessione estiva

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 Piattaforme offshore.....	1
1.2 Mussel Watch e Mussel Cage.....	8
1.3 Studio dei “biomarker” come strumento di valutazione degli effetti biologici.....	10
2. OBIETTIVO DELLA TESI.....	28
3. MATERIALI E METODI.....	30
3.1 Attività di traslocazione dei mitili.....	30
3.2 Analisi Biologiche.....	34
3.3 Analisi statistiche ed elaborazione Weight of Evidence.....	45
4. RISULTATI.....	47
5. DISCUSSIONE.....	56
6. CONCLUSIONI.....	64
7. BIBLIOGRAFIA.....	66

Abstract

Il crescente fabbisogno energetico globale ha determinato un progressivo incremento delle attività di estrazione di idrocarburi, sia sulla terraferma sia in ambiente marino. Le attività offshore rappresentano una potenziale fonte di pressione per gli ecosistemi marini, poiché le normali operazioni possono generare diverse tipologie di inquinamento, tra cui il rilascio di contaminanti chimici. Il Mar Adriatico rappresenta uno dei bacini del Mediterraneo maggiormente interessati da tali attività e, a causa delle sue caratteristiche geomorfologiche, risulta particolarmente vulnerabile agli impatti antropici. In questo contesto si inserisce il campo offshore Rospo Mare, situato nel medio Adriatico al largo delle coste di Abruzzo e Molise e costituito dalle piattaforme ROSPO A, ROSPO B e ROSPO C. L'obiettivo di questa tesi è stato quello di valutare i potenziali effetti biologici associati alle attività estrattive del campo offshore mediante un programma di biomonitoraggio basato sugli approcci Mussel Watch e Mussel Cage e sull'utilizzo di *Mytilus galloprovincialis* come organismo bioindicatore. Dopo un periodo di esposizione di cinque settimane, i mitili sono stati sottoposti a una batteria integrata di biomarker ecotossicologici finalizzati alla valutazione di alterazioni immunitarie, neurotossiche, genotossiche e di stress ossidativo. I risultati ottenuti sono stati successivamente integrati mediante un approccio quantitativo Weight of Evidence (WOE), al fine

di fornire una valutazione complessiva del rischio biologico associato alle attività offshore. Nel complesso, la maggior parte dei biomarker analizzati non hanno evidenziato alterazioni biologiche significative tra i mitili traslocati in prossimità delle piattaforme e quelli provenienti dal sito di riferimento. Sebbene siano state osservate alcune variazioni in specifici parametri biologici, tali risposte non hanno evidenziato un quadro coerente di alterazione fisiologica associabile alle attività estrattive. Questa interpretazione è stata ulteriormente confermata anche dall'integrazione dei risultati mediante il modello WOE che ha attribuito a tutte le piattaforme investigate una classe di pericolo bassa, indicando l'assenza di effetti biologici rilevanti associati alle attività estrattive durante il periodo di monitoraggio. I risultati confermano l'utilità dei programmi di biomonitoraggio basati sull'impiego di organismi bioindicatori e biomarker ecotossicologici per la valutazione precoce degli effetti delle attività offshore sugli ecosistemi marini e per il supporto alle strategie di gestione ambientale in aree soggette a pressioni antropiche.

1. INTRODUZIONE

1.1 Piattaforme offshore

Dagli anni '70 ad oggi, la domanda globale di energia è progressivamente aumentata, determinando un incremento delle attività di estrazione di idrocarburi, quali petrolio e gas naturale (Venegas-Li et al., 2019). Queste attività non vengono svolte esclusivamente sulla terraferma, ma anche in ambiente marino attraverso la realizzazione di piattaforme offshore.

Le aree costiere rappresentano alcuni degli ecosistemi maggiormente sfruttati dal settore degli idrocarburi; inoltre, è stato osservato che la maggior parte delle attività di estrazione si svolgono in aree caratterizzate da elevata biodiversità e/o alti tassi di endemicità, contribuendo potenzialmente al declino della biodiversità marina (Venegas-Li et al., 2019).

Le piattaforme offshore sono strutture destinate all'estrazione di idrocarburi in ambiente marino. Il loro "ciclo vitale" può essere suddiviso in tre fasi principali: (1) esplorazione, che comprende lo studio delle caratteristiche geologiche finalizzato all'individuazione dei siti idonei all'installazione, (2) produzione, relativa all'estrazione degli idrocarburi, (3) smantellamento, che consiste nella dismissione delle strutture al termine della loro vita operativa (Trabucco et al., 2012). Durante tutte queste fasi si possono generare molteplici fattori di stress ambientali, tra cui inquinamento luminoso e acustico, rilascio di sostanze

chimiche e idrocarburi durante le operazioni di routine, alterazioni fisiche del fondale marino e, nei casi più gravi, eventi accidentali responsabili di disastri ambientali di ampia portata (Venegas-Li et al., 2019; <https://oap.ospar.org/en/ospar-assessments/quality-status-reports/qsr-2023/other-assessments/impacts-offshore-oil-and-gas-industry/>). Negli ultimi 50 anni si sono verificati infatti numerosi incidenti associati alle attività estrattive offshore; tra i più rilevanti si annovera quello avvenuto il 20 aprile 2010 nel Golfo del Messico, che ha coinvolto la piattaforma Deep Water Horizon. In seguito al blowout del pozzo, si è verificato uno sversamento di circa 670 tonnellate di petrolio in mare in una finestra temporale di circa tre mesi, provocando gravi conseguenze sugli ecosistemi coinvolti, causando la morte di numerosi organismi vertebrati e invertebrati (Fattorini, 2025).

Tuttavia, sebbene questi eventi catastrofici provochino impatti immediati e facilmente osservabili, gli organismi marini sono al contempo esposti a una continua e cronica esposizione agli inquinanti derivanti dal normale funzionamento delle piattaforme offshore (Gomiero et al., 2015).

Tra le principali fonti di contaminazione associate all'attività offshore vi è l'acqua di produzione, una miscela costituita in parte da fluidi naturalmente presenti nei giacimenti di petrolio e gas e in parte da sostanze iniettate all'interno del pozzo per facilitare le operazioni di estrazione (Gorbi et al., 2008;

<https://oap.ospar.org/en/ospar-assessments/quality-status-reports/qsr-2023/other-assessments/impacts-offshore-oil-and-gas-industry/>). Essa è costituita da idrocarburi, composti organici non volatili, metalli in tracce e acidi, come l'acido acetico, e composti contenenti zolfo (Gorbi et al., 2008; Bakke et al., 2013). L'acqua di produzione rappresenta il principale rifiuto derivante dalle attività di estrazione e, prima di essere reiniettata nel pozzo o rilasciata nell'ambiente marino, deve essere sottoposta a rigorosi trattamenti di depurazione. Esistono numerosi processi di trattamento, basati principalmente sulla separazione dei composti in funzione della loro densità o sull'impiego di membrane filtranti (Liu et al., 2021). Tuttavia, anche il rilascio prolungato di basse concentrazioni di contaminanti, può determinare effetti cronici sugli organismi marini (Fattorini, 2025). Inoltre, diversi composti presenti nell'acqua di produzione possono agire come interferenti endocrini (Bakke et al., 2013).

Studi precedenti hanno evidenziato la presenza di metalli in tracce e idrocarburi policiclici aromatici (PAHs) nei pressi di piattaforme offshore, attraverso analisi svolte su sedimenti, comunità bentoniche e popolazioni native e traslocate di mitili (Gorbi et al., 2008; Barile et al., 2016; Regoli et al., 2019).

I metalli sono naturalmente presenti nell'ambiente, ma possono derivare anche da attività antropiche, tra cui l'industria siderurgica e le attività di estrazione (Sharma et al., 2025). In base alla loro importanza biologica, essi vengono distinti in metalli

essenziali e non essenziali. I primi, come rame (Cu) e zinco (Zn), sono necessari per il corretto funzionamento cellulare, mentre i secondi, come cadmio (Cd) ed il mercurio (Hg), non svolgono nessun ruolo fisiologico noto (Wang and Rainbow, 2010). Tuttavia, entrambe le categorie possono risultare tossiche quando le concentrazioni intracellulari superano determinati valori soglia (Wang and Rainbow, 2010). Tra questi, elementi quali cadmio, piombo, mercurio, rame, arsenico e altri, sono comunemente definiti “metalli pesanti” in quanto caratterizzati da densità elevate ($> 5.0 \text{ g cm}^{-3}$) e da un’elevata tossicità per organismi vegetali e animali (Kumar et al., 2024). Inoltre, tali contaminanti sono persistenti e non biodegradabili, e possono andare incontro a fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione, come nel caso del mercurio, lungo la rete trofica, sia attraverso l’ingestione sia mediante l’assorbimento dalle superfici respiratorie (Kumar et al., 2024; Sharma et al., 2025).

Tra i principali componenti delle acque di produzione figurano anche gli idrocarburi policiclici aromatici (PAHs), composti chimici che possono generarsi naturalmente, ad esempio in seguito a incendi boschivi, oppure derivare da attività antropiche. I PAHs vengono generalmente distinti in due gruppi principali: molecole a basso peso molecolare, caratterizzate da meno di 4 anelli aromatici, e composti ad alto peso molecolare, caratterizzati da più di 4 anelli aromatici (Bright et al., 2023). Una volta rilasciati nell’ambiente marino, gli idrocarburi

possono disperdersi per effetto del moto ondoso e del vento oppure andare incontro a processi chimici e biologici, quali fotodegradazione e biodegradazione, che ne favoriscono l'emulsione e la degradazione (Fig. 1). Inoltre, l'interazione tra particelle di petrolio e sedimento può determinare la formazione delle cosiddette “tar balls”, agglomerati di sabbia e idrocarburi caratterizzati da elevata persistenza e difficile degradabilità, responsabili di forme di contaminazione durature nel tempo (Fattorini, 2025).

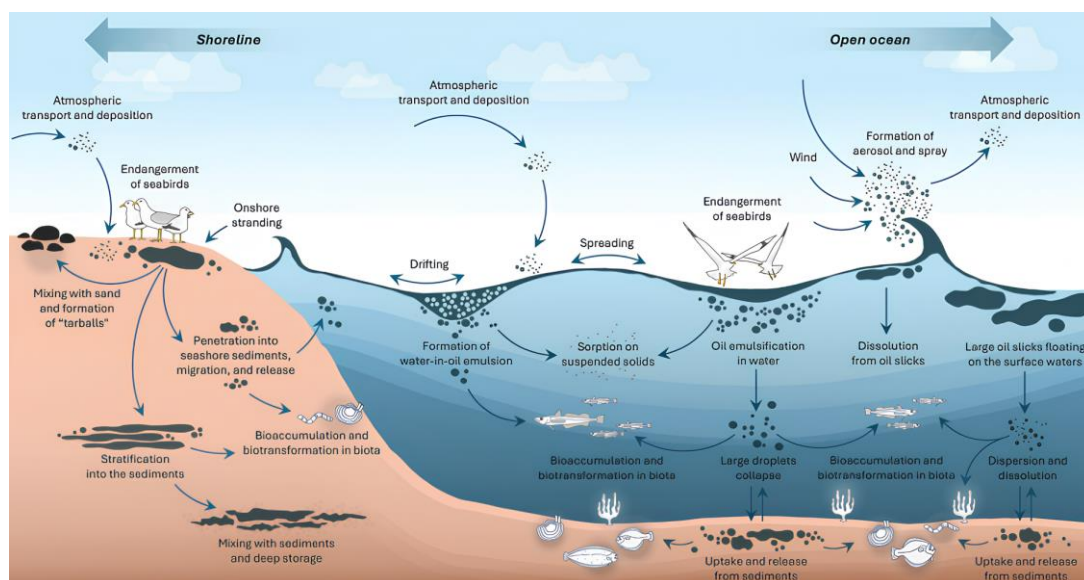


Figura 1. Dispersione dei PAHs in mare (Fattorini, 2025)

Ad oggi, per ridurre l'impatto degli idrocarburi in mare in seguito a eventi di oil spill sono state sviluppate diverse strategie di contenimento e bonifica, tra cui l'impiego di barriere galleggianti per limitare l'estensione dell'area contaminata, la combustione *in situ* e l'utilizzo di composti chimici disperdenti. Tuttavia, l'uso

di questi ultimi rimane ancora controverso, poiché può determinare effetti tossici sugli organismi marini (Fattorini, 2025).

I contaminanti rilasciati durante le attività di estrazione possono dare luogo a due principali forme di tossicità: acuta e cronica. Queste differiscono principalmente per la rapidità di insorgenza degli effetti: la tossicità acuta si manifesta in tempi brevi e con effetti immediatamente evidenti, mentre quella cronica è associata a esposizioni prolungate e a conseguenze persistenti nel tempo (Szyrkowska et al., 2014). Un esempio di tossicità acuta è rappresentato dalla mortalità di organismi marini, quali cetacei, uccelli marini e tartarughe, in seguito a eventi di oil spill. Il petrolio, infatti, aderisce rapidamente alla superficie corporea degli animali, causando soffocamento e difficoltà nel movimento, compromettendo la capacità di alimentarsi (Fattorini, 2025). Al contrario, la tossicità cronica deriva da un'esposizione prolungata a basse concentrazioni di composti xenobiotici, tra cui PAHs e metalli in tracce, e può determinare numerosi effetti biologici, quali alterazioni della crescita e della riproduzione, anomalie nello sviluppo embrionale e larvale, induzione dell'apoptosi, stress ossidativo, danni al sistema nervoso centrale, carcinogenesi e, nei casi più gravi, morte dell'organismo (Szyrkowska et al.; Kumar et al., 2024; Fattorini, 2025; Sharma et al., 2025).

Anche nel Mar Mediterraneo e in particolar modo nel Mar Adriatico c'è un'elevata numerosità di installazioni off-shore. Il Mar Adriatico rappresenta un

bacino semi-chiuso lungo circa 800 km e largo mediamente 200 km, caratterizzato da una profondità media di circa 250 m e da una profondità massima di oltre 1200 m nell'Adriatico meridionale (Kraus et al., 2019). Tali caratteristiche rendono il Mare Adriatico particolarmente vulnerabile agli impatti derivanti dalle attività antropiche, tra cui l'estrazione di idrocarburi.

