



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale
Biologia Marina

**RISPOSTE BIOLOGICHE DI MITILI ESPOSTI A
MICROPLASTICHE DI FORMA E TAGLIA DIFFERENTE**

**BIOLOGICAL RESPONSES IN MUSSELS EXPOSED TO
MICROPLASTICS OF DIFFERENT SHAPE AND SIZE**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Federica Mongera

Relatore:
Prof.ssa Stefania Gorbi

Correlatori:
Dr. Alessandro Nardi

Dr. Lucia Pittura

Sessione Febbraio 2022
Anno Accademico 2020 - 2021

INDICE

Capitolo 1: INTRODUZIONE

<i>1.1 Microplastiche e microfibre: contaminanti emergenti in ambiente marino</i>	1
<i>1.2 Interazioni tra MPs, MFs e organismi marini: ingestione, bioaccumulo ed effetti</i>	8
<i>1.3 Approccio ecotossicologico per la valutazione degli effetti di MPs e MFs negli organismi marini</i>	16

Capitolo 2: SCOPO DELLA TESI25

Capitolo 3: MATERIALI E METODI

<i>3.2 Esposizione di M. galloprovincialis a microfibre (MFs)</i>	
3.1.1 Piano sperimentale.....	27
3.1.2 Prelievo dei tessuti.....	31
<i>3.2 Esposizione di M. galloprovincialis a microplastiche (MPs)</i>	
3.2.1 Piano sperimentale.....	35
<i>3.3 Analisi biologiche</i>	35
<i>3.4 Analisi statistica</i>	44

Capitolo 4: RISULTATI

<i>4.1 Risposte biologiche in M. galloprovincialis esposto a microfibre</i>	
4.1.1 Parametri immunitari.....	46
4.1.2 Attività enzimatica acil-CoA ossidasi e acetilcolinesterasi.....	49
4.1.3 Difese antiossidanti.....	51
4.1.4 Accumulo di lipofuscina e lipidi neutri.....	53

4.1.5 Analisi delle componenti principali.....	55
<i>4.2 Risposte biologiche in M. galloprovincialis esposto a microplastiche</i>	
4.2.1 Parametri immunitari.....	58
4.2.2 Attività enzimatica dell'acetilcolinesterasi.....	60
4.2.3 Analisi delle componenti principali.....	61

Capitolo 5: DISCUSSIONE

<i>5.1 Effetti dell'esposizione a microfibre di diversa natura.....</i>	<i>62</i>
<i>5.2 Capacità di recupero e Suscettibilità ad uno stress aggiuntivo.....</i>	<i>67</i>
<i>5.3 Effetto taglia-dipendente di frammenti di PE.....</i>	<i>73</i>

Ringraziamenti

Bibliografia

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 Microplastiche e microfibre: contaminanti emergenti in ambiente marino

L'inquinamento da microplastiche (MPs), cioè particelle solide di origine sintetica, eterogenee in forma, colore, composizione polimerica e di dimensioni comprese tra 1 µm e 5 mm (Frias e Nash, 2019, Bessa *et al.*, 2019; UNEP 2021) rappresenta una delle questioni ambientali attualmente più rilevanti (UNEP, 2021). Le microplastiche sono infatti ubiquitarie in tutti i bacini oceanici, si ritrovano distribuite lungo l'intera colonna d'acqua e accumulate nei sedimenti. Questa loro persistenza, insieme alle piccole dimensioni, le rendono disponibili per un ampio spettro di specie marine, infatti, l'ingestione e l'accumulo nei tessuti è stata dimostrata sia da studi in campo che in laboratorio (Egbeocha *et al.*, 2018). Numerosi studi hanno evidenziato diversi effetti delle MPs per gli organismi, suggerendo possibili impatti per il funzionamento degli ecosistemi; tuttavia, i meccanismi attraverso cui possono causare tossicità e il reale rischio ambientale associato non sono ancora del tutto compresi (Anbumani *et al.*, 2018; Verla *et al.*, 2020).

Si prevede, che la contaminazione da microplastica aumenterà nelle prossime decadi in vista del rapido incremento della produzione annua globale di plastica primaria che è passata da sole 2 milioni di tonnellate nel 1950 a 381 milioni di

tonnellate nel 2015 e che raggiungerebbe 1,1 miliardi di tonnellate nel 2050 (Geyer *et al.*, 2017). Infatti, in riferimento alla loro origine, le particelle di plastica di dimensioni microscopiche possono essere già prodotte come tali per svariati utilizzi (*microplastiche primarie*, Fig.1) ed essere immesse in ambiente a causa del loro smaltimento scorretto: alcuni esempi sono le MPs contenute nei prodotti cosmetici e per l'igiene quotidiana, nei detersivi o nei farmaci (Atugoda *et al.*, 2021). D'altra parte, materiali plastici persi o immessi in ambiente possono frammentarsi in particelle più piccole per effetto di processi fisici (es. moto ondoso, abrasione), chimici (fotodegradazione, idrolisi) e biologici (biodegradazione), dando origine alle *microplastiche secondarie* (Fig.1) (Malankowska *et al.*, 2021). Occorre considerare che oltre alle materie plastiche maggiormente prodotte, utilizzate e ritrovate in ambiente, come il polietilene a bassa ed alta densità (LDPE e HDPE, rispettivamente), il polipropilene (PP), il polistirene (PS), il polietilene tereftalato (PET) e il polivinilcloruro (PVC), vengono continuamente prodotte nuove tipologie di materie plastiche costituite da miscele di diversi polimeri e vari additivi, questi ultimi aggiunti per migliorare o conferire specifiche proprietà al materiale (UNEP, 2021; PlasticsEurope, 2018): entrano così in ambiente marino nuove tipologie di MPs con conseguenze ancora del tutto sconosciute.

Le MPs vengono originate anche a seguito dei processi di abrasione di pneumatici o durante il lavaggio dei capi sintetici, sotto forma di microfibre (MFs), che possono essere quindi di origine sintetica ma derivare anche da tessuti di origine naturale (Tab.1), come il cotone. Sono proprio le microfibre naturali ad essere rilevate maggiormente in ambiente acquatico sebbene si sappia ancora poco sui loro effetti biologici: analizzando campioni di acqua prelevati da principali bacini oceanici, Suaria *et al.* (2020) hanno riscontrato che rispetto al contenuto totale di MFs solo l'8% sono sintetiche mentre il restante 92 % è di origine naturale (il 12% di origine animale e il 79% di cellulosa). Per la diversa origine, abbondanza in mare e quantità di informazioni relative alla loro tossicità sarebbe più corretto considerare come due categorie distinte di contaminanti ambientali le microplastiche e le microfibre, includendo in queste ultime sia le sintetiche che le naturali: attualmente invece si tende a considerare la *fibra* sintetica come una categoria per la classificazione delle microplastiche in base alla forma, insieme a *pellet* o *microbead* (particelle sferiche in cui ogni punto della superficie ha la stessa distanza dal centro), *frammenti* (particelle rigide, di forma e bordi irregolari), *film* (sottili, flessibili e di forma irregolare), *filamenti o linee* (forma allungata, prive di estremità sfilacciate, il diametro è regolare mentre spessore e lunghezza sono variabili).

Tale considerazione si basa sulla recente definizione di Liu *et al.* (2019), che definisce la microfibra come qualsiasi materiale fibroso, naturale o artificiale, di struttura filiforme con un diametro inferiore a 50 μm , una lunghezza compresa tra 1 μm e 5 mm e un rapporto lunghezza/diametro maggiore di 100. Come brevemente anticipato, le MFs vengono rilasciate o disperse nell'ambiente da tutti i tipi di materiali fibrosi, come vestiti, tessuti agricoli, industriali, prodotti per la casa e alcuni prodotti tessili, semilavorati o accessori utilizzati in altri campi, durante la produzione, l'uso e lo smaltimento a fine vita (Liu *et al.*, 2019).