In questo bacino, già sottoposto a numerose pressioni ambientali, lo sfruttamento delle risorse energetiche ha avuto inizio negli anni '60 con la costruzione di impianti offshore destinati all'estrazione di idrocarburi (Gorbi et al., 2008). In particolare, nel 1982, nell'Adriatico centro-meridionale, è stato installato il campo offshore Rospo Mare, situato a circa 20 km dalle coste di Abruzzo e Molise. Il sito è costituito da tre piattaforme, ROSPO A, ROSPO B e ROSPO C, e da un'unità galleggiante di stoccaggio e scarico (Floating Storage and Offloading unit, FSO) denominata Alba Marina (Bellentani et al., 2016).

Il campo è tuttora operativo e l'estrazione avviene attraverso oltre 30 pozzi, dai quali viene estratto un petrolio particolarmente denso e viscoso (Bellentani et al., 2016).

Sebbene studi precedenti abbiano evidenziato, nei campioni di acqua raccolti in prossimità del campo offshore ROSPO MARE, concentrazioni di PAHs e metalli pesanti inferiori ai limiti normativi (Barile et al., 2016), il monitoraggio ambientale rimane fondamentale per valutare gli effetti sub-letali e i processi di

bioaccumulo negli organismi marini, spesso non rilevabili attraverso la sola caratterizzazione chimica della matrice acquosa.

1.2 Mussel Watch e Mussel Cage

Le attività di estrazione di idrocarburi in ambiente marino possono esercitare pressioni sugli ecosistemi, rendendo necessario il ricorso a tecniche di monitoraggio ambientale; in tale ambito, il biomonitoraggio, basato sull'uso di organismi bioindicatori, rappresenta un approccio efficace, tra cui rientrano i metodi Mussel Watch e Mussel Cage. I molluschi bivalvi, e in particolare i mitili, sono considerati organismi sentinella ideali grazie a diverse caratteristiche (Farrington et al., 1983): sono ampiamente distribuiti a livello globale, sessili e in grado di bioaccumulare contaminanti, rendendo possibile l'esecuzione di analisi biochimiche; inoltre, presentano una limitata capacità di metabolizzare molti composti organici e risultano facilmente traslocabili nelle aree di interesse.

Il programma Mussel Watch, descritto per la prima volta negli anni '70 da Edward D. Goldberg (Farrington et al., 2016), si basa proprio sull'impiego dei mitili per individuare aree caratterizzate dalla presenza di contaminanti chimici, quali metalli in tracce e idrocarburi. Tuttavia, tale approccio presenta anche alcune limitazioni: non tutti gli inquinanti vengono bioaccumulati in maniera

significativa nei tessuti dei mitili, e le concentrazioni rilevate possono variare in funzione della specie e di diversi fattori biotici e abiotici (ad esempio periodo riproduttivo, temperatura e disponibilità di nutrienti). Inoltre, i dati ottenuti devono essere interpretati con cautela quando si intende estenderli allo stato di salute dell'intero ecosistema marino (Farrington et al., 2016).

Il metodo Mussel Cage, invece, utilizzato nel presente studio e descritto in Gorbi et al. (2008), consiste nel prelievo di mitili da aree considerate non contaminate e nella loro successiva traslocazione nel sito di interesse per un determinato periodo, generalmente di 4-5 settimane, al termine del quale gli organismi vengono recuperati e sottoposti ad analisi biochimiche in laboratorio.

Nel presente studio, la specie utilizzata per la traslocazione (Mussel cage) è il mollusco bivalve *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819), appartenente alla famiglia dei *Mytilidae*, ampiamente distribuito nel Mar Mediterraneo e lungo le coste dell'Atlantico orientale.

1.3 Studio dei “Biomarker” come strumento di valutazione degli effetti biologici

I biomarker sono risposte biologiche misurabili a livello di organismo, tessuto, cellula o comportamento, che ci offrono informazioni riguardo lo stato di salute dell'organismo, della comunità o dell'ecosistema. Nell'ambito della valutazione del rischio ambientale, i biomarker rappresentano strumenti fondamentali per valutare la biodisponibilità e gli effetti tossicologici precoci dei contaminanti antropogenici rilasciati nell'ambiente marino (McCarty, Power and Munkittrick, 2002). Tali analisi permettono inoltre di capire le relazioni causa-effetto e dose-effetto in seguito all'esposizione a inquinanti (López-Barea 1995; Van Der Oost et al., 2003; Cajaraville et al., 2000; Gorbi et al., 2005; Sarkar et al., 2006). Gli effetti biologici indotti dai contaminanti possono manifestarsi a differenti livelli di organizzazione biologica, da quello subcellulare fino all'intero ecosistema. In genere, le alterazioni a livello molecolare rappresentano le prime risposte osservabili, seguite da modificazioni a livello cellulare, tissutale, fisiologico e, successivamente, a livello di organismo, popolazione ed ecosistema (Forbes, 1993; Shugart and Theodorakis, 1996).

Per essere considerato efficace nel monitoraggio ambientale, un biomarker deve possedere una serie di caratteristiche fondamentali come suggerito in Van Der Oost et al., 2003. Innanzitutto, deve essere misurabile tramite metodi affidabili,

semplici ed economici. Inoltre, deve mostrare un'elevata sensibilità all'esposizione ai contaminanti. È necessario che il range di valore di riferimento sia ben definito in modo tale da distinguere la variabilità naturale dalle risposte biologiche indotte dagli inquinanti, e deve essere chiara la relazione tra durata dell'esposizione e la risposta. Infine, è essenziale definire il legame tra le variazioni biologiche osservate e gli effetti a lungo termine sull'organismo.

Di seguito, sono descritti i biomarker utilizzati in questo lavoro di tesi:

- Stabilità delle membrane lisosomiali
- Tasso di Fagocitosi degli emociti
- Danno genotossico, misurabile come integrità del DNA e presenza di micronuclei
- Attività dell'acetilcolinesterasi
- Attività di enzimi antiossidanti e capacità antiossidante totale
- Contenuto di metallotioneine
- Induzione della perossidazione lipidica: livelli di malondialdeide
- Contenuto di lipofuscina e lipidi neutri

- Stabilità delle membrane lisosomiali

I lisosomi sono piccoli organelli subcellulari delimitati da una singola membrana, scoperti per la prima volta da de Duve negli anni '50 e localizzati nel tessuto digestivo e negli emociti (Regoli, 1992; Yang et al., 2021). Essi contengono un'ampia gamma di enzimi idrolitici (idrolasi), attivi esclusivamente in ambiente acido; per questo motivo, il lume del lisosoma è caratterizzato da un pH compreso tra 4,5 e 5 (Yang et al., 2021).

Grazie agli enzimi in essi contenuti, i lisosomi svolgono un ruolo fondamentale nei processi di digestione intracellulare e fagocitosi. Tra le principali funzioni rientrano la degradazione dei nutrienti intracellulari, la digestione dei patogeni come meccanismo di difesa e i processi di autofagia, che consentono la rimozione di organelli danneggiati e cellule apoptotiche. Inoltre, i lisosomi partecipano ai processi di secrezione e al sequestro di metalli (Regoli, 1992, Yang et al., 2021).

Le funzioni di questi piccoli organelli, e il loro numero, possono essere influenzati sia da processi fisiologici naturali, quali la fame e l'invecchiamento, sia dall'esposizione a contaminanti ambientali. In particolare, l'invecchiamento può alterare il numero di lisosomi, l'acidità del lume e l'efficienza dei processi di degradazione (Yang et al., 2021). In ambito ecotossicologico, le alterazioni lisosomiali rappresentano biomarker particolarmente sensibili, in quanto diversi composti xenobiotici, tra cui gli idrocarburi policiclici aromatici, possono indurre

alterazioni rapidamente osservabili (Regoli, 1992). Tra gli effetti principali che si osservano come danno lisosomiale possiamo elencare l'accumulo di lipofusina, di lipidi neutri, la formazione di malondialdeide, il danneggiamento delle membrane degli organelli e una variazione nella loro morfologia e nella loro numerosità (Regoli, 1992).

- Tasso di Fagocitosi degli emociti

Come descritto precedentemente per i lisosomi, alcune cellule, come ad esempio gli emociti, sono in grado di internalizzare particelle esterne tramite processi di fagocitosi, un meccanismo fondamentale conservato in numerose specie e utilizzato da alcune linee cellulari, tra cui i macrofagi (Aderem et al., 1999; Fournier et al., 2000).

La fagocitosi è fondamentale per la rimozione di cellule apoptotiche e agenti patogeni, contribuendo così ai meccanismi di difesa immunitaria; inoltre, svolge un ruolo essenziale nei processi di rimodellamento dei tessuti (Aderem et al., 1999; Fournier et al., 2000; Bouallegui, 2019). Tali processi avvengono grazie al riconoscimento delle particelle bersaglio da parte di specifici recettori presenti sulla superficie delle cellule fagocitiche (Aderem et al., 1999). Il processo di fagocitosi si articola in due fasi principali: (1) l'internalizzazione delle particelle

estranee all'interno di vescicole citoplasmatiche denominate fagosomi e (2) la fusione tra fagosomi e lisosomi, con conseguente formazione dei fagolisosomi, organelli ricchi di enzimi idrolitici in grado di digerire le particelle inglobate (Lee, 2020; Uribe-Querol and Rosales 2020).

In ecotossicologia, la valutazione dei processi di fagocitosi rappresenta un importante biomarker immunologico, poiché l'esposizione a composti xenobiotici, come metalli pesanti e/o molecole organoclorurate, può compromettere tali meccanismi inducendo a fenomeni di immunosoppressione.

- Danno genotossico, misurabile come integrità del DNA e presenza di micronuclei

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS), come precedentemente descritto, sono normalmente presenti all'interno delle cellule con metabolismo aerobico; tuttavia, la loro produzione può anche essere indotta dall'esposizione a contaminanti ambientali. In condizioni fisiologiche, i ROS vengono neutralizzati dai sistemi di difesa antiossidante, ma quando tali difese risultano insufficienti, i ROS possono causare importanti danni cellulari. Tra le specie più reattive vi è il radicale idrossilico ($\cdot\text{OH}$), in grado di provocare la rottura del filamento di DNA mediante l'estrazione di un atomo di idrogeno dal 2'-deossiribosio (Cooke 2003). La rottura del DNA può interessare uno solo dei due filamenti della doppia elica (single

strand breaks), oppure entrambi (double strand breaks), Quest'ultima rappresenta una delle forme più gravi di danno al DNA, poiché compromette l'integrità strutturale della molecola e può comportare la perdita dell'informazione genetica (Lieber, 1998). Se non correttamente riparate le strand breaks possono indurre mutazioni, anomalie cromosomiche, processi tumorali nei vertebrati e altre patologie genotossiche negli invertebrati (Frenzilli et al., 2001).

Tra i principali indicatori di danno genotossico rientra la formazione di micronuclei (MN), piccoli nuclei accessori che derivano dalla frammentazione cromosomica, dalla perdita di interi cromosomi durante la divisione cellulare (aneuploidia) oppure dalla presenza di cromosomi acentrici che non vengono incorporati nel nucleo principale durante la mitosi (Gorbi et al., 2008; Beedanagari et al., 2014). Una volta originati, i micronuclei possono andare incontro a differenti destini cellulari: possono essere riassorbiti nel nucleo principale, degradati, frammentati, espulsi dalla cellula oppure persistere nel citoplasma (Fig. 2) (Hintzsche et al., 2017; Duan et al., 2026).

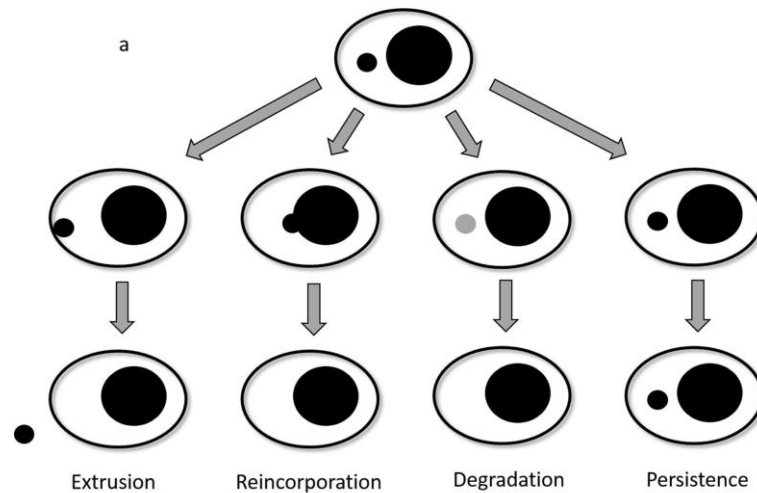


Figura 2. Destino dei micronuclei (Hintzsche et al., 2017)

La perdita dell'integrità strutturale del DNA rappresenta un efficace biomarker di genotossicità, caratterizzato da numerosi vantaggi, tra cui la rapidità, sensibilità e la semplicità di esecuzione delle analisi. Questo approccio consente infatti di svolgere misurazioni a livello della singola cellula in diversi organismi eucariotici, anche in seguito ad esposizioni di breve durata a composti genotossici (Frenzilli et al., 2009).

- Attività dell'acetilcolinesterasi

L'acetilcolina (ACh) è un neurotrasmettitore coinvolto nella trasmissione del segnale nervoso a livello delle sinapsi pregangliari del sistema simpatico e parasimpatico, delle terminazioni parasimpatiche postgangliari e della giunzione neuromuscolare (Colovic et al., 2013). Durante la trasmissione del segnale nervoso, l'ACh viene rilasciata nella fessura sinaptica, dove si lega ai recettori

presenti sulla membrana post-sinaptica. Nella stessa sede l'acetilcolinesterasi (AChE) idrolizza l'acetilcolina in colina e acetato determinando l'interruzione dell'impulso nervoso (Fig. 3) (Colovic et al., 2013). L'AChE svolge quindi un ruolo fisiologico fondamentale nella regolazione della trasmissione sinaptica. L'enzima è caratterizzato da una struttura globulare ellissoidale e due siti funzionali: il sito anionico, responsabile del legame con l'ACh, e il sito esteratico, in cui avviene l'idrolisi (Colovic et al., 2013). L'idrolisi dell'ACh è fondamentale per il corretto funzionamento del sistema nervoso, l'inibizione costante dell'enzima AChE, infatti, può determinare paralisi muscolare, crisi epilettiche, ipersalivazione, sudorazione, difficoltà respiratorie e, nei casi più gravi, la morte (Colovic et al., 2013; De Lima et al., 2013;).

L'inibizione dell'AChE è generalmente associata dall'esposizione a composti organici distinguibili in inibitori reversibili, come i carbammati, e irreversibili come gli organofosfati, che si legano stabilmente all'enzima. Tali sostanze sono ampiamente utilizzate in ambito agricolo per la produzione di pesticidi, fungicidi ed erbicidi (Gorbi et al., 2008; Colovic et al., 2013). Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che anche altri contaminanti ambientali, inclusi i metalli, possono interferire con l'attività dell'acetilcolinesterasi (De Lima et al., 2013).

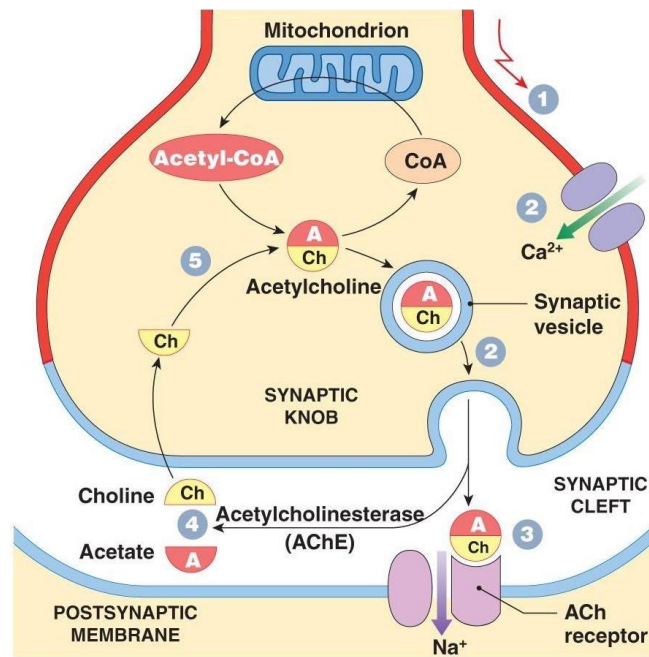


Figura 3. Attività dell'acetilcolinesterasi (Aboughazala et al., 2020)

- Attività di enzimi antiossidanti

Gli antiossidanti cellulari sono molecole in grado di neutralizzare le specie reattive dell'ossigeno (ROS), che naturalmente sono presenti all'interno della cellula, come prodotto di diversi organelli, di numerose reazioni enzimatiche e del metabolismo aerobico. In particolare, i ROS si originano durante la fosforilazione ossidativa, in seguito alla riduzione dell'ossigeno molecolare. La produzione di ROS può tuttavia aumentare in seguito all'esposizione a contaminanti ambientali come metalli in tracce e composti organici, i quali, inducono rispettivamente reazioni di tipo Fenton e processi di ciclo redox (Winston et al., 1998; Regoli 2000; Ayala et al., 2014).

Tra le principali specie più reattive si annoverano l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), il perossido di idrogeno (H_2O_2), e il radicale idrossilico ($\cdot OH$) (Cooke 2003; Ayala et al., 2014; Hossen et al., 2023). In condizioni fisiologiche, i sistemi di difesa antiossidante mantengono l'equilibrio tra la produzione e la rimozione dei ROS. Tuttavia, quando la loro produzione supera la capacità di neutralizzazione dell'organismo, questo equilibrio viene alterato, determinando l'insorgenza di stress ossidativo (Birben et al., 2012). L'eccesso di ROS può determinare numerosi danni cellulari, tra cui la perossidazione lipidica, la degradazione delle proteine, e danni al DNA, come la compromissione della sua integrità strutturale. Tali effetti sono associati anche a patologie cardiovascolari e invecchiamento (Winston et al., 1998; Regoli 2000).

In ecotossicologia, per misurare l'efficienza delle difese antiossidanti, e di conseguenza la loro capacità nel neutralizzare i ROS, viene investigata l'attività dei singoli enzimi antiossidanti quali: catalasi, glutazione S-transferasi, glutazione

perossidasi, glutatione reduttasi (Fig. 4), insieme alla capacità antiossidante totale, descritta nei paragrafi successivi.

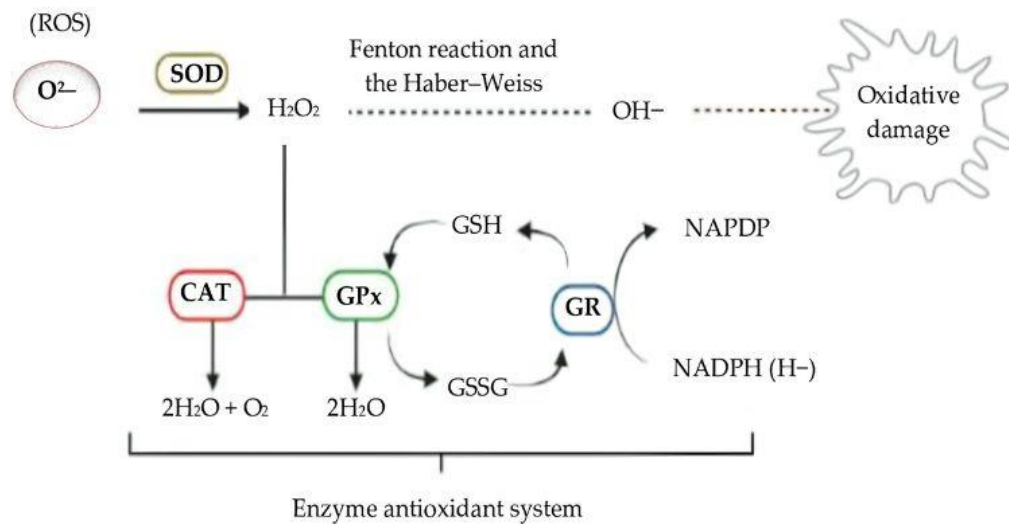


Figura 4. Ruolo degli enzimi antiossidanti (Mendonça et al., 2022)

La catalasi è un enzima ampiamente distribuito a livello cellulare, costituito da quattro subunità polipeptidiche, ciascuna formata da oltre 500 amminoacidi e un gruppo eme (Khessiba et al., 2005). Questo enzima svolge un ruolo fondamentale nella neutralizzazione dei ROS, in particolare del perossido di idrogeno (H_2O_2) (Khessiba et al., 2005; Mendonça et al., 2022). La reazione catalizzata dalla catalasi avviene in due fasi: nella prima, una molecola di H_2O_2 ossida il gruppo eme dell'enzima determinandone l'attivazione; nella seconda, un'altra molecola di perossido di idrogeno riduce l'enzima riportandolo allo stato basale. I prodotti finali della reazione sono due molecole di acqua (H_2O) e una molecola di ossigeno (O_2) (Mendonça et al., 2022).

La glutathione reduttasi (GR) è un enzima costituito da due subunità, ciascuna caratterizzata dalla presenza di siti specifici per il legame con FAD e NADPH, oltre a un sito coinvolto nei processi di dimerizzazione (Couto et al., 2016). L'enzima è prevalentemente localizzato nei compartimenti cellulari in cui la produzione di ROS risulta particolarmente elevata. La GR svolge un ruolo essenziale nei sistemi di difesa antiossidante, in quanto catalizza la riduzione del glutathione ossidato (GSSG) alla sua forma ridotta (GSH) (Couto et al., 2016; Kedrowski et al., 2014). Questa reazione è fondamentale per il mantenimento del corretto rapporto GSH/GSSG all'interno della cellula. Il GSH, infatti, è coinvolto in numerosi processi fisiologici e rappresenta uno dei principali sistemi di difesa antiossidante (Kedrowski et al., 2014).

Un altro importante enzima coinvolto nei sistemi di difesa antiossidante è la glutathione perossidasi (GPX), una famiglia di enzimi con attività perossidasi e coinvolti nella neutralizzazione delle specie reattive dell'ossigeno (Mendonça et al., 2022). Il sito attivo di questi enzimi è caratterizzato dalla presenza di selenocisteina (Sec) oppure, in alcune isoforme, di cisteina (Cys), oltre ad altri residui amminoacidici, quali glutammina (Gln), triptofano (Trp) e asparagina (Asn) (Brigelius-Flohé et al., 2013). Le GPX possono essere suddivise in due principali categorie: selenio-dipendenti (SecGPX) e selenio-indipendenti (CysGPX), che differiscono per il meccanismo catalitico. Entrambe partecipano

alla neutralizzazione del perossido di idrogeno, ma attraverso modalità differenti. Le SecGPX, grazie alla presenza di selenocisteina nel sito attivo, mostrano una maggiore reattività ed efficienza catalitica rispetto alle CysGPX. In seguito all'ossidazione causata dalla reazione con il perossido, le SecGPX vengono rigenerate mediante l'utilizzo di due molecole di glutathione ridotto (GSH), mentre le CysGPX utilizzano la tioredossina per ripristinare la forma attiva dell'enzima (Mendonça et al., 2013 Navrot et al., 2015).

Le glutathione S-transferasi (GST) costituiscono una vasta superfamiglia enzimatica, ampiamente distribuita tra le diverse specie e fondamentale nei processi di detossificazione cellulare. Questi enzimi presentano una struttura dimerica e sono principalmente localizzate nel citosol (Sheehan et al., 2001; Bebianno et al., 2007). Nelle GST citosoliche, ciascun dimero è caratterizzato dalla presenza di due siti attivi; ogni sito comprende una regione altamente specifica per il GSH e una regione meno selettiva, in grado di interagire con composti elettrofili. Questa organizzazione strutturale consente alle GST di legare e metabolizzare un'ampia varietà di composti tossici (Wilce et al., 1994). Il meccanismo di detossificazione degli xenobiotici si articola generalmente in due fasi: la fase I, o fase funzionale, e la fase II, o fase di coniugazione. Nella fase I intervengono enzimi quali il citocromo P450, responsabili della trasformazione dei composti xenobiotici attraverso reazioni di ossidazione, riduzione o idrolisi.

Successivamente, nella fase II, le GST catalizzano reazioni di coniugazione che rendono tali composti più idrosolubili e quindi più facilmente eliminabili dall'organismo (Sheehan et al., 2001; Bebianno et al., 2007). La principale reazione catalizzata dalle GST consiste nella coniugazione del glutathione ridotto (GSH) con composti elettrofili. In particolare, diverse isoforme della GST sono in grado di catalizzare la reazione tra GSH e 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB); tale reazione viene utilizzata in ambito sperimentale per valutare l'attività enzimatica delle GST (Sheehan et al., 2001; Bebianno et al., 2007).

- Capacità antiossidante totale

L'analisi di capacità antiossidante totale (Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay, TOSCA), consente di valutare quantitativamente la capacità di un organismo di contrastare la tossicità delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), sulla base dell'efficienza complessiva delle difese antiossidanti nel neutralizzarle (Winston et al, 1998; Regoli 2000). Il metodo si basa sull'utilizzo di α -keto- γ -methiolbutyric (KMBA), che, in presenza di ROS generati artificialmente, viene ossidato con formazione di etilene. La presenza di molecole antiossidanti riduce tale reazione, determinando una diminuzione della produzione di etilene (Winston et al, 1998; Regoli 2000).

Valori di TOSC prossimi a 0 indicano assenza di capacità antiossidante, mentre valori tendenti a 100 riflettono un'elevata efficienza nel neutralizzare i ROS (Winston et al., 1998).

- Contenuto di metallotioneine

Le metallotioneine (MTs) sono proteine a basso peso molecolare, con un elevato contenuto di cisteina (circa 20-30%) e tioli, presentano un sito di legame per i metalli e sono altamente inducibili. Queste caratteristiche conferiscono alle MTs un'elevata capacità di interagire con diverse tipologie di metalli in tracce, tra cui Ag, Cd, Cu, Hg, Zn e di fungere da scavenger per le specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Wang e Rainbow, 2010; Viarengo et al., 1997; Yu et al., 2021).

Le MTs svolgono un ruolo chiave nei processi di detossificazione e nell'omeostasi cellulare dei metalli (Wang and Rainbow 2010). Una volta internalizzati all'interno della cellula i metalli pesanti come Cd, Pb e Hg, possono andare a sostituire lo Zn legato alle MTs, a questo punto lo Zn libero interagisce con l'MTF-1, il quale a sua volta lega gli elementi di risposta dei metalli (MRE) per attivare l'espressione dei geni che porteranno alla sintesi di nuove proteine (Yu et al., 2021; Wang et al., 2025). Tale processo rappresenta un importante

meccanismo fisiologico di difesa, in grado di ridurre la tossicità dei metalli e i loro effetti negativi (Viarengo et al., 1997).

- Induzione della perossidazione lipidica; livelli di malondialdeide

La perossidazione lipidica rappresenta uno dei principali processi associati al danno ossidativo cellulare ed è strettamente correlata all'alterazione dell'equilibrio tra sistemi antiossidanti e agenti pro-ossidanti. Questo fenomeno coinvolge principalmente gli acidi grassi polinsaturi (PUFAs) presenti nelle membrane cellulari, particolarmente suscettibili all'attacco delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), soprattutto del radicale idrossilico (Ayala et al., 2014). Quando i ROS interagiscono con i lipidi di membrana, sottraggono un atomo di idrogeno dagli acidi grassi, determinando la formazione di radicali lipidici altamente reattivi. Tale evento innesca una reazione a catena che porta alla formazione di radicali perossilici lipidici e successivamente di idroperossidi lipidici, propagando il danno alle membrane cellulari (Marnett, 1999; Ayala et al., 2014).

La perossidazione lipidica avviene generalmente in tre fasi: inizio, propagazione e terminazione. Nella fase di inizio un composto ossidante forma un radicale lipidico ($L^{\cdot}$) che, nel secondo step, reagisce con l'ossigeno formando un radicale

perossilico lipidico ($\text{LOO}^\cdot$). La fase di terminazione avviene quando due radicali reagiscono tra loro neutralizzandosi oppure quando intervengono molecole antiossidanti, come la vitamina E (α -tocoferolo), in grado di interrompere la reazione a catena donando un atomo di idrogeno ai radicali lipidici (Ayala et al., 2014). La malondialdeide rappresenta uno dei prodotti più reattivi e genotossico della perossidazione lipidica, in grado di reagire con il DNA producendo numerosi addotti (Marnett, 1999; Ayala et al., 2014). Quando la perossidazione lipidica avviene a bassi livelli, la cellula attiva meccanismi di difesa come l'aumento della produzione di antiossidanti. Mentre, con tassi più elevati di perossidazione lipidica e stress ossidativo, la cellula attiva meccanismi di apoptosi o necrosi (Ayala et al., 2014). Numerosi studi hanno inoltre dimostrato che l'esposizione di organismi acquatici a differenti classi di contaminanti, tra cui metalli, pesticidi e composti organici, può determinare un incremento dei livelli di MDA nei tessuti, rendendo questo composto un importante biomarker di stress ossidativo.