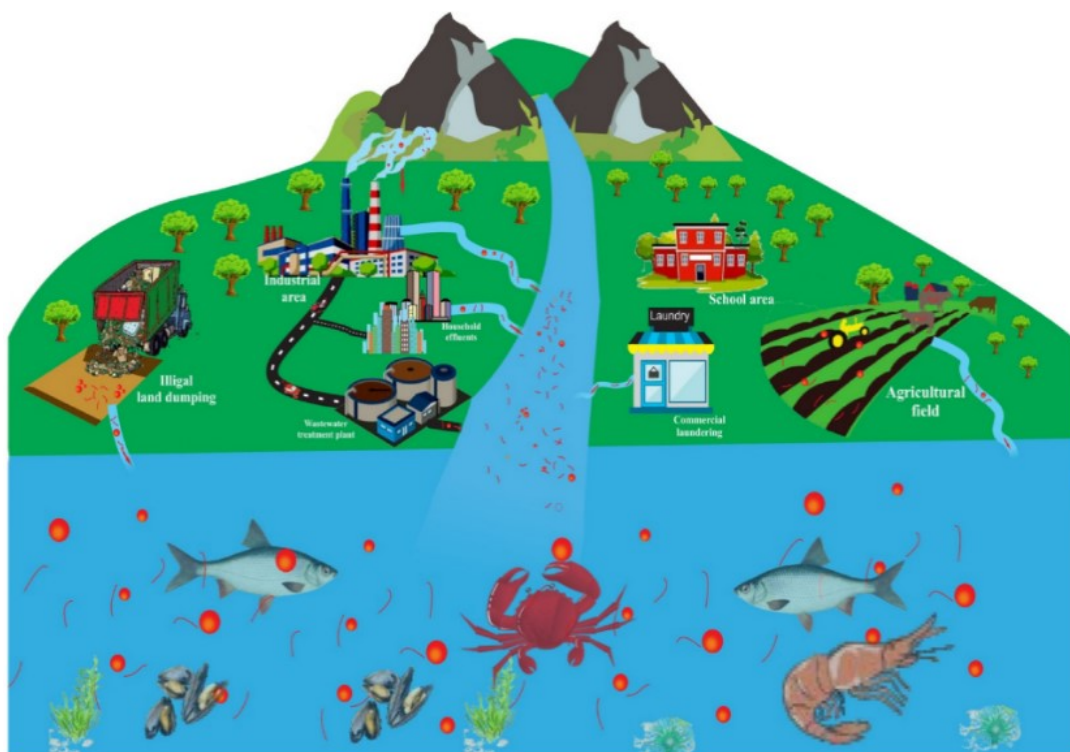


Figura 1 - Fonti, pathway e destino delle microfibre (MFs – filamenti rossi) e delle microplastiche (MPs – le sfere in rosso). Da Singh et al., 2020.

Le acque di scarico domestico ed industriale sono le principali responsabili del rilascio diretto di microfibre primarie (35%) insieme agli impianti di trattamento dei reflui, attraverso rottura, sfregamento e attrito dei tessuti durante il lavaggio (Liu *et al.*, 2019). Sebbene il tasso di rimozione dalle acque di scarico sia superiore al 95%, la concentrazione si aggira intorno a 10^4 fibre in 1 m^3 di acque trattate (Prata *et al.*, 2018). Anche l'abrasione e la frammentazione di oggetti plastici (reti da pesca, bottiglie di plastica, pellet ecc.) può causare il rilascio di microfibre, così come la degradazione di prodotti cosmetici e per la cura della persona (Singh *et al.*, 2020).

<p>FIBRE NATURALI</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Animali proteiche (cotone, lana, pelli, seta...) •Vegetali cellulosiche (cotone, lino, canapa, iuta, cocco, rafia...) •minerali inorganici (filamenti metallici e metallizzati, vetro tessile)
<p>FIBRE CHIMICHE O TECNOFIBRE</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Artificiali cellulosiche (rayon, cellulosa del legno come triacetatoe proteiche) •Sintetiche (poliaamidiche come il nylon, poliesteri, poliviniliche, poliacriliche e polieuretaniche).

Tabella 1 – Classificazione delle microfibre in base all'origine.

Sia le MPs che le MFs sono state ritrovate in tutti i mari e gli oceani del mondo, dalle aree costiere che risultano essere le più impattate a causa dell'urbanizzazione e dell'industrializzazione, fino alle aree oceaniche più remote, nel ghiaccio polare, nei sedimenti marini e lungo le spiagge, nelle acque

superficiali e costiere ma anche in pieno oceano, fino alle maggiori profondità abissali (Ryan, 2015). Pur essendo ubiquitarie, l'abbondanza è molto variabile: se in alcune aree mediamente sono state stimate 3 particelle/m³ in colonna d'acqua (Isole Svalbard, Doyle *et al.*, 2011) e 8 particelle/Kg di sedimento (Canale della Manica, Thompson *et al.*, 2004), in altre le concentrazioni raggiungono le 102.000 particelle/m³ in colonna d'acqua (Mare del Nord, Noren e Naustvoll, 2011) e 621.000 particelle/Kg di sedimento prelevato dalle Isole Frisone (Liebezeit *et al.*, 2012). Anche le MFs sono state rinvenute in tutti i comparti marini: ogni anno circa 2 milioni di tonnellate di microfibre vengono rilasciate negli oceani (Boucher e Friot, 2017), raggiungendo concentrazioni dell'ordine di ~10⁸ fibre km² nelle acque marine superficiali (Suaria *et al.*, 2020) e variabili da 2,6×10³ a 3,70×10⁴ m³ (Pedrotti *et al.*, 2021). Alcuni studi condotti in Mediterraneo hanno rivelato che le fibre analizzate rappresentavano il 2,3% delle microplastiche totali nei primi metri di colonna d'acqua (Cozar *et al.*, 2014), ma il valore raggiungeva il 19% nel Mare Adriatico (Suaria *et al.*, 2015); mentre nei sedimenti, le fibre oscillavano tra 10 e 15 MFs in 50 ml di sedimento (Woodall *et al.*, 2014). Negli ambienti acquatici, i trend di distribuzione e accumulo di microplastiche (sia spaziali che temporali) sono piuttosto eterogenei perché influenzati sia dalle caratteristiche delle particelle, come dimensioni, forme, densità, composizione polimerica e

chimica, sia da fattori ambientali tra cui vento, temperatura, velocità della corrente dell'acqua (Gola *et al.*, 2021).

La composizione polimerica delle microplastiche ne determina la densità e quindi la distribuzione in colonna d'acqua, ad esempio particelle di polietilene a bassa densità specifica sono positivamente galleggianti e quindi tendono a rimanere in colonna d'acqua o in prossimità della superficie del mare dove possono essere potenzialmente trasportate su lunghe distanze (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012). Tuttavia, cambiamenti nella forma e nelle dimensioni delle MPs e MFs dovuti alla degradazione, al weathering o alla presenza di additivi (Reisser *et al.*, 2015) possono causare variazioni della densità che vanno a modificare la loro presenza e persistenza in colonna d'acqua e a determinare il loro destino finale, dall'accumulo nei sedimenti all'ingestione da parte degli organismi. Inoltre, come dettagliato più avanti, la tipologia di polimero e la presenza di additivi determinano la reattività chimica delle MPs e delle MFs, e quindi determinano la possibilità di interagire con altri contaminanti chimici presenti in ambiente.

Le condizioni oceanografiche come le correnti marine, il moto ondoso o il vento possono disperdere le microparticelle anche su lunghe distanze; al contrario i grandi gyres oceanici e la convergenza delle correnti possono concentrare le MPs e le MFs in specifiche zone che rappresentano delle aree di

accumulo (Coyle *et al.*, 2020). Per quanto riguarda la distribuzione verticale della plastica lungo la colonna d'acqua, questa può essere influenzata dalle turbolenze indotte dal vento, e la presenza o meno di biofouling può aumentare o diminuire la galleggiabilità delle particelle (Cole *et al.*, 2016).

In questo contesto, è di fondamentale importanza studiare come le caratteristiche, le fonti, la distribuzione, l'abbondanza delle microplastiche e delle microfibre contribuiscano agli impatti ecologici, e allo stesso tempo è necessario sviluppare nuove linee guida, approcci analitici e standard di riferimento per il monitoraggio delle stesse in ambiente marino (van Bavel *et al.*, 2020).