- Contenuto di lipofuscina e lipidi neutri

La lipofuscina, comunemente nota come “pigmento dell'età”, è costituita da granuli intracellulari contenenti materiale di scarto derivante principalmente dall'ossidazione e dalla degradazione incompleta delle proteine e lipidi, oltre a metalli quali il ferro. Essa rappresenta uno dei prodotti finali dei processi di

perossidazione lipidica associati allo stress ossidativo e tende ad accumularsi progressivamente nelle cellule a lunga vita, in particolare nei neuroni e nei cardiomiociti (Regoli, 1992; Terman et al., 2004; Jung et al., 2007).

I lipidi neutri rappresentano importanti riserve energetiche che consentono agli organismi di far fronte a periodi di limitata disponibilità di nutrienti o a condizioni di stress ambientale. Tuttavia, un accumulo eccessivo può essere indicativo di alterazioni del metabolismo lipidico e di fenomeni di lipidosi cellulare (Turkish et al., 2009; Brenner et al., 2014).

2. OBIETTIVO DELLA TESI

Negli ultimi decenni, l'aumento della domanda globale di idrocarburi ha determinato un'intensificazione delle attività di estrazione sia sulla terraferma sia in ambiente marino. Tali attività rappresentano una potenziale minaccia per gli ecosistemi marini, in quanto molti siti di estrazione coincidono con aree caratterizzate da elevata biodiversità. Le operazioni associate alle piattaforme offshore possono generare differenti forme di impatto ambientale, tra cui inquinamento acustico e luminoso, alterazioni fisiche del fondale marino e rilascio di contaminanti, quali metalli in tracce e idrocarburi.

Le piattaforme offshore del campo ROSPO MARE rappresentano un importante sito di estrazione di petrolio denso e viscoso localizzato nel bacino centrale del Mar Adriatico, a largo delle coste abruzzesi e molisane.

Al fine di valutare lo stato di salute dell'ambiente marino e degli organismi potenzialmente esposti agli impatti delle attività offshore, vengono impiegati programmi di biomonitoraggio e valutazioni di impatto ambientale, tra cui gli approcci di Mussel Watch e Mussel Cage. Tali metodologie si basano sull'utilizzo di molluschi bivalvi, in particolare mitili, le cui caratteristiche biologiche e fisiologiche li rendono organismi bioindicatori ideali.

Lo scopo della presente tesi è valutare i potenziali effetti biologici associati alle attività di estrazione petrolifera della piattaforma offshore Rospo Mare, attraverso l'applicazione di biomarker ecotossicologici nell'organismo bioindicatore *Mytilus galloprovincialis* attraverso tecniche di caging.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Attività di traslocazione dei mitili

Per valutare gli effetti biologici associati alle attività estrattive della piattaforma offshore Rospo Mare, nei mesi di giugno e luglio 2025 è stato condotto un programma di biomonitoraggio mediante l'approccio Mussel Cage. L'impiego di questo metodo si è reso necessario a causa dell'assenza di popolazioni native di mitili in prossimità delle strutture offshore. La specie impiegata è stata *Mytilus galloprovincialis*.

Gli organismi sono stati prelevati da un impianto di mitilicoltura situato nei pressi della città di Termoli e successivamente trapiantati in corrispondenza di ognuna delle tre piattaforme offshore: ROSPO A (42°12'11"N-14°58'15"E), ROSPO B (42°12'45"N-14°56'48"E) e ROSPO C (42°14'06"N-14°55'55"E) (Fig. 5). Il sito di controllo è stato invece posizionato nei pressi delle coste Molisane in un'area non influenzata da attività antropiche rilevanti incluse quelle estrattive dell'impianto Off-shore.



Figura 5. Posizionamento del Campo Rospo Mare

I mitili sono stati collocati all'interno di reti di protezione lunghe 2,5 m e larghe 40 cm, al fine di prevenire fenomeni di predazione (Fig.6). Per ciascuna piattaforma sono state installate due reti a una profondità di circa 5 m. Ogni rete è stata fissata a un cavo principale, ancorato da un lato alla piattaforma e dall'altro a due pesi da 30 kg ciascuno, in modo da garantirne la stabilità durante il periodo di esposizione.

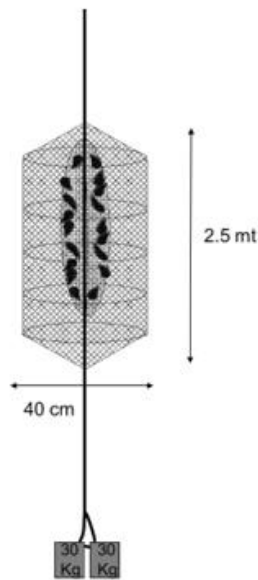


Figura 6. Immagine rappresentativa della rete utilizzata per l'attività di Mussel Cage presso il campo offshore Rospo Mare

Al termine del periodo di esposizione di 5 settimane, i mitili sono stati recuperati e trasportati in condizioni controllate e refrigerate presso il laboratorio di Ecotossicologia e Chimica Ambientale dell'Università Politecnica delle Marche, dove sono stati immediatamente processati per le successive analisi dei biomarker.

Per quanto riguarda le analisi biochimiche, le ghiandole digestive di 20 mitili per sito sono state prelevate, suddivise in 5 pool costituiti da quattro individui ciascuno, congelate in azoto liquido e conservate a -80 °C fino al momento delle analisi. Su questo tessuto sono state misurate le attività degli enzimi antiossidanti quali catalasi, glutazione S-transferasi, glutazione reduttasi, glutazione perossidasi

Se-dipendente e totale (Se-dipendente e Se-indipendente), la capacità antiossidante totale, il contenuto di malondialdeide e di metallotioneine.

Inoltre, ulteriori 5 ghiandole digestive per ogni sito sono state prelevate e rapidamente congelate in azoto liquido e conservate a -80°C per le successive analisi istochimiche, come il contenuto di lipofuscina e lipidi neutri.

Dagli stessi 20 organismi è stata inoltre prelevata emolinfa dal muscolo adduttore, successivamente suddivisa in pool costituiti da quattro individui ciascuno, congelata in azoto liquido e mantenuta a -80 °C, per la determinazione dell'attività dell'acetilcolinesterasi.

In parallelo, sono stati preparati cinque pool di emolinfa, ciascuno costituito da tre mitili, destinati all'esecuzione di analisi in vivo come: il test della stabilità della membrana lisosomiale (NRRT), il test della cometa per la valutazione del danno al DNA e il test della fagocitosi. Infine, ulteriori cinque pool di emolinfa (tre individui per pool) sono stati fissati in soluzione di Carnoy (metanolo e acido acetico, rapporto 3:1) per l'analisi della frequenza dei micronuclei.

3.2 Analisi biologiche

- Stabilità delle membrane lisosomiali

La stabilità della membrana lisosomiale, valutata mediante il test del Neutral Red Retention Time (NRRT), rappresenta un biomarker particolarmente sensibile dello stato fisiologico generale dell'organismo e dell'insorgenza precoce di condizioni di stress ossidativo (Moore, 1982, 1988; Regoli, 1992; Moore et al., 2006). Il parametro è stato determinato utilizzando campioni di emolinfa (0,5 mL) prelevati dal muscolo adduttore anteriore dei mitili mediante siringa ipodermica contenente un uguale volume di soluzione fisiologica (ICES, 2015). Una aliquota della sospensione ottenuta è stata distribuita su vetrini da microscopia e lasciata aderire per 15 minuti a 4 °C in camera umida e al buio.

Successivamente, dopo la rimozione dell'eccesso di emolinfa, le cellule sono state incubate con una soluzione di Rosso Neutro e osservate a intervalli di 15 minuti, fino a un massimo di 120 minuti, al fine di determinare il tempo necessario affinché il 50% degli emociti mostrasse il rilascio del colorante dai lisosomi al citoplasma.

La soluzione stock di Rosso Neutro è stata preparata sciogliendo 28,8 mg di colorante in 1 mL di dimetilsolfossido (DMSO) e conservata a 4 °C per un periodo

non superiore a tre settimane. Al momento dell'analisi, 10 μ L della soluzione stock sono stati diluiti in 5 mL di soluzione fisiologica.

- Tasso di Fagocitosi negli emociti

L'attività fagocitica è stata valutata utilizzando campioni di emolinfa fresca prelevati dal muscolo adduttore dei mitili mediante siringhe ipodermiche. In particolare, 50 μ L di emolinfa sono stati incubati per due ore, al buio e in camera umida, con 50 μ L di sospensione di Zymosan fluorescente.

La sospensione di lieviti fluorescenti è stata preparata a partire da una soluzione madre contenente 1 mg di polvere di Zymosan disciolta in 50 μ L di PBS e 1 μ L di NaN_3 ; successivamente, 1 μ L della soluzione ottenuta è stato diluito in 150 μ L di soluzione fisiologica costituita da acqua marina sintetica filtrata al 37‰. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati lavati con soluzione fisiologica, fissati in Baker's Ca-formolo e montati con Eukitt. L'analisi è stata effettuata mediante microscopia ottica e a fluorescenza, valutando il numero di granulociti che, su un totale di 300 cellule osservate, avevano fagocitato almeno tre particelle di lievito fluorescente.

- Danno genotossico, misurabile come integrità del DNA e presenza di micronuclei

L'integrità del DNA è stata valutata attraverso due metodi, il Comet assay e il test dei micronuclei.

Il danno al DNA è stato valutato negli emociti dei mitili mediante il Comet assay. Gli emociti, precedentemente lavati in buffer salino (12,5 mM KCl; 0,5 M NaCl; 20 mM HEPES; 10 mM EDTA) e portati a una concentrazione finale di 40×10^4 cellule mL^{-1} , sono stati inglobati in un triplice strato di agarosio a basso punto di fusione su vetrini pretrattati con agarosio a punto di fusione normale. I preparati sono stati successivamente immersi per 90 minuti, a 4 °C e al buio, in una soluzione di lisi cellulare contenente 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma-base, 1% Triton X-100 e 10% DMSO (pH 10). I vetrini sono stati quindi sottoposti a denaturazione alcalina (75 mM NaOH; 1 mM EDTA; pH > 12) per 10 minuti e successivamente a corsa elettroforetica (1 V cm^{-1} per 10 minuti, a 4 °C e al buio). Al termine dell'elettroforesi, i campioni sono stati neutralizzati mediante incubazione per 10 minuti in tampone TRIS-HCl 400 mM (pH 7,5), fissati in metanolo per 3 minuti a -20 °C e colorati con 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI), fluorocromo specifico per il DNA. L'entità della frammentazione del DNA è stata valutata mediante microscopia a fluorescenza. Utilizzando il software Image Pro-Plus 6.2 sono stati ottenuti mosaici fotografici costituiti da circa 70

nuclei per vetrino; le immagini sono state successivamente analizzate tramite il software CometScore 1.5. Il danno al DNA è stato espresso come percentuale di DNA presente nella coda della cometa, calcolata sulla media dei nuclei analizzati per ciascun preparato.

La frequenza dei micronuclei (MN) è stata invece determinata nelle sospensioni di emolinfa precedentemente fissate in soluzione di Carnoy (acido acetico:metanolo, 1:3). I campioni sono stati strisciati su vetrino da microscopia e colorati con DAPI alla concentrazione di $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. I micronuclei sono stati identificati come strutture tondeggianti ben definite, di dimensioni inferiori a un terzo del nucleo principale, completamente separate da esso e localizzate sul medesimo piano ottico.

La valutazione della frequenza dei MN è stata effettuata mediante microscopia a fluorescenza e conta cellulare. Per ciascun vetrino sono state analizzate almeno 2000 cellule e i risultati sono stati espressi come percentuale di cellule contenenti micronuclei sul totale delle cellule osservate. In alternativa alla colorazione con DAPI, la frequenza dei micronuclei può essere determinata anche mediante colorazione con Giemsa, che consente l'osservazione dei preparati al microscopio ottico (Bolognesi et al., 2004; ICES No. 315, 2012).

- Attività dell'acetilcolinesterasi

L'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE) è stata valutata nei campioni di emolinfa precedentemente centrifugati a $3.000 \times g$ per 5 minuti. Il sovranatante ottenuto è stato impiegato per la determinazione dell'attività enzimatica mediante il metodo colorimetrico di Ellman, effettuato a una temperatura di 18 ± 1 °C e alla lunghezza d'onda di 412 nm, utilizzando un coefficiente di estinzione molare (ϵ) pari a $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ellman et al., 1961). L'attività dell'AChE è stata successivamente normalizzata sulla concentrazione totale di proteine determinata secondo il metodo Lowry, usando l'albumina sierica bovina (BSA) come standard (Lowry et al., 1951).

- Attività degli enzimi antiossidanti

Per la determinazione delle attività degli enzimi antiossidanti, le ghiandole digestive sono state omogeneizzate in rapporto 1:5 (p/v) in tampone K-fosfato 100 mM (pH 7,5) contenente NaCl 1,8% e PMSF 0,1 mM. Gli omogenati sono stati successivamente centrifugati a $100.000 \times g$ per 1 h e 10 min a 4 °C; la frazione citosolica ottenuta è stata aliquotata e conservata a -80 °C fino al momento delle analisi. Le attività enzimatiche sono state determinate mediante saggi spettrofotometrici specifici utilizzando uno spettrofotometro Varian Cary 5 termostato a 18 ± 1 °C (Benedetti et al., 2012).

L'attività della catalasi (CAT) è stata determinata monitorando la diminuzione dell'assorbanza dovuta alla degradazione del perossido di idrogeno (H_2O_2) in acqua e ossigeno molecolare. Le misurazioni sono state effettuate a $\lambda = 240 \text{ nm}$ utilizzando un coefficiente di estinzione millimolare $\varepsilon = 0,04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Il saggio, della durata di un minuto, è stato eseguito in un volume finale di 1 mL contenente tampone K-fosfato 100 mM (pH 7,0), H_2O_2 12 mM e opportune aliquote di campione.

L'attività delle glutatione S-transferasi (GST) è stata valutata seguendo l'aumento di assorbanza associato alla formazione del complesso di coniugazione tra glutatione ridotto (GSH) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). Le misurazioni sono state effettuate a $\lambda = 340 \text{ nm}$ utilizzando un coefficiente di estinzione millimolare $\varepsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La reazione è stata monitorata per un minuto in un volume finale di 1 mL contenente tampone K-fosfato 100 mM (pH 6,5), CDBN 1,5 mM, GSH 1 mM e aliquote appropriate di campione.

L'attività della glutatione reduttasi (GR) è stata determinata monitorando il decremento di assorbanza dovuto al consumo di NADPH durante la riduzione del glutatione ossidato (GSSG) a glutatione ridotto (GSH). Il saggio è stato eseguito a $\lambda = 340 \text{ nm}$ utilizzando un coefficiente di estinzione millimolare $\varepsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La miscela di reazione finale (1 mL) conteneva tampone K-fosfato 100 mM (pH 7,0), GSSG 1 mM, NADPH 0,12 mM e opportune aliquote di campione.

Le attività delle glutathione perossidasi (GPX) Se-dipendenti e totali (Se-dipendenti + Se-indipendenti) sono state misurate mediante un sistema enzimatico accoppiato, nel quale il GSSG prodotto dalla reazione delle GPX viene riconvertito a GSH dalla glutathione reduttasi, con conseguente consumo di NADPH. Tale consumo è stato monitorato spettrofotometricamente come diminuzione di assorbanza a $\lambda = 340 \text{ nm}$ ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Per la valutazione dell'attività delle GPX Se-dipendenti è stato utilizzato come substrato il perossido di idrogeno (H_2O_2), mentre per la determinazione dell'attività totale delle GPX è stato impiegato l'idroperossido di cumene (CuPx), al fine di valutare rispettivamente la capacità di detossificazione verso perossidi inorganici e organici. La miscela finale di reazione (1 mL) conteneva tampone K-fosfato 100 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, GSH 2 mM, NADPH 0,24 mM, H_2O_2 0,5 mM oppure CuPx 0,8 mM, 1 U di GR e opportune aliquote di campione.

- Capacità antiossidante totale (TOSCA)

Il TOSCA è stato eseguito su campioni di citosol, seguendo il metodo descritto in Winston et al., (1998). La componente citosolica è stata ottenuta da campioni di ghiandola digestiva omogenato in working buffer (tampone K-fosfato 50mM pH 7.5, NaCl 1.8%) secondo un rapporto 1:5 p/v. Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 100.000xg per 1h e 10min a 4°C, il sovranatante è stato raccolto e conservato a -80°C fino al momento delle analisi.

Le specie reattive dell'ossigeno, in particolare, il radicale perossilico e il radicale idrossilico sono stati prodotti artificialmente secondo il metodo descritto:

- (1) Radicale perossilico ($\text{ROO}^\cdot$), prodotto tramite omolisi termica di 2,2'-azobi (2-amonidinopropano) (ABAP), in vials di vetro di 10ml, alla temperatura costante di 35°C. Il saggio enzimatico per le analisi è stato preparato utilizzando tampone K-fosfato 50Mm pH 7.4, KMBA 0.2mM e ABAP 20Mm.
- (2) Radicale idrossilico ($^\cdot\text{OH}$), prodotto tramite reazione di Fenton ferro-ascorbato, in vials di vetro di 10ml a 35°C. Il saggio enzimatico finale è stato preparato utilizzando KMBA 0.2mM, Fe^{3+} 1.8 μM , EDTA 3.6mM and acido ascorbico 180 μM in buffer K-fosfato 50mM pH 7.4.

Durante la reazione i ROS ossidano il KMBA producendo etilene, la cui produzione viene misurata tramite gas cromatografo e i risultati sono matematicamente espressi con la seguente equazione:

$$\text{TOSC} = 100 - (\int \text{SA} / \int \text{CA} \times 100)$$

dove $\int \text{SA}$ e $\int \text{CA}$ rappresentano rispettivamente l'integrale dell'area al di sotto la curva del campione e del controllo.

Ogni campione è stato analizzato ad intervalli di 12min per un totale di 96min. I risultati sono stati normalizzati su un contenuto totale di proteine (TOSC/mg di

proteine); la quantità di proteine è stata determinata secondo il metodo Lowry (1951).

- Contenuto di metallotioneine

La concentrazione delle metallotioneine (MTs), proteine citosoliche coinvolte nei processi di detossificazione dei metalli pesanti, è stata determinata a partire dalle ghiandole digestive dei mitili. I campioni sono stati omogeneizzati in rapporto 1:3 (p/v) utilizzando un tampone Tris-HCl 20 mM (pH 8,6) contenente saccarosio 0,5 M, leupeptina 0,006 mM, fenilmetilsolfonilfluoruro (PMSF) 0,5 mM e β -mercaptoetanolo allo 0,01%.

Successivamente, gli omogenati sono stati centrifugati a $30.000 \times g$ per 45 minuti a 4 °C. La frazione contenente le metallotioneine è stata quindi purificata mediante successive precipitazioni etanoliche. Il pellet ottenuto è stato essiccato sotto flusso di azoto e successivamente risospeso in una soluzione contenente NaCl 0,25 M, HCl 1 N ed EDTA 4 mM, al fine di rimuovere i cationi metallici associati alle metallotioneine.

Alla soluzione sono stati poi aggiunti tampone Na-fosfato 200 mM (pH 8), NaCl 2 M e acido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) 0,43 mM; il campione è stato quindi sottoposto a un'ulteriore centrifugazione a $3.000 \times g$ per 5 minuti a 4 °C.

La quantificazione delle metallotioneine è stata effettuata spettrofotometricamente a $\lambda = 412$ nm, mediante la determinazione dei gruppi sulfidrilici (-SH) reagenti con DTNB. La concentrazione è stata calcolata utilizzando una curva standard ottenuta con concentrazioni note di glutathione ridotto (GSH; 50–500 μ M) (Viarengo et al., 1997).

- Induzione della perossidazione lipidica: livelli di malondialdeide

Il contenuto di malondialdeide, principale prodotto di perossidazione lipidica, è stato misurato su campioni di ghiandola digestiva omogenati in buffer Tris-HCL 20mM pH 7.4 (1:5 p/v) e successivamente centrifugati a 3.000xg per 20min. La reazione di coniugazione è stata condotta a 45°C per 40 min in un volume finale di 1ml costituito da: 1-metil-2-fenilindolo 10.3mM in acetonitrile diluito in rapporto 3:1 con metanolo, HCL 37%, acqua distillata e un'opportuna aliquota di campione.

Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati nuovamente centrifugati a 15.000xg per 10min e misurati spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di $\lambda=586$ nm (Bocchetti e Regoli, 2006), utilizzando come standard 1,1,3,3-tetrametossipropanone in Tris-HCL 20mM.

- Contenuto di lipofuscina

La quantificazione della lipofuscina è stata determinata su sezione di 8µm di ghiandola digestiva seguendo la reazione di Schmrol (Moore, 1988). Le sezioni sono state fissate in Beker's Ca-formolo (10ml di formaldeide 40%, 1g di CaCl₂ e 2.5% NaCl, portato a volume con acqua distillata) per 15min a 4°C; successivamente sono state sciacquate in acqua distillata e colorate in soluzione di cloruro ferrico 1% e ferrocianuro di potassio (5:1) per 5min, portato a volume con 50ml di acqua distillata. Infine, i campioni sono stati lavati in acido acetico 2% e poi in acqua distillata, e successivamente montati in gelatina di glicerolo.

Le sezioni sono state osservate al microscopio ottico Olympus, per ogni campione sono state raccolte quattro immagini, successivamente analizzate tramite il software Image Pro Plus 6.2. I risultati sono stati espressi attraverso l'intensità della colorazione dei granuli di lipofuscina per µm² dell'area totale del tessuto dei tubuli digestivi.

- Contenuto di lipidi neutri

La quantificazione dei lipidi neutri è stata svolta su sezioni criostatiche di ghiandola digestiva di 8µm processate seguendo il metodo Oil Red O descritto da Moore (1988). Le sezioni sono state fissate in Baker's Ca-formolo (10 mL di Formaldeide al 40%; 1 g di CaCl₂, NaCl al 2.5%, portato a volume con acqua distillata) per 15min a 4°C e sciacquate in alcol isopropilico 60%, successivamente le sezioni sono state colorate in una soluzione di Oil Red (1%

alcool isopropilico) per 15min e sciacquati nuovamente in alcol isopropilico 60% e, infine, in acqua distillata. Prima delle analisi al microscopio le sezioni sono state fissate in glicerolo.

Le sezioni sono state osservate al microscopio ottico Olympus dotato di fotocamera QICAM Fast 1394 attraverso la quale sono state scattate 4 foto per ciascuna sezione e successivamente analizzate tramite il software Image Pro Plus

6.2. I risultati sono stati espressi attraverso l'intensità di fluorescenza per μm^2 dell'area totale del tessuto di ghiandola digestiva.

3.3 Analisi statistiche ed elaborazione Weight of Evidence

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software R-can (<http://www.Rproject.org>). L'analisi della varianza (ANOVA) a una via è stata applicata per testare la significatività delle differenze nei risultati dei biomarker nei mitili. L'omogeneità della varianza è stata verificata mediante il test di Cochran C e l'analisi *post-hoc* (Newman-Keuls) ha permesso di verificare la significatività delle differenze tra le diverse stazioni.

Tutti i dati ottenuti sono stati infine elaborati mediante il modello di analisi del rischio ecologico Sediqualssoft, basato su un approccio quantitativo di tipo Weight of Evidence (WOE), in grado di integrare differenti linee di evidenza (Lines of

Evidence, LOEs) derivanti da diverse tipologie di indagine nella valutazione complessiva del rischio ecologico. Il modello SediquaSoft è stato sviluppato specificamente per l'applicazione alla valutazione della qualità ambientale e del rischio ecologico associato a sedimenti e ambienti contaminati (Piva et al., 2011; Benedetti et al., 2012; Regoli et al., 2014, 2019).

Nello specifico, i risultati sono stati elaborati mediante criteri ponderati al fine di ottenere coefficienti sintetici di rischio (Hazard Quotients, HQs) per ciascuna condizione sperimentale e per ogni fase dello studio. Tale approccio consente di sintetizzare la rilevanza biologica complessiva dei risultati considerando il numero delle variazioni osservate, la rilevanza tossicologica dei singoli biomarker, la significatività statistica e l'entità delle variazioni rispetto a specifiche soglie di riferimento. I valori di HQ ottenuti vengono successivamente attribuiti a una delle cinque classi di rischio previste dal modello, da assente a severo, consentendo una valutazione integrata e facilmente interpretabile dello stato di rischio ecologico.

4. RISULTATI

Di seguito vengono riportati i risultati delle risposte biologiche (biomarker) analizzate nei tessuti del *Mytilus galloprovincialis*.

4.1 Parametri immunitari

La stabilità della membrana lisosomiale è stata misurata nell'emolinfa dei mitili mediante il metodo del Neutral Red Retention Time. Tale test non ha evidenziato differenze statisticamente significative, con valori compresi tra 59.72 ± 8.73 e 74.63 ± 5.53 minuti (Fig. 7A).

Al contrario, la capacità fagocitaria degli emociti ha mostrato una riduzione statisticamente significativa nei mitili trapiantati nelle piattaforme Rospo Mare B e Rospo Mare C rispetto agli organismi di controllo e a quelli trapiantati presso la piattaforma Rospo Mare A. In particolare, i valori medi sono diminuiti da 23.33 ± 5.57 nel sito di controllo a 8.56 ± 3.34 % nella piattaforma Rospo Mare C (Fig. 7B).

Non sono state inoltre osservate variazioni statisticamente significative per quanto riguarda il danno genotossico, valutato sia come frammentazione del DNA sia come frequenza dei micronuclei (Fig. 7C-D).

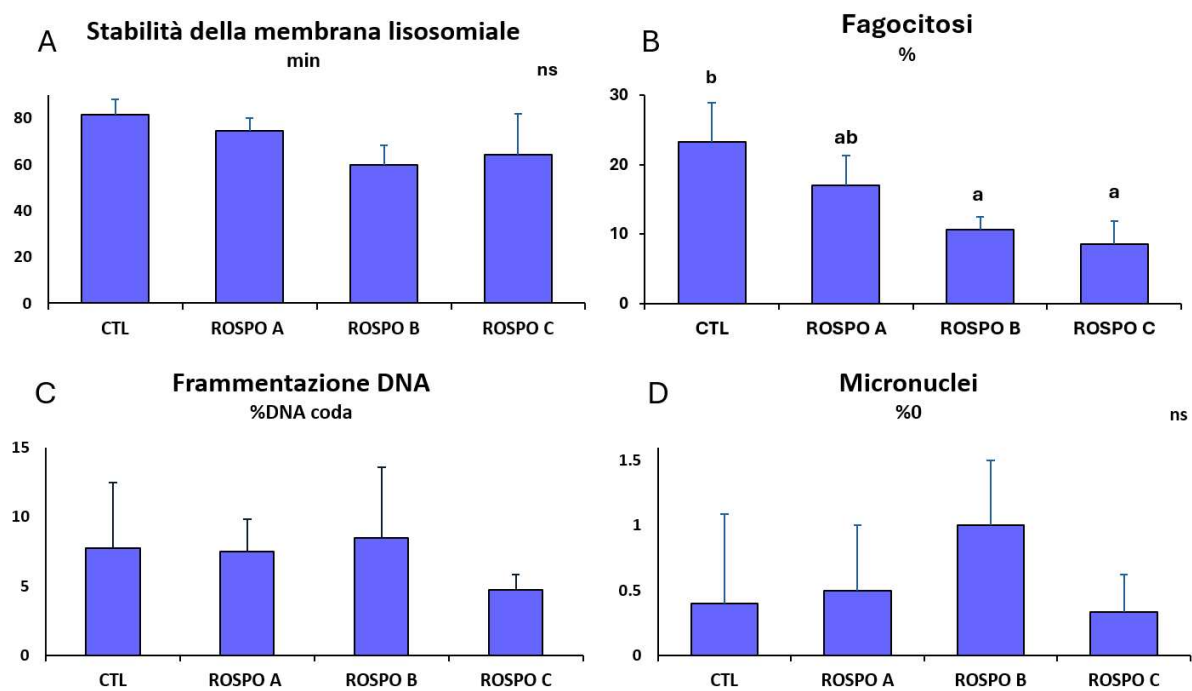


Figura 7. Parametri immunitari nei mitili traslocati per 5 settimane nelle piattaforme ROSPO A, ROSPO B, ROSPO C e nel sito di riferimento, CTL. A) Stabilità della membrana lisosomiale, B) tasso di fagocitosi (medie $\pm$ deviazioni standard, $n=5$), C) frammentazione del DNA e D) frequenza dei micronuclei (medie $\pm$ SEM, $n=5$).