1.2 Interazioni tra MPs, MFs e organismi marini: ingestione, bioaccumulo ed effetti.

La presenza costante ed ubiquitaria delle MPs e delle MFs in ambiente marino aumenta la probabilità che gli organismi entrino in contatto con esse. Le piccole dimensioni, la morfologia e la galleggiabilità variabile rendono le MPs e le MFs facilmente disponibili all'ingestione (Fig. 2) da parte di numerose specie marine di livelli trofici diversi e con strategie alimentari differenti (Hermabessiere *et al.*, 2017). L'ingestione può anche avvenire indirettamente cibandosi di prede a loro volta contaminate da MPs e MFs. Anche la

respirazione e la filtrazione sono vie attraverso cui gli organismi possono assimilare questi contaminanti con una probabilità tanto più alta quanto più piccole sono le dimensioni della particella o della fibra. Molte specie possono confondere le MPs e le MFs per le loro prede naturali, soprattutto se incapaci di discriminare la fonte di cibo come nel caso di filtratori o sospensivori: alcune specie di copepodi (*Acantia* spp.) e larve di ricci di mare (*Paracentrotus lividus*) tendono ad ingerire preferibilmente solo con MPs con una taglia ben precisa perché molto simili per dimensioni alle loro prede naturali (Cole et al., 2013; Kaposi et al., 2014), così come spesso accade per molti altri organismi che selezionano la preda in funzione delle dimensioni.

Nondimeno, alcuni studi hanno dimostrato come anche il colore possa influire sul potenziale tasso di ingestione da parte di alcuni organismi (Frias *et al.*, 2019).

Attraverso un esperimento De Sà *et al.* (2015) hanno dimostrato come giovanili di ghiozzo baltico (*Pomatoschistus microps*) esposti simultaneamente a frammenti di PE di dimensioni simili ma colore diverso (bianco, nero e rosso) ingerissero preferibilmente le particelle bianche perché molto simili ai nauplii di *Artemia* spp., le prede di cui naturalmente si cibano. Quando i pesci erano esposti contemporaneamente a particelle di PE e nauplii, gli organismi ingerivano comunque le MPs, seppur con minor frequenza, scambiandole per

le loro prede. Boerger *et al.* (2010) hanno dimostrato come nel *North Pacific Central Gyre* la maggior parte delle MPs sia di colore bianco o blu; questi colori sono molto simili a quelli degli organismi planctonici, che rappresentano la fonte primaria di cibo per la maggior parte dei pesci mesopelagici (*Myctophidae*). Questa somiglianza può spiegare la propensione all'ingestione di MPs da parte dei pesci, soprattutto considerando che si tratta di predatori notturni per i quali la vista rappresenta un senso fondamentale per procacciarsi il cibo.

Un recente studio ha evidenziato che le MFs riescono a entrare facilmente nel sistema circolatorio di molti animali marini grazie alla forma e alle dimensioni, accumulandosi a livello cellulare attraverso due pathways: le fibre più piccole di 50 nm penetrano direttamente attraverso il doppio strato fosfolipidico essendo idrofobiche, mentre le fibre di dimensioni maggiori (> 50 nm) vengono internalizzate per endocitosi nei lisosomi (Zakari *et al.*, 2020).

Le microplastiche possono inoltre accumularsi sulla superficie corporea degli organismi a livello degli arti o delle appendici, causando effetti avversi durante la locomozione, l'alimentazione, la predazione, la difesa o persino durante la fase riproduttiva (Cole *et. al.*, 2013).

Indipendentemente dalla via di esposizione, gli impatti possono essere molteplici e riguardare diversi livelli dell'organizzazione biologica; a livello

fisiologico, gli effetti sono tipicamente lesioni al tratto gastro-intestinale e all'esofago, infiammazione dei tessuti (es. danneggiamento dei villi e scissione degli enterociti), alterazioni nell'attività di filtraggio e fagocitosi degli organismi (Lei *et al.*, 2018); ostruzione del tubo digerente e falsa sazietà riduzione del senso di fame e dell'intake energetico necessario (Setälä *et al.*, 2016). Tutto ciò ha conseguenze negative sulle principali funzioni vitali, fino a causare potenzialmente la morte degli organismi. Ad esempio, Blessing *et al.* (2013) hanno dimostrato come l'ingestione di MPs in organismi detritivori come *Arenicola marina* possa indurre perdita di peso dell'individuo, accompagnata da una riduzione di contenuto lipidico.

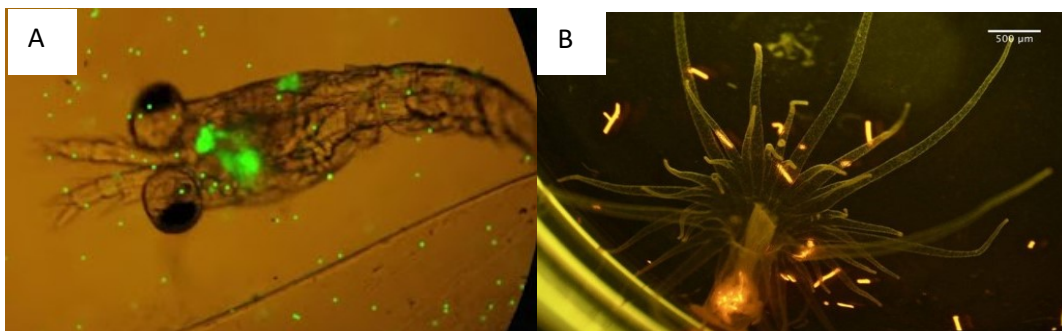


Figura 2 - Microplastica all'interno di un organismo zooplanctonico (A) e in polipi di attinia (B) al microscopio a fluorescenza (Cole *et al.*, 2013; De Ortè *et al.*, 2019).

Inoltre, la predazione può contribuire al trasferimento delle MPs lungo la rete trofica. Ad esempio, Setälä *et al.* (2014) hanno confermato che le microplastiche possono essere trasferite lungo la rete alimentare pelagica dallo zooplancton ai gamberi misidacei.

Inoltre, microplastiche e microfibre sono state rilevate in diverse specie di interesse commerciale come mitili (Cole *et al.*, 2015; Kolandhasamy *et al.*, 2018), ostriche (Leslie *et al.*, 2017) e pesci (Hipfner *et al.*, 2018), ponendo l'attenzione sull'eventualità di potenziali minacce per la salute umana.

Parallelamente ai danni fisici, MPs e MFs possono causare anche effetti chimici grazie alla capacità di veicolare all'interno degli organismi gli additivi utilizzati nella fase di produzione della plastica, ma anche contaminanti adsorbiti dall'ambiente, come ad esempio idrocarburi policiclici aromatici, policlorobifenili (PCBs), idrocarburi alifatici, metalli, bisfenolo A e altri composti perfluorurati (PFCs), residui farmaceutici, prodotti cosmetici e per la cura personale. In questo contesto, la capacità di rilascio, così come quella di adsorbimento, è strettamente correlata a diversi fattori come la composizione polimerica, il rapporto superficie/volume o superficie/lunghezza ma anche e soprattutto il tipo di contaminante, la sua idrofobicità, la concentrazione e il gradiente che esiste tra i due compartimenti considerati, influenzato da condizioni chimico-fisiche.

Un marcato accumulo di MPs e di pirene è stato registrato nell'emolinfa, nelle branchie e nei tessuti digestivi di *Mytilus galloprovincialis* dopo essere stato esposto in laboratorio a frammenti di polietilene e polistirene contaminanti da pirene in condizioni sperimentali. Tra gli altri effetti riscontrati vi sono

proliferazione perossisomiale, effetti neurotossici, alterazioni delle risposte immunologiche e del sistema antiossidante sono alcuni degli effetti connessi al bioaccumulo di pirene (Avio *et al.*, 2015).

In un altro studio, Barboza *et al.* (2018) hanno scoperto che le concentrazioni di mercurio nelle branchie e nei fegati di giovani di spigola (*Dicentrarchus labrax*) esposti ai mix di microplastiche e mercurio (Hg) erano fino a 2 volte più alte che nei pesci esposti al solo Hg alle stesse concentrazioni. Nel suo esperimento Batel *et al.* (2016) ha simulato una catena alimentare artificiale utilizzando naupli di artemia (*Artemia* sp.) e zebrafish (*Danio rerio*), osservando che le microplastiche potevano veicolare il benzo(a)pirene trasferendolo dai naupli di gamberi allo zebrafish. Ciò suggerisce che il pesce può essere esposto a contaminanti associati alla plastica attraverso il trasferimento lungo la catena trofica (Batel *et al.*, 2016).

Prata *et al.* (2018) hanno dimostrato che la compresenza di farmaci e microplastiche hanno effetti tossici sinergici più severi sulla microalga marina *Tetraselmis chuii* rispetto a quando gli stress sono considerati singolarmente.