4.2 Attività dell'Acetilcolinesterasi

L'attività dell'AChE misurata nell'emolinfa non ha mostrato differenze statisticamente significative, evidenziando valori comparabili tra le tre piattaforme e il controllo. In particolare, i valori registrati sono compresi tra 102.98 ± 10.96 e 129.02 ± 16.86 nmol/min/ mg prot (Fig. 8).

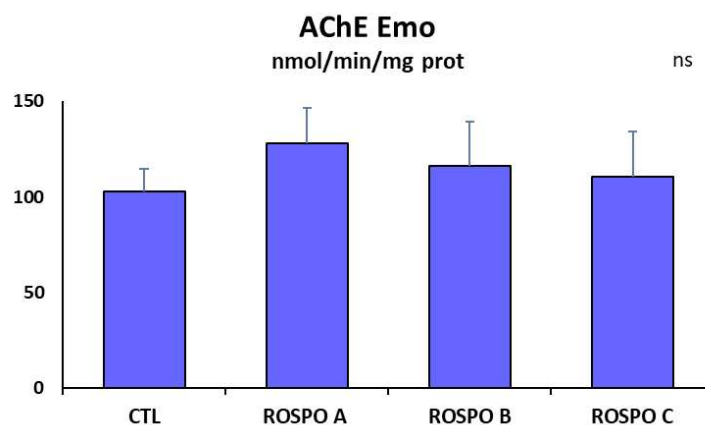


Figura 8. Attività dell'acetilcolinesterasi nell'emolinfa dei mitili traslocati per 5 settimane nelle piattaforme ROSPO A, ROSPO B, ROSPO C e nel sito di riferimento, CTL (medie $\pm$ deviazioni standard, n=5).

4.3 Enzimi antiossidanti e capacità antiossidante totale

Le analisi dei biomarker di stress ossidativo non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra i mitili trapiantati nelle diverse piattaforme offshore e quelli provenienti dall'area di controllo (Fig. 9).

Per quanto riguarda gli enzimi antiossidanti, l'attività della catalasi ha mostrato valori compresi tra $9,12 \pm 1,14$ e $11,93 \pm 2,50$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteine. Analogamente, le attività delle glutathione S-transferasi e della glutathione reduttasi risultano comprese rispettivamente tra 44,19 e 66,27 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteine e tra 15,19 e 17,17 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteine. Anche per le glutathione perossidasi (GPX) non sono state osservate variazioni statisticamente significative, con valori compresi tra $1,85 \pm 0,64$ e $3,95 \pm 0,61$ $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteine per le forme Se-

dipendenti e tra $3,12 \pm 2,29$ e $6,57 \pm 2,24$ nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteine per le GPX totali (Fig. 9A-E).

Per quanto riguarda la capacità antiossidante totale, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative nei confronti né del radicale perossilico (ROO•) né del radicale ossidrilico (•OH) tra i diversi siti sperimentali. In particolare, i valori relativi al radicale perossilico risultavano compresi tra $232,26 \pm 17,94$ e $313,71 \pm 79,75$ UTOSC mg⁻¹ proteine, mentre quelli relativi al radicale ossidrilico variavano tra $255,55 \pm 9,41$ e $290,49 \pm 115,99$ UTOSC mg⁻¹ proteine (Fig. 9F-G).

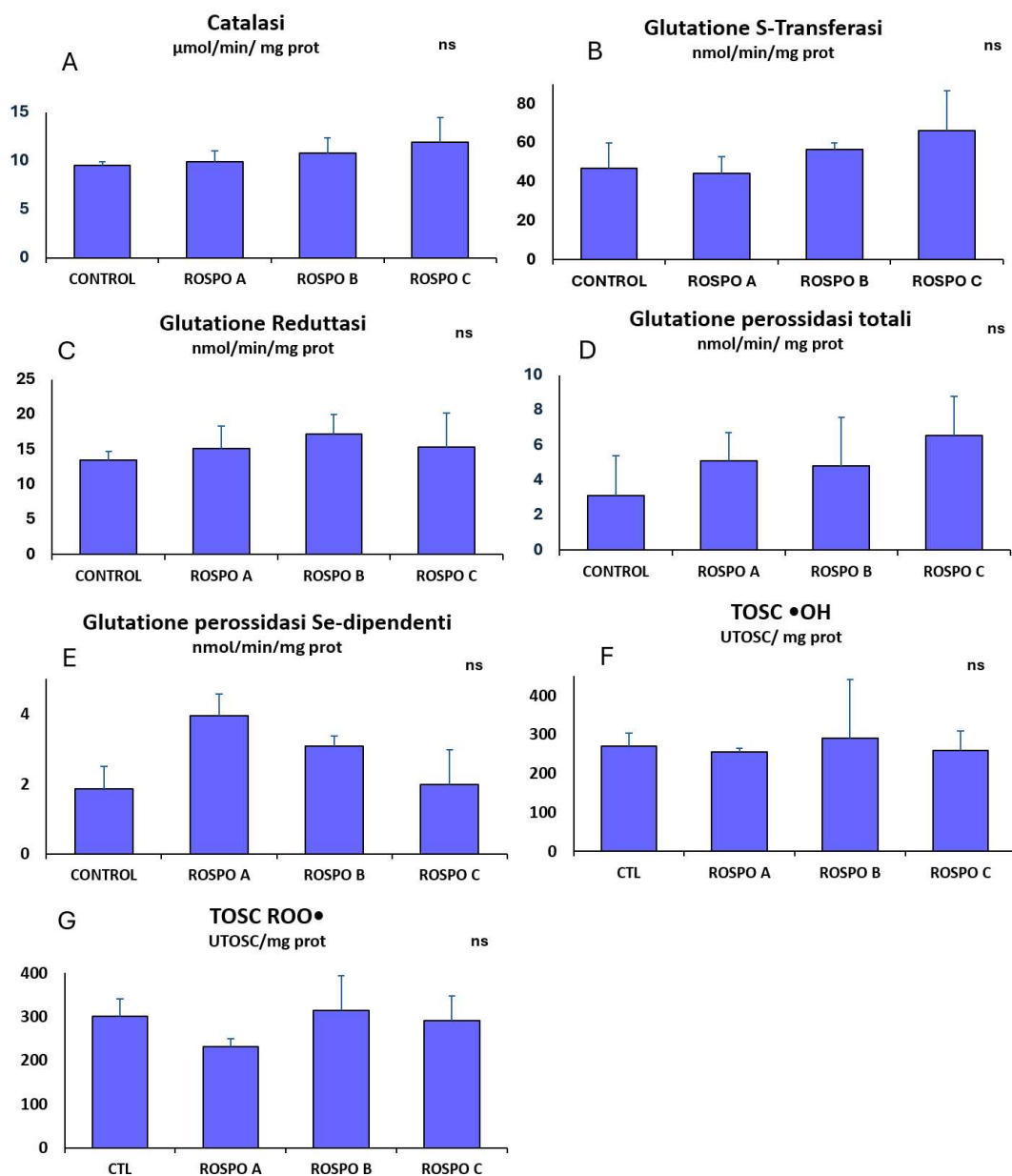


Figura 9. Enzimi antiossidanti e capacità antiossidante totale misurati nella ghiandola digestiva dei mitili traslocati per 5 settimane nelle piattaforme ROSPO A, ROSPO B, ROSPO C e nel sito di riferimento, CTL. A) Catalasi, B) Glutazione S-transferasi, C) Glutazione reduttasi, D) Glutazione perossidasi totali, E) Glutazione perossidasi Se-dipendenti, F) TOSCA ($\bullet\text{OH}$) e G) TOSCA ($\text{ROO}\bullet$) (medie $\pm$ deviazioni standard, $n=5$).

4.4 Metallotioneine

Per quanto riguarda il contenuto di metallotioneine nella ghiandola digestiva, nessuna variazione statisticamente significativa è stata osservata. In particolare, i valori ottenuti oscillano tra 2.52 ± 0.91 e 2.94 ± 0.66 nmol/mg prot (Fig.10).

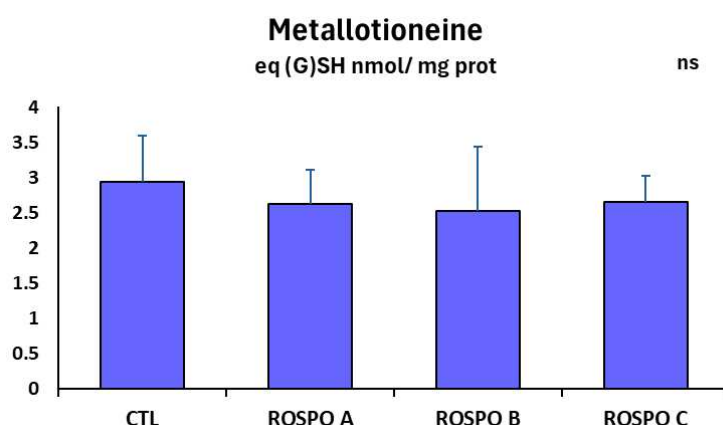


Figura 10. Livelli di metallotioneine nella ghiandola digestiva dei mitili traslocati per 5 settimane nelle piattaforme ROSPO A, ROSPO B, ROSPO C e nel sito di riferimento, CTL (medie $\pm$ deviazioni standard, n=5).

4.5 Perossidazione delle membrane e metabolismo lipidico

Per quanto riguarda i biomarker associati alla perossidazione lipidica e al metabolismo dei lipidi, non sono state osservate differenze statisticamente significative nei livelli di malondialdeide (MDA), che hanno mostrato valori particolarmente variabili e compresi tra $21,25 \pm 19,23$ e $108,19 \pm 78,64$ nmol g⁻¹ tessuto (Fig. 11A).

Al contrario, i livelli di lipofuscina, pigmento derivante dai processi di perossidazione lipidica, hanno evidenziato un aumento statisticamente significativo nei mitili trapiantati presso la piattaforma Rospo Mare C rispetto agli organismi provenienti dal sito di controllo e dalle piattaforme Rospo Mare A e Rospo Mare B. I valori registrati risultano compresi tra $95,56 \pm 30,07$ e $177,07 \pm 29,36$ Intensità μm^{-2} (Fig. 11B).

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata invece osservata per il contenuto di lipidi neutri, con valori compresi tra $42,78 \pm 5,87$ e $72,85 \pm 49,76$ Intensità μm^{-2} (Fig. 11C).

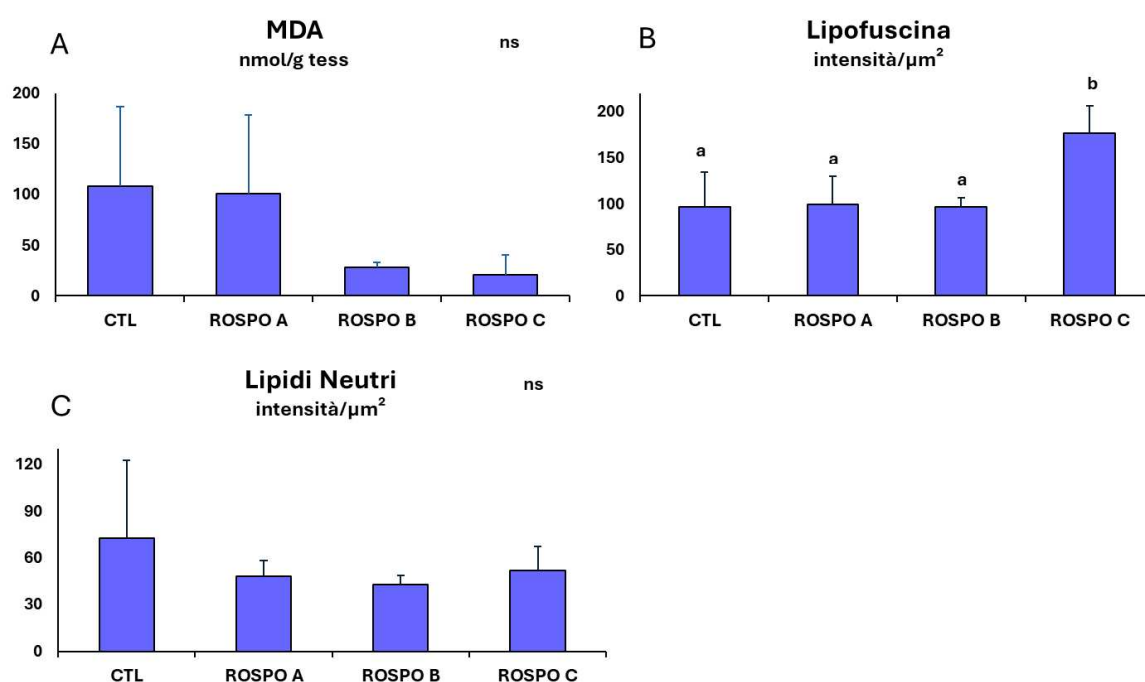


Figura 11. Perossidazione e metabolismo lipidico nella ghiandola digestiva dei mitili traslocati per 5 settimane nelle piattaforme ROSPO A, ROSPO B, ROSPO C e nel sito di riferimento, CTL. A) Contenuto di malondialdeide, B) livelli di lipofuscina e di C) lipidi neutri (medie $\pm$ deviazioni standard, n=5).

4.6 Elaborazione Weight of Evidence

Tutti i risultati ottenuti dalle risposte biologiche negli organismi traslocati sono stati successivamente elaborati mediante l'applicazione di criteri di integrazione ponderata, finalizzati alla definizione di un indice sintetico di pericolo. Tale indice tiene conto del numero di biomarker che mostrano variazioni, della loro rilevanza tossicologica, della significatività statistica e dell'entità delle alterazioni osservate rispetto a specifiche soglie di riferimento.

Per quanto riguarda l'elaborazione mediante il modello Weight of Evidence (WOE), il livello di pericolo associato ai biomarker è risultato classificabile come basso (SLIGHT) per tutte e tre le piattaforme offshore analizzate.