Fonte *et al.* (2016) hanno confermato che l'aumento della temperatura in ambiente marino ha intensificato gli effetti negativi per i giovani di ghiozzo comuni (*Pomatoschistus microps*) causati dalla compresenza di MPs e cefalexina (antibiotico) rispetto alla presenza dei singoli contaminanti. Browne

et al. (2013) hanno scoperto che l'assorbimento di triclosan su particelle di PVC da parte di *Arenicola marina* aumentava il tasso di mortalità di oltre il 50% della popolazione. L'ingestione di contaminanti può anche causare cambiamenti comportamentali negli organismi. Chen *et al.* (2017) hanno riportato che il 17 α -etinilestradiolo adsorbito su particelle di polistirene causano cambiamenti locomotori nelle larve di pesce zebra (*Danio rerio*).

Nonostante i numerosi studi condotti in laboratorio, non è ancora chiaro in ambiente il reale contributo delle MPs (e MFs) nel trasferimento di contaminanti nei tessuti degli organismi (Carbery *et al.*, 2018), motivo per cui sono necessari ulteriori studi.

Analisi proteomiche hanno permesso di individuare l'espressione dei geni attivati a seguito dell'esposizione a MPs: in modo differenziale, le proteine espresse maggiormente sono associate al citoscheletro, ai principali processi biologici come il metabolismo energetico e dei lipidi insieme a tutte le reazioni associate, la via del pentoso fosfato, la via dell'apoptosi e tutte le molecole segnali od enzimi coinvolti nella risposta immunitaria e antiossidante. Alterazioni di questi pathways possono portare a ritardo della crescita e deformità dello sviluppo negli embrioni o larve (Moran, 2007), cambiamenti nel tasso di schiusa e nel tasso di malformazione delle larve dopo l'esposizione

oltre a compromettere i processi biologici chiave sopracitati (Sussarellu *et al.*, 2016; Détrée e Gallardo-Escarate, 2018; Shi *et al.*, 2020).

In ultimo, le microplastiche possono essere soggette a colonizzazione da parte di microrganismi (virus, batteri, microalghe), e quindi potenzialmente veicolare specie patogene, favorire lo scambio di geni tra taxa diversi (come la resistenza agli antibiotici o ai metalli) e promuovere l'evoluzione delle colonie microbiche (Caruso *et al.*, 2018; Laganà *et al.*, 2019; Caruso, 2019).

Tuttavia, in ambiente marino le MPs e le MFs rappresentano solo uno dei numerosi fattori di stress antropici, tra cui i cambiamenti fisico-chimici causati dalle continue immissioni di CO₂ antropica in atmosfera (aumento di temperatura, acidificazione degli oceani, intensificazione di eventi estremi (Provenza *et al.*, 2020; Bertucci *et al.* 2021; Reichert *et al.*, 2021).

Da ciò si evince che le MPs e le MFs rappresentano una minaccia per tutti gli organismi marini (planctonici e bentonici), indipendentemente dalla fase di sviluppo (larve, giovanili, adulti) e dalla posizione trofica. Le interazioni possono essere fisico-meccaniche, chimiche e biologiche, con effetti che si ripercuotono dal livello molecolare e cellulare fino a quello fisiologico. Sebbene nell'ultima decade la tematica abbia ricevuto una considerevole attenzione in ambito scientifico, occorre sviluppare studi approfonditi per definire i meccanismi di azione, l'insorgenza di effetti e il ruolo di questi

contaminanti emergenti nella suscettibilità ai numerosi fattori di stress presenti in ambiente marino, al fine migliorare la comprensione degli impatti e del rischio associato.

1.3 Approccio ecotossicologico per la valutazione degli effetti di MPs e MFs negli organismi marini

Vista la complessità che caratterizza il contesto ambientale, l'applicazione di un approccio ecotossicologico multi-biomarker su specie modello in studi controllati in laboratorio è fondamentale per comprendere i meccanismi biologici degli effetti delle microplastiche e poter elucidare le potenziali interazioni con altri fattori di stress, che possono interagire attraverso meccanismi sinergici, additivi o antagonisti (Crain *et al.*, 2008).

Tra le specie modello il mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*, Fig. 3) è una delle più utilizzate. Questo mollusco bivalve appartenente alla famiglia dei *Mytilidae* è un organismo sessile che vive sui substrati rocciosi, in grado di filtrare grandi volumi di acqua e conseguentemente di concentrare elevate quantità di contaminanti nei tessuti, anche grazie alla limitata capacità di metabolizzare alcuni xenobiotici. In condizioni normali, un mitilo di medie dimensioni filtra all'incirca da 4 a 5 L di acqua all'ora ed è in grado di trattenere il 90% delle particelle contenute in essa (Mengoli, 1998).

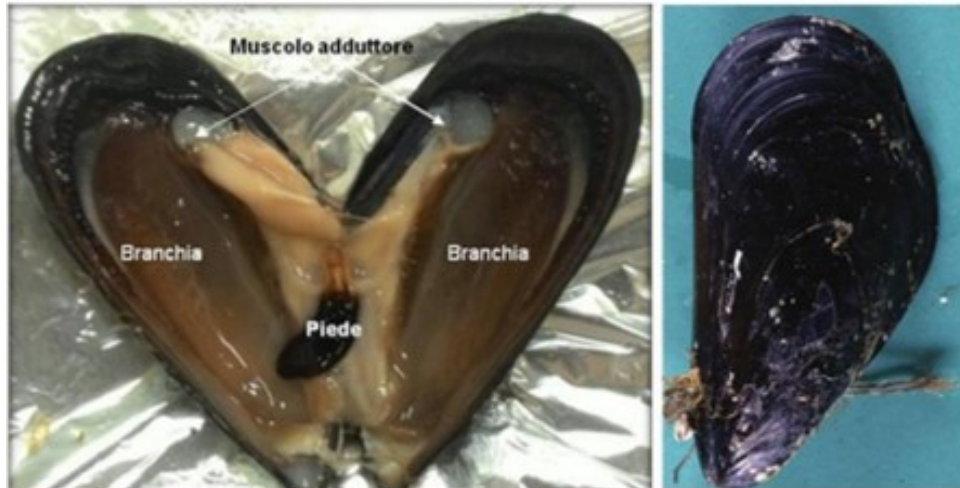


Figura 3 - *Mytilus galloprovincialis*.

Essendo una specie con una distribuzione geografica molto ampia, è resistente agli stress ambientali ma allo stesso tempo suscettibile, cioè in grado di fornire risposte sufficientemente rapide e ripetibili (Bargagli *et al.*, 1998). Infine, i mitili sono facilmente allevabili e rappresentano una delle specie target del mercato ittico, ricoprendo un ruolo economico ed ecologico chiave nel Mediterraneo. Per tale motivo questa specie è spesso impiegata per il monitoraggio delle aree costiere ma anche in studi eco-tossicologici di laboratorio, attraverso l'analisi di biomarker.

Il termine “biomarker” identifica tutte le risposte o variazioni molecolari, cellulari o fisiologiche che possono essere misurate in un tessuto, in un organismo o in una popolazione, in grado di fornire l'evidenza di un disturbo causato da una o più condizioni di stress.

Queste risposte possono fornire informazioni sia qualitative che semiquantitative, con un valore diagnostico (intensità dello stress) e prognostico (potenziali effetti a lungo termine). Ovviamente lo stesso contaminante può agire a vari livelli di organizzazione biologica: dal livello molecolare (ad esempio, espressione di alcuni geni), biochimico (attività enzimatiche e macromolecole) e successivamente gli effetti si possono riscontrare, con un meccanismo a cascata, a livello di cellula (ad esempio, alterazioni al DNA), tessuto, organismo, fino a giungere a livello di popolazione (McCarthy e Shugart, 1990; Depledge e Fossi, 1994).

Numerose risposte biologiche possono essere considerate biomarker, in funzione dell'ipotesi sperimentale. In tal senso, l'analisi multi-biomarker (immunitari, neurotossicità, stress ossidativo, ecc.) è funzionale a capire non solo gli effetti a livello dei singoli target ma anche come i vari processi, molecole e fattori di regolazione interagiscono reciprocamente, attraverso meccanismi additivi, sinergici o antagonisti, modulando le risposte a uno o più stress a livello dell'intero organismo. Inoltre, le risposte degli organismi possono essere asincrone, differenti e specie-specifiche, in quanto dipendono dalla condizione fisiologica e dalle caratteristiche biologiche dell'organismo stesso, dalla tipologia di stress e dalle condizioni dell'esposizione (Webb *et al.*, 2020; Regoli e Giuliani, 2014).

Nel caso di contaminanti come le MPs e le MFs, sono spesso impiegati biomarker fisiologici per valutare gli effetti su vertebrati, come il tasso di filtrazione (*Clearance Index*) e l'indice di condizione (*Condition Index*) per valutare come varia l'efficienza fisiologica dell'intero organismo in risposta all'esposizione a MPs (Teng *et al.*, 2021). Ad esempio, recenti studi hanno osservato una diminuzione della frequenza respiratoria già a basse concentrazioni di MPs e una conseguente depressione metabolica come strategia per contrastare passivamente lo stress indotto dalle MP in *Mytilus* e *Ostrea* spp. (Teng *et al.*, 2021).

D'altra parte, molti contaminanti ambientali, incluse le MPs, possono influenzare negativamente lo stato ossidativo degli organismi, sia direttamente causando un aumento di livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS), sia indirettamente causando un malfunzionamento delle difese antiossidanti (Regoli e Giuliani, 2014).

L'efficienza del sistema antiossidante può essere valutata sia in termini delle singole risposte, come l'attività degli enzimi *superossido-dismutasi* (SOD), *catalasi* (CAT), *glutathione perossidasi* (GPx) o contenuto totale di glutathione (TGSH), sia come capacità antiossidante totale di un tessuto di contrastare specifici radicali (*Total Oxidant Scavenging Capacity Assay* – TOSCA) (Winston e Regoli, 1998).

Ad esempio, è stato osservato un aumento dell'attività dell'enzima SOD nella ghiandola digestiva delle ostriche (*Crassostrea gigas*) esposte a particelle di PE e PET, suggerendo un'aumentata necessità di trasformare il radicale in eccesso ($O_2\bullet^-$) nel meno tossico perossido di idrogeno (H_2O_2) per prevenire l'insorgenza di danni cellulari (Revel *et al.*, 2019); al contrario in *Mytilus coruscus* è stata osservata una riduzione o inibizione dell'attività di questo enzima (Li *et al.*, 2020). Anche la CAT gioca un ruolo importante nella difesa contro lo stress ossidativo, attraverso la rimozione di H_2O_2 che è il principale precursore dei radicali idrossilici. Diversi organismi marini hanno mostrato un aumento compensativo dell'attività di questo enzima per fronteggiare l'elevato stress ossidativo, seguito però da inibizione durante esposizioni acute o prolungate (Regoli *et al.*, 2011; Paul-Pont *et al.*, 2016).

Inoltre, una volta all'interno del corpo dell'organismo non è detto che il contaminante rimanga tal quale: alcune classi di contaminanti possono andare incontro a biotrasformazione, cioè l'insieme di processi metabolici che trasformano composti xenobiotici (tra i più noti i farmaci, ma anche composti organici) in composti più polari ed idrosolubili per facilitarne l'escrezione. Non è però detto che gli intermedi che si originano da tali processi siano meno dannosi della forma originale, al contrario in alcuni casi possono risultare più tossici rispetto alla forma di partenza (Almeida *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2021).

Tra gli enzimi coinvolti, le *glutathione-S-transferasi* (GST) sono implicate nella fase II di questi processi, responsabili della coniugazione della forma ridotta del glutathione (GSH) e quindi correlate al bilancio ossidativo. Una diminuzione di attività, una disfunzionalità o totale inattivazione della GST nelle branchie e nella ghiandola digestiva è stata riscontrata in *M. galloprovincialis* e *M. edulis* esposti contemporaneamente a microbeads di polistirene e fluorantene, per 7 giorni in condizioni di laboratorio rispetto agli organismi esposti ai singoli stress (Paul-Pont *et al.*, 2016).

Quando la pressione ossidativa non viene adeguatamente bilanciata, si possono verificare danni ossidativi a carico di alcune macromolecole, come i lipidi, le proteine e il DNA. In questo senso, l'accumulo di lipofuscina e il danno genotossico, quali rotture o malformazioni della doppia elica di DNA (ad esempio la frequenza dei micronuclei), rappresentano dei biomarker ideali per valutare la tossicità indotta dai contaminanti sia a livello immunitario che molecolare (Frenzilli *et al.*, 2009). Le lipofuscine sono pigmenti di derivazione lipidica presenti all'interno dei lisosomi, che si originano dall'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi e che si accumulano sottoforma di granuli di colore scuro all'interno della cellula perché tali composti non sono degradabili dalle idrolasi lisosomiali né eliminabili per esocitosi. La presenza di lipofuscine può essere correlata ad una alterazione dello stato redox cellulare, messo in

evidenza con opportune analisi citochimiche quantitative che permettono di stimare il livello di alterazione dell'attività lisosomiale; un accumulo eccessivo di questo prodotto può portare alla morte della cellula e quindi causare seri danni al tessuto coinvolto.

Diversi studi hanno accertato come in vari organismi marini sottoposti a stress (esposizione a microplastiche, farmaci ma anche variazioni improvvise della temperatura o del pH) l'eccessiva quantità di lipofuscina presente all'interno delle cellule sia spesso associato ad alterazioni del sistema immunitario (Koheler *et al.* 2008; Mezzelani *et al.*, 2016; Gomiero *et al.*, 2018; Nardi *et al.*, 2021). Oltre a ciò, anche rotture o malformazioni della doppia elica così come errori durante i processi di duplicazione del DNA possono essere indagati per valutare la (geno)tossicità dei contaminanti; tra i biomarker la frequenza dei micronuclei è uno dei più utilizzati: l'esposizione ad agenti mutageni o genotossici induce errori durante il processo mitotico, si tratta per lo più di frammenti di DNA sparsi nel citoplasma e che dunque non sono stati incorporati correttamente nel nucleo principale durante le ultime fasi della divisione cellulare. Tali frammenti sono detti micronuclei perché sono piccoli nuclei accessori, morfologicamente identici a quelli normali, ma di dimensioni notevolmente ridotte. Rilevando e quantificando la presenza di micronuclei è possibile valutare la genotossicità dei contaminanti; infatti, anche in questo

caso l'elevata frequenza di micronuclei è spesso associata a danni a livello del DNA indotti dall'esposizione a diverse classi di contaminanti, come confermato da diversi studi condotti su diversi organismi marini (Avio *et al.*, 2015; Lacaze *et al.*, 2015; Pavlaki *et al.*, 2016; Mezzelani *et al.*, 2018; Pittura *et al.*, 2018).

Tra gli effetti cellulari dell'esposizione a contaminanti, si riscontra spesso un'alterazione del metabolismo dei lipidi nei bivalvi (Laudicella *et al.*, 2020), in particolare l'accumulo di lipidi neutri insaturi all'interno dei lisosomi è in genere correlata ad una alterazione dello stato redox cellulare (Mezzelani *et al.*, 2021; Giuliani *et al.*, 2019). L' AcylCoA ossidasi è invece un enzima coinvolto nella β -ossidazione degli acidi grassi, di conseguenza analizzando la sua attività enzimatica è possibile valutare variazioni nel metabolismo lipidico in risposta alla presenza di contaminanti, come ad esempio i farmaci (Mezzelani *et al.*, 2016).

Infine, nei bivalvi le branchie e la ghiandola digestiva sono gli organi più esposti all'azione di contaminanti ambientali sia perché questi organismi sono filtratori, dunque qualsiasi particella estranea o inquinante può essere trattenuta a livello del tessuto causando danni meccanici e/o chimici, sia perché la ghiandola digestiva partecipa ai meccanismi di difesa immunitaria, così come ai processi di disintossicazione e eliminazione degli xenobiotici (Moore e

Allen, 2002). Oltre a questi organi, anche gli emociti svolgono un ruolo fondamentale in quanto rappresentano la popolazione cellulare più esposta all'ambiente esterno, essendo le cellule responsabili della risposta immunitaria dell'organismo alle sostanze xenobiotiche. L'utilizzo di queste risposte immunitarie come biomarker, così come l'analisi dell'attività di alcuni enzimi a livello di ghiandola digestiva o branchie, può fornirci delle informazioni dello stato di salute dell'organismo. La valutazione della composizione della popolazione emocitaria, il tasso di fagocitosi e la stabilità delle membrane lisosomiali oppure l'analisi di risposte citotossiche negli emociti, sono tutti parametri utili per la definizione di alterazioni del sistema immunitario causato dall'esposizione a contaminanti (Boisseaux *et al.*, 2017).