Le risposte biologiche che più frequentemente hanno mostrato variazioni appartenenti alle classi di pericolo più elevate (moderato, maggiore e severo) sono risultate l'attività della glutazione perossidasi Se-dipendente, la capacità fagocitaria e i livelli di lipofusina (Fig. 12).

Site	Number of biomarkers assigned to the different classes					Classe di pericolo
	Absent	Slight	Moderate	Major	Severe	
ROSPO A	14	1 TOSCA	0	1 GPx H2O2	0	SLIGHT 
ROSPO B	11	3 MIN - NRRT - MDA	2 GPx H2O2 - FAGO	0	0	SLIGHT 
ROSPO C	12	2 GPx H2O2 - MDA	1 LIPO	1 FAGO	0	SLIGHT 

Figura 12. Risultati dell'elaborazione complessiva del pericolo relativo ai biomarker nei mitili delle piattaforme ROSPO A, ROSPO B e ROSPO C

5. DISCUSSIONI

Negli ultimi decenni, il progressivo aumento della domanda energetica globale ha determinato un'intensificazione delle attività di estrazione di idrocarburi, sia sulla terraferma sia in ambiente marino. In quest'ultimo contesto, lo sfruttamento delle risorse energetiche avviene mediante l'utilizzo di piattaforme offshore, strutture che possono esercitare diverse forme di pressione sugli ecosistemi circostanti. Oltre agli impatti fisici associati alla presenza delle infrastrutture, le attività estrattive possono infatti generare inquinamento acustico e luminoso e comportare il rilascio di contaminanti, quali idrocarburi e metalli in tracce, con potenziali effetti sugli organismi marini.

Nel Mar Adriatico, uno dei bacini maggiormente interessati dalle attività offshore nel Mediterraneo, l'estrazione di idrocarburi ha avuto inizio negli anni Sessanta e continua tuttora a rappresentare una rilevante fonte di pressione antropica. In questo contesto si inserisce il campo offshore Rospo Mare, situato al largo delle coste di Abruzzo e Molise, oggetto del presente studio.

Al fine di valutare i potenziali effetti biologici associati alle attività estrattive del sito, è stato condotto un programma di biomonitoraggio mediante l'approccio Mussel Cage, utilizzando *Mytilus galloprovincialis* come organismo sentinella.

Per quanto riguarda i biomarcatori immunitari, i risultati ottenuti non hanno evidenziato alterazioni diffuse negli organismi traslocati presso le piattaforme offshore. Confrontando i risultati ottenuti con quelli del precedente programma di biomonitoraggio condotto nel 2016 presso il campo offshore Rospo Mare, i valori di stabilità della membrana lisosomiale sono risultati inferiori. Tuttavia, essi sono comparabili a quelli osservati da Gomiero et al. (2011) in mitili esposti nei pressi di piattaforme offshore per l'estrazione di gas. Tale evidenza non sembra indicare una condizione di particolare stress cellulare, poiché la stabilità della membrana lisosomiale è influenzata anche da fattori naturali quali la stagionalità, il ciclo riproduttivo e le elevate temperature tipiche del periodo estivo, che possono determinare una riduzione del tempo di ritenzione del Rosso Neutro (Regoli, 1992). Inoltre, l'assenza di variazioni concomitanti per quanto riguarda gli altri parametri analizzati suggerisce che i valori osservati possano riflettere la normale variabilità fisiologica degli organismi piuttosto che una reale condizione di stress ambientale.

Anche i livelli di frammentazione del DNA sono risultati inferiori rispetto a quelli registrati nel monitoraggio del 2016, mentre la frequenza dei micronuclei è risultata sostanzialmente comparabile. I valori osservati rientrano inoltre nell'intervallo riportato in precedenti studi condotti su mitili esposti in prossimità di installazioni offshore e nei relativi siti di riferimento (Gorbi et al., 2008;

Benedetti et al., 2014), suggerendo l'assenza di fenomeni rilevanti di danno cellulare associati alle attività estrattive del campo Rospo Mare. Contrariamente, la capacità fagocitaria ha evidenziato una riduzione statisticamente significativa nei mitili esposti presso le piattaforme ROSPO B e ROSPO C rispetto sia agli organismi di controllo sia a quelli trapiantati presso ROSPO A. Inoltre, i valori osservati nel presente studio risultano sensibilmente inferiori rispetto a quelli registrati nel precedente monitoraggio del 2016, durante il quale la capacità fagocitaria variava tra il 34,4% e il 41,5%. Tuttavia, la riduzione della fagocitosi osservata nel presente studio non è stata accompagnata da alterazioni della stabilità della membrana lisosomiale né da un aumento delle risposte di danno al DNA, rendendo difficile attribuire con certezza tale risposta all'esposizione ai contaminanti associati alle attività estrattive.

Per quanto riguarda l'attività dell'acetilcolinesterasi, non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i mitili trapiantati presso le piattaforme offshore e quelli provenienti dal sito di riferimento. Tali risultati suggeriscono l'assenza di effetti neurotossici riconducibili all'esposizione ai contaminanti presenti nell'area di studio.

L'AChE rappresenta uno dei biomarker maggiormente utilizzati per valutare alterazioni neurotossiche, poiché la sua attività può essere inibita dall'esposizione a diverse classi di contaminanti, tra cui pesticidi organofosforici e carbammati,

ma anche metalli in tracce e alcuni idrocarburi. Tuttavia, numerosi studi hanno evidenziato come questo biomarker possa essere influenzato anche da fattori fisiologici e ambientali indipendenti dalla contaminazione.

In particolare, Bocchetti e Regoli (2006) e Gorbi et al. (2008) hanno documentato una marcata variabilità stagionale dell'attività dell'AChE nei mitili, con valori generalmente inferiori durante il periodo estivo rispetto ad altre stagioni dell'anno. Pertanto, le differenze osservabili tra campagne di monitoraggio condotte in anni diversi potrebbero riflettere non solo variazioni nelle condizioni ambientali, ma anche la naturale variabilità biologica della specie.

I biomarker associati allo stress ossidativo non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra i mitili trapiantati presso le piattaforme Rospo Mare e quelli provenienti dal sito di riferimento. I valori osservati risultano inoltre confrontabili con quelli riportati in precedenti studi condotti su mitili esposti in prossimità di installazioni offshore o provenienti da aree costiere considerate non impattate (Bocchetti e Regoli, 2006; Gorbi et al., 2008). Tali studi hanno evidenziato come le difese antiossidanti siano influenzate non solo dalla presenza di contaminanti, ma anche da fattori fisiologici e ambientali, tra cui temperatura, disponibilità trofica e ciclo stagionale.

In particolare, Bocchetti e Regoli (2006) e Gorbi e coautori (2008) hanno descritto una marcata variabilità stagionale di diversi enzimi antiossidanti, con valori

generalmente inferiori durante il periodo estivo rispetto ai mesi primaverili. Pertanto, le differenze osservabili tra campagne di monitoraggio condotte in anni diversi potrebbero riflettere, almeno in parte, la naturale variabilità biologica della specie oltre che eventuali differenze nelle condizioni ambientali.

Nel complesso, la mancanza di una risposta coordinata del sistema antiossidante e l'assenza di variazioni nella capacità antiossidante totale indicano che l'esposizione ai contaminanti presenti nell'area di studio non ha determinato un'attivazione significativa dei meccanismi di difesa contro lo stress ossidativo.

Le metallotioneine non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra i mitili trapiantati presso le piattaforme Rospo Mare e quelli provenienti dal sito di riferimento. Considerando il ruolo di queste proteine nella detossificazione e nell'omeostasi dei metalli, l'assenza di variazioni suggerisce che gli organismi esposti non siano stati soggetti a livelli di contaminazione da metalli biodisponibili tali da indurre una risposta adattativa misurabile.

I valori osservati risultano comparabili a quelli riportati in precedenti studi condotti sia in prossimità di installazioni offshore sia in aree di riferimento considerate non impattate (Bocchetti e Regoli, 2006; Gorbi et al., 2008). Inoltre, le concentrazioni misurate nel presente studio sono in linea con quelle registrate durante il precedente monitoraggio del campo Rospo Mare effettuato nel 2016, indicando una sostanziale stabilità di questo biomarker nel tempo.

L'interpretazione delle metallotioneine è tuttavia complessa, poiché la loro espressione può essere influenzata non solo dall'esposizione ai metalli ma anche da diversi fattori fisiologici e ambientali. In particolare, la letteratura riporta risultati contrastanti riguardo alla variabilità stagionale di questo biomarker, con alcuni studi che evidenziano concentrazioni più elevate durante il periodo invernale (Ivanković et al., 2005), altri che riportano una tendenza opposta (Viarengo et al., 1997) e altri ancora che non osservano differenze significative tra le stagioni (Bocchetti e Regoli, 2006).

Per quanto riguarda i biomarker associati alla perossidazione lipidica e al metabolismo dei lipidi, i risultati ottenuti non hanno evidenziato differenze statisticamente significative, ad eccezione del contenuto di lipofusina. In particolare, né i livelli di malondialdeide, principale prodotto della perossidazione lipidica, né il contenuto di lipidi neutri hanno mostrato differenze statisticamente significative rispetto agli organismi provenienti dal sito di riferimento. L'assenza di variazioni nei livelli di MDA è coerente con quanto osservato per gli altri biomarker di stress ossidativo, che nel complesso non hanno evidenziato l'attivazione di meccanismi di difesa antiossidante né condizioni di squilibrio redox. Analogamente, il contenuto di lipidi neutri è risultato comparabile tra i diversi siti di esposizione, suggerendo l'assenza di alterazioni significative del metabolismo energetico e lipidico degli organismi. Risultati simili sono stati

osservati anche da Gorbi et al. (2008) in mitili esposti presso installazioni offshore dell'Adriatico.

Al contrario, i livelli di lipofuscina sono risultati significativamente più elevati nei mitili esposti presso la piattaforma ROSPO C. La lipofuscina rappresenta un prodotto finale dei processi di ossidazione e degradazione incompleta di lipidi e proteine e tende ad accumularsi nelle cellule in seguito a condizioni di stress protratte nel tempo. Pertanto, il suo aumento potrebbe riflettere processi di danno cellulare cumulativo piuttosto che una risposta a uno stress ossidativo acuto.

Tuttavia, l'incremento osservato non è stato accompagnato da variazioni nei livelli di MDA, nei biomarker enzimatici di stress ossidativo o nella capacità antiossidante totale. Questa mancanza di risposte concordanti rende difficile attribuire con certezza l'aumento della lipofuscina all'esposizione ai contaminanti associati alle attività estrattive. È inoltre possibile che fattori fisiologici e ambientali contribuiscano alla variabilità di questo parametro, come già osservato in precedenti studi condotti su mitili nel Mar Adriatico (Bocchetti e Regoli, 2006; Gorbi et al., 2008).

L'interpretazione dei singoli biomarker può risultare complessa, poiché ciascun parametro è caratterizzato da una specifica sensibilità nei confronti dei contaminanti ed è influenzato, in misura variabile, da fattori fisiologici e ambientali. Per questo motivo, i risultati ottenuti sono stati integrati mediante

l'approccio quantitativo Weight of Evidence (WOE), che consente di valutare il rischio complessivo considerando contemporaneamente il numero delle risposte osservate, la loro rilevanza tossicologica, la significatività statistica e l'entità delle variazioni rispetto a specifiche soglie di riferimento. L'elaborazione dei dati ha attribuito a tutte le piattaforme investigate una classe di pericolo classificabile come bassa. Tale risultato è coerente con quanto emerso dall'analisi dei singoli biomarker, che nel complesso non hanno evidenziato alterazioni diffuse o risposte biologiche coordinate riconducibili a una condizione di stress significativa.

6. CONCLUSIONI

Il presente studio ha avuto come obiettivo la valutazione dei potenziali effetti biologici associati alle attività estrattive del campo offshore Rospo Mare attraverso l'utilizzo di *Mytilus galloprovincialis* come organismo sentinella e l'applicazione di una batteria integrata di biomarker ecotossicologici.

Nel complesso, i risultati ottenuti non hanno evidenziato alterazioni biologiche significative negli organismi traslocati presso le piattaforme offshore rispetto al sito di riferimento. I valori osservati risultano inoltre generalmente confrontabili con quelli riportati in precedenti studi condotti nel Mar Adriatico e, in molti casi, coerenti con i risultati ottenuti durante il monitoraggio effettuato presso il campo ROSPO MARE nel 2016. Le limitate variazioni osservate sembrano essere maggiormente influenzate da fattori fisiologici e stagionali piuttosto che dalla presenza di contaminanti. Inoltre, l'integrazione dei risultati mediante l'approccio Weight of Evidence ha confermato questo quadro, attribuendo a tutte le piattaforme investigate una classe di pericolo classificabile come bassa. Nel loro insieme, i dati ottenuti suggeriscono quindi che, durante il periodo di monitoraggio considerato, le attività del campo offshore Rospo Mare non abbiano determinato effetti biologici rilevanti nei mitili traslocati. A tal riguardo, il biomonitoraggio mediante organismi sentinella e biomarker ecotossicologici si conferma uno strumento fondamentale per la valutazione degli effetti sub-letali

associati alle attività offshore, consentendo di individuare precocemente eventuali alterazioni biologiche non rilevabili attraverso le sole analisi chimiche. In quest'ottica, il proseguimento delle attività di monitoraggio rappresenta un elemento essenziale per garantire una gestione sostenibile delle attività estrattive e la tutela degli ecosistemi marini del Mar Adriatico.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aboughazala L.M., Anan, F.M., (2020). Study on serum cholinesterase as marker of chronic liver disease. *Al-Azhar University Journal of Virus Researches and Studies*, 2(8), 1–15. <https://doi.org/10.21608/AUJV.2020.106729>
- Aderem, A., Underhill, D.M., (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*, 17(1), 593–623. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bakke, T., Klungsøyr, J., Sanni, S., (2013). Environmental impacts of produced water and drilling waste discharges from the Norwegian offshore petroleum industry. *Marine Environmental Research*, 92, 154–169. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.09.012>
- Barile, N.B., Scopa, M., Recchi, S., Nerone, E., (2016). Biomonitoring of coastal marine waters subject to anthropogenic use: Development and application of the biosensor Mosselmonitor®. *Ovidius University Annals of Chemistry*, 27(2), 81–86. <https://doi.org/10.1515/auoc-2016-0013>

Bebianno, M.J., Lopes, B., Guerra, L., Hoarau, P., Ferreira, A.M., (2007). Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: Effect of abiotic factors. *Environment International*, 33(4), 550–558.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.11.002>

Beedanagari, S., Vulimiri, S.V., Bhatia, S., Mahadevan, B., (2014). Genotoxicity biomarkers. In *Biomarkers in Toxicology* (pp. 729–742). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00043-9>

Bellentani, G., Godi, A., Siliprandi, F., Terdich, P., Famy, C., Fournier, F., Le Maux, T., (2016). Rospo mare integrated reservoir study Italy, Adriatic sea: An innovative approach of karst system modeling and history match. *SPE Annual Technical Conference and Exhibition*, D011S017R008. Dubai, UAE: SPE.
<https://doi.org/10.2118/181636-MS>

Benedetti, M., Ciaprini, F., Piva, F., Onorati, F., Fattorini, D., Notti, A., ... Regoli, F. (2012). A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: Integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environment International*, 38(1), 17–28.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.08.003>

- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Bocchetti, R., Regoli, F., (2006). Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere*, 65(6), 913–921. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.049>
- Bolognesi, C., Frenzilli, G., Lasagna, C., Perrone, E., Roggieri, P. (2004). Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: Wild versus caged mussels. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552(1–2), 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.012>
- Bouallegui, Y. (2019). Immunity in mussels: An overview of molecular components and mechanisms with a focus on the functional defenses. *Fish & Shellfish Immunology*, 89, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.057>
- Brenner, M., Broeg, K., Frickenhaus, S., Buck, B. H., & Koehler, A. (2014). Multi-biomarker approach using the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) to assess the quality of marine environments: Season and habitat-related impacts. *Marine Environmental Research*, 95, 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.12.009>

Brigelius-Flohé, R., Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3289–3303.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>

Bright, A., Li, F., Movahed, M., Shi, H., Xue, B. (2023). Chronic exposure to low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons promotes lipid accumulation and metabolic inflammation. *Biomolecules*, 13(2), 196.