Capitolo 2

SCOPO DELLA TESI

L'inquinamento da microplastiche e microfibre negli oceani è diventata una problematica ambientale di portata globale, ed in un contesto di stress multipli questi contaminanti emergenti possono negativamente impattare gli organismi marini sia in maniera diretta che indiretta, alterando la suscettibilità verso altri stress. In questo contesto, il presente lavoro di tesi ha avuto i seguenti obiettivi:

1. determinare gli effetti biologici delle microfibre, evidenziando eventuali differenze tra microfibre sintetiche (poliestere e poliammide) e naturali (cotone), e valutare se queste possono influenzare la suscettibilità degli organismi ad un secondo stress;
2. comprendere se la classe dimensionale delle microplastiche ha un ruolo sui possibili effetti eco-tossicologici, al fine di determinare una relazione taglia-tossicità;

Per rispondere a questi obiettivi sono stati allestiti due piani sperimentali, utilizzando il mitilo mediterraneo *Mytilus galloprovincialis* come specie modello, nel quale sono state valutate risposte biochimiche e cellulari, quali parametri immunitari (analisi delle popolazioni emocitarie in termini di rapporto granulociti - ialinociti, tasso di fagocitosi, stabilità delle membrane lisosomiali), effetti genotossici (frequenza dei micronuclei) e neurotossici

(valutazione dell'attività catalitica dell'acetilcolinesterasi), difese antiossidanti e insorgenza di stress ossidativo (molecole antiossidanti, capacità antiossidante totale e contenuto di lipofuscina) e variazioni del metabolismo lipidico (attività dell' Acil-CoA ossidasi e contenuto di lipidi neutri).

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

3.1 Esposizione di *M. galloprovincialis* a microfibre (MFs)

3.1.1 Piano sperimentale

L'esperimento ha avuto i seguenti obiettivi: (1) capire se microfibre (MFs) di varia natura possano indurre alterazioni del sistema immunitario e delle difese antiossidanti, causando stress ossidativo ed effetti neurotossici in *M. galloprovincialis*, (2) capire se polimeri sintetici e naturali possano provocare risposte biologiche differenti e (3) capire se l'esposizione a MFs possa influenzare la suscettibilità degli organismi ad altri stress (*multiple stressors*), come ad esempio eventi acuti di aumento di temperatura.

A tale scopo, sono state utilizzate MFs di poliestere, poliammide e cotone ottenute dal laboratorio IPCB-CNR di Pozzuoli, così preparate: tessuti standard, privi di ogni colorazione, trattamento o lavorazione superficiale, sono stati sminuzzati con un mulino a rotore *Retsch mill* dotato di un setaccio con maglia di 500 μm . Per ciascuna tipologia di MF sono state poi misurate le dimensioni (diametro e lunghezza), analizzando un pool di 100 microfibre di ogni tipologia al microscopio ottico. Le dimensioni medie delle MF utilizzate nell'esperimento sono riportate di seguito.

- MF di poliestere, PEST-MFs: lunghezza $618 \pm 367 \mu\text{m}$, diametro $13 \pm 1 \mu\text{m}$.

- MF di poliammide, PA-MFs: lunghezza $566 \pm 500 \mu\text{m}$, diametro $11 \pm 1 \mu\text{m}$
- MF di cotone, CO-MFs: lunghezza $412 \pm 342 \mu\text{m}$, diametro $16 \pm 4 \mu\text{m}$.

Nella fase preparatoria sono state isolate MFs di ciascuna topologia dagli stock forniti dall'IPCB-CNR attraverso un sorting visivo allo stereomicroscopio (GZ 808 Optech): le MFs sono state distribuite su fogli di alluminio e le confezioni sono state mantenute chiuse fino alle operazioni di dosaggio. Per prevenire e controllare la contaminazione esterna, lo smistamento visivo delle MFs è stato effettuato in una stanza con porte e finestre chiuse, ed è stato vietato l'accesso durante l'operazione. Prima e dopo le operazioni, i banchi di lavoro e le attrezzature sono stati puliti con etanolo di grado puro, pinzette e fogli di alluminio sono stati osservati allo stereomicroscopio prima dell'uso per verificare l'assenza di fibre. È stato evitato l'uso di camici da laboratorio bianchi, preferendo indumenti colorati per limitare confusione con le fibre utilizzate per l'esposizione essendo queste di colore bianco. Quest'ultima pratica è stata adottata anche durante la fase sperimentale e la raccolta dei campioni.

Gli organismi utilizzati nell' esperimento sono stati campionati nel mese di giugno 2020 e trasportati in laboratorio mantenendoli opportunamente idratati; una volta in laboratorio, gli organismi epibionti sono stati rimossi dalle valve spazzolandole delicatamente, e sono stati selezionati 216 organismi con una

lunghezza delle valve compresa tra 5 e 7 cm, rappresentativi della taglia media della popolazione campionata.

Questi sono stati casualmente posizionati in 8 vasche da 15 L (27 organismi in ciascuna vasca) e lasciati acclimatare per 10 giorni in acqua di mare sintetica a temperatura di 23°C, salinità 35 e pH 8.20, valori misurati in mare nei giorni precedenti il prelievo degli organismi (Fig.4).

Al termine della fase di acclimatazione, gli organismi sono stati esposti per 14 giorni a 4 condizioni sperimentali (Fig.4)., elencate di seguito, ciascuna condotta in duplicato:

- CONTROLLO (CTL): assenza di MF, 23°C;
- POLIESTERE (PEST): 50 MF di poliestere/L, 23°C;
- POLIAMMIDE (PA): 50 MF di poliammide/L, 23°C;
- COTONE (CO): 50 MF di cotone/L, 23°C;

La concentrazione di 50 MFs/L scelta, è pari al doppio della concentrazione massima trovata nelle acque marine superficiali (25.8 fibre/L, Suaria *et al.*, 2020). Durante la fase di esposizione, l'acqua è stata cambiata a giorni alterni e ad ogni cambio le MFs sono state nuovamente somministrate. Gli organismi sono stati cibati 12 h prima di ogni cambio d'acqua con un mix commerciale di fito-zooplankton.

Al termine della fase di esposizione, i mitili sono stati sottoposti per 7 giorni ad una fase di depurazione in assenza di microfibre in due condizioni sperimentali: una alla stessa temperatura della fase di esposizione (*recovery*), e l'altra tesa a simulare uno scenario di *heatwave* osservato nel bacino adriatico nell'estate 2019. La condizione di *heatwave* è stata ricreata aumentando la temperatura di 1°C/giorno, da 23°C a 27°C (Fig.4).