<https://doi.org/10.3390/biom13020196>

Cajaraville M.P., Bebianno M.J., Blasco J., Porte C., Sarasquete C., Viarengo A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*, 247(2), p. 295-311

Colovic, M.B., Krstic, D.Z., Lazarevic-Pasti, T.D., Bondzic, A.M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology.

<https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195–

1214. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>

- Couto, N., Wood, J., Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, 95, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>
- De Lima, D., Roque, G.M., De Almeida, E.A. (2013). In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (Danio rerio). *Marine Environmental Research*, 91, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.11.005>
- Duan, H., Peng, X., Qin, S., Zhou, Y., Xiao, D., Tao, Y., Liu, S. (2026). Micronuclei: Origins, assays, mechanisms, diseases and treatments. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 11(1), 114. <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02538-8>
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Farrington, J.W., Goldberg, E.D., Risebrough, R.W., Martin, J.H., Bowen, V.T. (1983). U.S. «Mussel Watch» 1976-1978: An overview of the trace-metal, DDE, PCB, hydrocarbon and artificial radionuclide data. *Environmental Science & Technology*, 17(8), 490–496. <https://doi.org/10.1021/es00114a010>

Farrington, J.W., Tripp, B.W., Tanabe, S., Subramanian, A., Sericano, J.L., Wade, T.L., Knap, A.H. (2016). Edward D. Goldberg's proposal of "the Mussel Watch": Reflections after 40 years. *Marine Pollution Bulletin*, 110(1), 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.074>

Fattorini, D. (2025). Hydrocarbons in seawater: Sources, fate, impacts, and remediation strategies. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution*, 22(6), 21. <https://doi.org/10.36922/AJWEP025290224>

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

Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Brousseau, P. (2000). Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *American Zoologist*, 40(3), 412–420. <https://doi.org/10.1093/icb/40.3.412>

Frenzilli, G., Nigro, M., Scarcelli, V., Gorbi, S., Regoli, F. (2001). DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: A field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. *Aquatic Toxicology*, 53(1), 19–32. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00159-4](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00159-4)

- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B. (2009). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(1), 80–92. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.001>
- Gomiero, A., Da Ros, L., Nasci, C., Meneghetti, F., Spagnolo, A., Fabi, G. (2011). Integrated use of biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis* for assessing off-shore gas platforms in the Adriatic Sea: Results of a two-year biomonitoring program. *Marine Pollution Bulletin*, 62(11), 2483–2495. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.08.015>
- Gomiero, A., Volpato, E., Nasci, C., Perra, G., Viarengo, A., Dagnino, A., Fabi, G. (2015). Use of multiple cell and tissue-level biomarkers in mussels collected along two gas fields in the northern Adriatic Sea as a tool for long term environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 93(1–2), 228–244. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.034>
- Gorbi, S., Baldini, C., Regoli, F. (2005). Seasonal variability of metallothioneins, cytochrome P450, bile metabolites and oxyradical metabolism in the European eel *Anguilla anguilla* L. (Anguillidae) and striped mullet *Mugil cephalus* L. (Mugilidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49(1), 62–70. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0150-9>
- Gorbi, S., Virno Lamberti, C., Notti, A., Benedetti, M., Fattorini, D., Molledo, G., Regoli, F. (2008) An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus*

galloprovincialis, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic Sea. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2007.07.006>

Hintzsche, H., Hemmann, U., Poth, A., Utesch, D., Lott, J., Stopper, H. (2017). Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 771, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.02.002>

Hossen, S., Hanif, M.A., Kho, K.H. (2023). Glutathione reductase, a biomarker of pollutant and stress in Pacific abalone. *Marine Pollution Bulletin*, 192, 115139. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115139>

ICES-International Council for the Exploration of the Sea, 2012. Techniques in Marine Environmental Sciences. Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. No. 315, 2012.

ICES-International Council for the Exploration of the Sea, 2015. Techniques in Marine Environmental Sciences. Lysosomal membrane stability in mussels No. 56, 2015

Ivanković, D., Pavičić, J., Erk, M., Filipović-Marijić, V., Raspor, B. (2005). Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability. *Marine Pollution Bulletin*, 50(11), 1303–1313. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.04.039>

- Jung, T., Bader, N., & Grune, T. (2007). Lipofuscin: Formation, distribution, and metabolic consequences. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1119(1), 97–111. <https://doi.org/10.1196/annals.1404.008>
- Kedrowski, B.L., Gutow, J.H., Stock, G., Smith, M., Jordan, C., Masterson, D.S. (2014). Glutathione reductase activity with an oxidized methylated glutathione analog. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(4), 491–494. <https://doi.org/10.3109/14756366.2013.805757>
- Khessiba, A., Roméo, M., Aïssa, P. (2005). Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environmental Pollution*, 133(2), 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.05.035>
- Kraus, R., Grilli, F., Supić, N., Janeković, I., Brailo, M., Cara, M., Škalic, D. (2019). Oceanographic characteristics of the Adriatic Sea – Support to secondary HAOP spread through natural dispersal. *Marine Pollution Bulletin*, 147, 59–85. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.062>
- Kumar, M., Singh, S., Jain, A., Yadav, S., Dubey, A., Trivedi, S.P. (2024). A review on heavy metal-induced toxicity in fishes: Bioaccumulation, antioxidant defense system, histopathological manifestations, and transcriptional profiling of genes.

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 83, 127377.

<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2023.127377>

Lee, H.J., Woo, Y., Hahn, T.W., Jung, Y.M., Jung, Y.J. (2020). Formation and maturation of the phagosome: A key mechanism in innate immunity against intracellular bacterial infection. *Microorganisms*, 8(9), 1298.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8091298>

Lieber, M. R. (1998). Pathological and physiological double-strand breaks. *The American Journal of Pathology*, 153(5), 1323–1332.

[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65716-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65716-1)

Liu, Y., Lu, H., Li, Y., Xu, H., Pan, Z., Dai, P., Yang, Q. (2021). A review of treatment technologies for produced water in offshore oil and gas fields. *Science of The Total Environment*, 775, 145485.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145485>

López-Barea, J. (1995). Biomarkers in ecotoxicology: An overview. In G. H. Degen, J. P. Seiler, P. Bentley (A c. Di), *Toxicology in Transition* (Vol. 17, pp. 57–79). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-](https://doi.org/10.1007/978-3-642-79451-3_6)

[3-642-79451-3_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-79451-3_6)

- Lowe, D.M., Pipe, R.K. (1994). Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: An in vitro study. *Aquatic Toxicology*, 30(4), 357–365. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00045-X](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00045-X)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1–2), 83–95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00010-X)
- McCarty, L.S., Power, M. Munkittrick, K.R. (2002) ‘Bioindicators Versus Biomarkers in Ecological Risk Assessment’, *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 8(1), pp. 159–164. doi: 10.1080/20028091056791.
- Mendonça, J.D.S., Guimarães, R.D.C.A., Zorretto-Pinheiro, V.A., Fernandes, C.D.P., Marcelino, G., Bogo, D., Nascimento, V.A.D. (2022). Natural antioxidant evaluation: A review of detection methods. *Molecules*, 27(11), 3563. <https://doi.org/10.3390/molecules27113563>
- Moore, M.N. (1982). Lysosomes and environmental stress. *Marine Pollution Bulletin*, 13(2), 42–43. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(82\)90438-6](https://doi.org/10.1016/0025-326X(82)90438-6)

Moore, M.N. (1988). Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Marine Ecology Progress Series*, 46, 81–89. <https://doi.org/10.3354/meps046081>

Moore, M.N., Icarus Allen, J., McVeigh, A. (2006). Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Marine Environmental Research*, 61(3), 278–304. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2005.10.005>

Navrot, N., Skjoldager, N., Bunkenborg, J., Svensson, B., Hägglund, P. (2015). A redox-dependent dimerization switch regulates activity and tolerance for reactive oxygen species of barley seed glutathione peroxidase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 90, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.03.003>

Piva F., Ciaprini F., Onorati F., Benedetti M., Fattorini D., Ausili A., Regoli F. 2011. Assessing sediment hazard through a Weight Of Evidence approach with bioindicator organisms: a practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere* 83: 475-485. [https://doi-org.ezproxy.cad.univpm.it/10.1016/0145-305x\(92\)90012-2](https://doi-org.ezproxy.cad.univpm.it/10.1016/0145-305x(92)90012-2)

Regoli, F. (1992). Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Marine Ecology Progress Series*, 84, 63–69. <https://doi.org/10.3354/meps084063>

Regoli, F. (2000). Total oxyradical scavenging capacity (Tosc) in polluted and translocated mussels: A predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 50(4), 351–361. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00091-6)

Regoli, F., & Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*, 93, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006>

Regoli, F., Benedetti, M., Di Carlo, M., d’Errico, G., Fattorini, D., Morroni, L., Nardi, A. (2017). Monitoraggio ambientale dell'area marina di campo ROSPO MARE in prossimità delle piattaforme RSM-A, RSM-B, RSM-C: Indagini del luglio e dicembre 2016.

Regoli, F., d’Errico, G., Nardi, A., Mezzelani, M., Fattorini, D., Benedetti, M., Gorbi, S. (2019). Application of a weight of evidence approach for monitoring complex environmental scenarios: The case-study of off-shore platforms. *Frontiers in Marine Science*, 6, 377. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00377>

Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A.N., Sarker, S. (2006). Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, 15(4), 333–340. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0069-1>

Sharma, M., Kant, R., Sharma, A.K., Sharma, A.K. (2025). Exploring the impact of heavy metals toxicity in the aquatic ecosystem. *Inter. Journal of Energy and Water Resources*, 9(1), 267–280. <https://doi.org/10.1007/s42108-024-00284-1>

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: Implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360(1), 1–16. <https://doi.org/10.1042/bj3600001>

Shugart, L.R., Theodorakis, C. (1996) ‘Genetic ecotoxicology: the genotypic diversity approach’, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. Elsevier, 113(2), pp. 273–276.

Szynkowska, M.I., Pawlaczyk, A. (2014). Environmental toxicology. In *Encyclopedia of Toxicology* (pp. 415–418). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01013-7>

Terman, A., & Brunk, U. T. (2004). Lipofuscin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(8), 1400–1404. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.08.009>

Trabucco, B., Maggi, C., Manfra, L., Nonnis, O., Di, R., Mannozi, M., Gabellini, M. (2012). Monitoring of impacts of offshore platforms in the adriatic sea (Italy). In H. Al-Megren (A c. Di), *Advances in Natural Gas Technology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/38249>

Turkish, A. R., & Sturley, S. L. (2009). The genetics of neutral lipid biosynthesis: An evolutionary perspective. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(1), E19–E27. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90898.2008>

Uribe-Querol, E., Rosales, C. (2020). Phagocytosis: Our current understanding of a universal biological process. *Frontiers in Immunology*, 11, 1066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>

Venegas-Li, R., Levin, N., Morales-Barquero, L., Kaschner, K., Garilao, C., Kark, S. (2019). Global assessment of marine biodiversity potentially threatened by offshore hydrocarbon activities. *Global Change Biology*, 25(6), 2009–2020. <https://doi.org/10.1111/gcb.14616>

Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R. (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, 44(1), 69–84. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(96\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00103-1)
- Wang, W.X., Rainbow, P. S. (2010). Significance of metallothioneins in metal accumulation kinetics in marine animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.02.015>
- Wang, Y., Li, Y., Zang, X., Moussian, B., Shah, D., Pang, M., Liu, X. (2025). Lead (Pb) load interacts with oxidative stress in *Drosophila melanogaster* through MTF-1/Nrf2/JNK mediated metallothionein expression. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 292, 117921. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2025.117921>
- Wilce, M.C.J., Parker, M.W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1205(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)90086-8)
- Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A.J., Fong, J.H., Blanchard, K.A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity

of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(3), 480–493. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00277-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00277-3)

Yang, C., Wang, X. (2021). Lysosome biogenesis: Regulation and functions. *Journal of Cell Biology*, 220(6), e202102001. <https://doi.org/10.1083/jcb.202102001>

Yu, X., Tian, X., Wang, Y., Zhu, C. (2021). Metal-metal interaction and metal toxicity: A comparison between mammalian and *D. melanogaster*. *Xenobiotica*, 51(7), 842–851. <https://doi.org/10.1080/00498254.2021.1922781>

<https://oap.ospar.org/en/ospar-assessments/quality-status-reports/qsr-2023/other-assessments/impacts-offshore-oil-and-gas-industry/>

https://unmig.mase.gov.it/wp-content/uploads/2018/08/schede_ita.pdf;

<https://unmig.mase.gov.it/wp-content/uploads/2018/08/piattaforme.pdf>