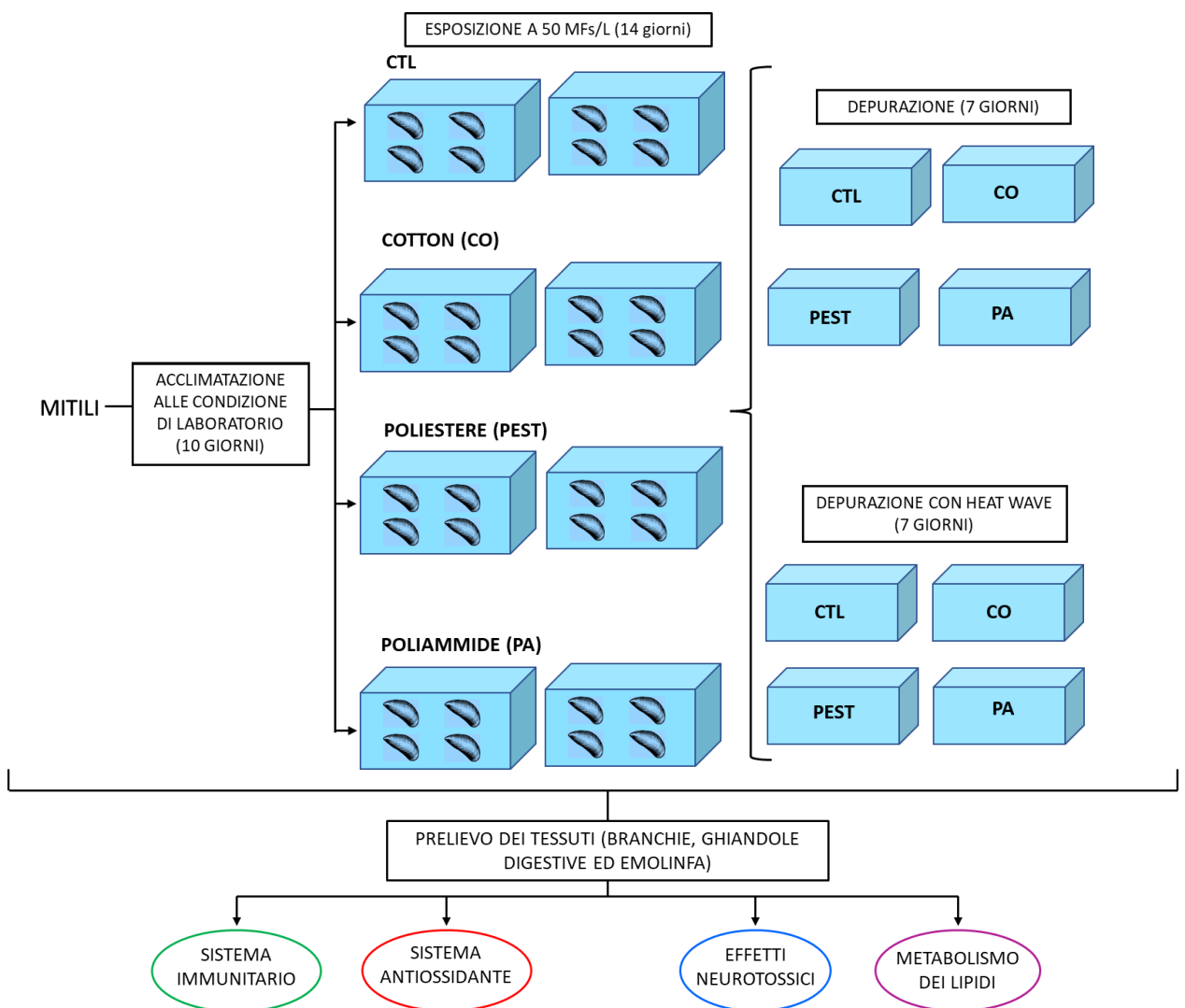


Figura 4 - Piano sperimentale per l'esposizione di *M. galloprovincialis* a microfibre.

3.1.2 Prelievo dei tessuti

Al termine della fase di esposizione (14 giorni), di depurazione (21 giorni) e di esposizione al secondo stress (21 giorni), sono stati selezionati casualmente 18 organismi da ciascun trattamento di ogni fase sperimentale e da questi sono state prelevate emolinfa, branchie e ghiandola digestiva, unite in 6 pool, ciascuno composto dai tessuti di tre organismi; una parte di emolinfa è stata utilizzata immediatamente per le analisi in vivo (~ 150 µL a campione per analisi della stabilità delle membrane lisosomiali, del rapporto granulociti – ialinociti e della fagocitosi), una parte fissata in Carnoy per l'analisi del danno genotossico (frequenza di micronuclei) mentre la restante congelata in azoto liquido e conservata a -80°C, come i campioni di branchie e ghiandola digestiva, fino al momento delle analisi, descritte al paragrafo 3.3.

3.2 Esposizione di *M. galloprovincialis* a microplastiche (MPs)

3.2.1 Piano sperimentale

L'obiettivo di questo esperimento è stato quello di investigare gli effetti indotti da MPs di diverse classi di taglia, in termini di composizione, efficienza ed integrità del sistema immunitario.

A tale scopo sono stati preparati stock di frammenti di polietilene (PE) individuando 5 classi di taglia: XS, 20 – 50 μm ; S, 50 – 100 μm ; M, 100 – 250 μm ; L, 250 – 500 μm ; XL, 500 – 1000 μm . I frammenti di PE sono stati forniti in forma di polvere da un'azienda produttrice di materiale plastico, e separati in ciascuna frazione grazie ad un setacciatore digitale usando setacci con maglie di 20 μm , 50 μm , 100 μm , 250 μm , 500 μm e 1000 μm . Per ottenere ciascuna frazione sono state necessarie più operazioni di setacciatura, ognuna della durata di 2 ore con cicli di 20 minuti e ampiezza dell'oscillazione compiuta dal singolo setaccio di 2 mm. Non è stata ottenuta una frazione apprezzabile di particelle inferiori a 20 μm . Successivamente, ciascuna frazione è stata recuperata, pesata e i frammenti posti all'interno di barattoli di vetro sigillati, precedentemente trattati con un getto di aria compressa per eliminare eventuali particelle residue e così da evitare contaminazione esterna.

Sulla base della letteratura scientifica, è stata scelta la concentrazione di 1000 particelle di PE/L come concentrazione ottimale per l'esposizione. Il quantitativo in grammi di particelle da utilizzare per ogni trattamento alla concentrazione scelta è stato calcolato sulla base del peso medio di una singola particella di ogni classe dimensionale, determinato pesando 100 particelle per ciascuna classe dimensionale in triplicato dopo averle isolate allo stereomicroscopio, come mostrato in tabella 2. Le particelle sono poi state

poste su fogli di carta di alluminio e le confezioni mantenute chiuse fino alle operazioni di dosaggio.

CLASSE DIMENSIONALE (μm)	PESO MEDIO PARTICELLE (μg)	NUMERO PARTICELLE / L	μg DI PARTICELLE / 5 L
20 - 50	0.5	1000	2500 (= 2.5 mg)
50 - 100	1	1000	5000 (= 5mg)
100 - 250	2	1000	10000 (=10 mg)
250 - 500	5	1000	25000 (25 mg)
500 - 1000	125	1000	625000 (625 mg)

Tabella 2 - Dimensioni, peso e concentrazioni delle particelle di PE utilizzate per l'esperienza sulle MPs

Gli organismi utilizzati sono stati campionati nel mese di luglio 2021 e trasportati velocemente in laboratorio mantenendoli opportunamente idratati; una volta in laboratorio, gli organismi epibionti sono stati rimossi dalle valve spazzolandole delicatamente, e sono stati selezionati 72 organismi con una lunghezza delle valve compresa tra 5 e 7 cm, rappresentativi della taglia media della popolazione campionata.

Questi sono stati casualmente posizionati all'interno di becher da 5 L (6 individui in ciascuno; e lasciati acclimatare per 7 giorni in acqua di mare sintetica a temperatura di 23°C e salinità 35, valori misurati nel Mar Adriatico nel mese di luglio 2021 (Fig.5).



Figura 5 – Dettagli dell’esposizione, becher sperimentali con mitili disposti in un sistema di bagnomaria per controllare la temperatura.

Al termine della fase di acclimatazione, gli organismi sono stati esposti per 10 giorni a 6 trattamenti sperimentali, elencanti di seguito (Fig.6), ciascuno condotto in duplicato.

- CTL: controllo, assenza di MP;
- XS_PE: 1000 MP di PE 20-50 $\mu\text{m}/\text{L}$;
- S_PE: 1000 MP di PE di 50-100 $\mu\text{m}/\text{L}$;
- M_PE: 1000 MP di PE di 100-250 $\mu\text{m}/\text{L}$;
- L_PE: 1000 MP di PE di 250-500 $\mu\text{m}/\text{L}$;
- XL_PE: 1000 MP di PE di 500-1000 $\mu\text{m}/\text{L}$;

Durante la fase di esposizione, l’acqua è stata cambiata a giorni alterni e ad ogni cambio i becher sciacquati due volte con acqua di mare sintetica filtrata a

0.22 μ m e le MPs nuovamente somministrate. Gli organismi sono stati cibati dopo ogni cambio d'acqua con un mix commerciale di fito-zooplankton, aggiungendo le MPs a distanza di 10 minuti.

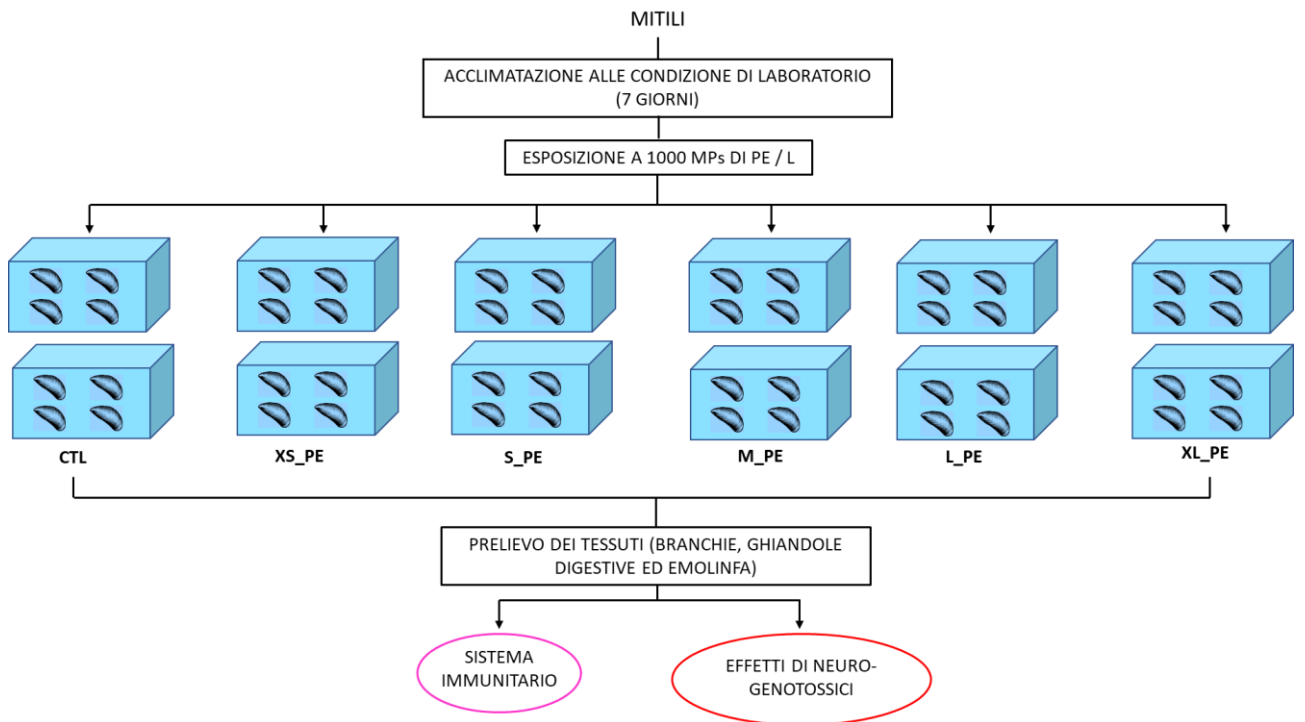


Figura 6 - Piano sperimentale per l'esposizione alle microplastiche di PE di *M. galloprovincialis*.

3.3 Analisi biologiche

La *stabilità delle membrane lisosomiali* è stata analizzata negli emociti di *M. galloprovincialis*; un'aliquota dell'emolinfa prelevata dal muscolo adduttore anteriore tramite siringa ipodermica e diluita con un rapporto 1:1 con acqua di mare filtrata a 0.22 μ m, è stata dispersa su un vetrino dove le cellule sono state lasciate aderire per 15 minuti a 4 °C in camera buia e umida. Le cellule sono

quindi state incubate con una soluzione di Rosso Neutro ed esaminate ad intervalli di 15 minuti (fino ad un tempo massimo di 120 min) per determinare il tempo al quale il 50% degli emociti presenta il Rosso Neutro non più compartimentalizzato nei lisosomi ma rilasciato nel citosol. La soluzione stock di Rosso Neutro è stata preparata dissolvendo 28.8 mg di colorante in 1 mL di dimetilsulfossido (DMSO) e conservata a 4°C per non più di 3 settimane; al momento dell'analisi 10 µl di soluzione stock sono stati diluiti in 5 mL di soluzione fisiologica (Lowe *et al.*, 1995).

Il rapporto tra granulociti e ialinociti è stato valutato su un'aliquota di 50µL di emolinfa, lasciata aderire su vetrino e successivamente fissata in Baker's Ca-formolo per 15 minuti. Dopo un risciacquo in acqua deionizzata, il vetrino è stato incubato per 3 minuti in ematossilina, che colora in blu-viola gli acidi nucleici, le membrane e le proteine di membrana. Sono poi seguiti una serie di lavaggi in acqua del rubinetto e acido cloridrico (HCl 0.5%) e la successiva incubazione per 3 minuti in eosina 1%, che colora in risultare rosa le componenti acidofile, come mitocondri, lisosomi e proteine citosoliche. Dopo un risciacquo finale ed il montaggio in Eukitt, è stato contato il numero dei granulociti (cellule con pseudopodi e citoplasma ricco di granuli) e degli ialinociti (cellule con citoplasma ridotto e nucleo evidente) al microscopio ottico, su un totale di 300 cellule.

La *fagocitosi* è stata valutata su un'aliquota di 50 μL di emolinfa, incubata al buio in camera umida per due ore con 50 μL di Zymosan (particelle di lievito fluorescenti). La soluzione di lieviti fluorescenti è stata ottenuta preparando una soluzione madre sciogliendo 1 mg di polvere di Zymosan in 50 μL di PBS e 1 μL di NaN_3 , successivamente 1 μL di questa soluzione viene diluita in 150 μL di acqua di mare sintetica filtrata a 0.22 μm . Dopo l'incubazione, i campioni sono stati sciacquati in acqua di mare sintetica filtrata a 0.22 μm , fissati in Baker's Ca-formolo per 15 minuti e montati con Eukitt; tramite microscopia ottica a fluorescenza, sono stati analizzati 300 granulociti per ciascun campione, e la capacità di fagocitosi espressa come numero di granulociti che al termine delle due ore di incubazione avessero fagocitato almeno tre cellule di lievito fluorescente sul totale di cellule analizzate.

La *frequenza di micronuclei* (MN) è stata valutata negli emociti prelevati dal muscolo adduttore, strisciati su vetrino e incubati con $\sim 20 \mu\text{L}$ di 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI, 100 ng mL^{-1}). I vetrini così preparati sono stati esaminati al microscopio a fluorescenza, e per ciascun campione sono state contate il numero di cellule che avevano nel nucleo porzioni di cromatina DAPI-positive in discontinuità fisica con il materiale nucleare centrale (Nigro et al., 2006) su un totale di 2000 cellule.

L'attività dell'*acil-CoA ossidasi* (AOX), enzima localizzato a livello dei perossisomi e coinvolto nella beta-ossidazione degli acidi grassi, è stata misurata in campioni di ghiandola digestiva omogenati in tampone sodio bicarbonato 1mM, pH 7.6, contenente EDTA 1mM, etanolo 0.1%, TRITON X-100 0.01% e centrifugati a 500 xg per 15 min a 4°C. L'analisi spettrofotometrica ha previsto l'incubazione del campione in un working buffer, e l'attività enzimatica della AOX è stata definita seguendo la reazione di ossidazione della diclorofluoresceina diacetato (2.2mM) (DCF-DA) in presenza di una perossidasi esogena (1.2 U/ml) e con l'aggiunta di un substrato specifico (Palmitoil CoA 30µM) alla temperatura di $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\lambda = 502 \text{ nm}$ (Small et al., 1985).

L'attività dell'*acetilcolinesterasi* (AChE) è stata determinata in campioni di emolinfa (sovrinatante risultante da una centrifuga 3000 xg per 5 minuti) e di branchie (omogenati 1:5 p/v in Tris-HCl 0.1 M, pH 7.2 e saccarosio 0.25 M e centrifugati per 10 minuti a 10000 xg). Il sovrinatante ottenuto è stato impiegato per la determinazione dell'attività della acetilcolinesterasi (AChE) secondo il metodo di Ellman (Ellman et al., 1961), usando come substrato l'acetilcolina iodide che viene convertita dall'enzima in tiocolina. Questa reagisce con l'acido 5,5'-ditio-bis-2nitrobenzoinico (DTNB) originando un

anione giallo quantificato alla temperatura di $18 \pm 1^\circ\text{C}$ e alla lunghezza d'onda di 412 nm ($\epsilon = 13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Per la determinazione del *glutathione totale* (TGSH), la ghiandola digestiva è stata omogenata con acido sulfosalicilico 5% con EDTA 4 mM con un rapporto 1:5 p/v. I campioni così preparati sono stati lasciati in ghiaccio per 45 minuti al fine di ottenere una completa deproteinizzazione e centrifugati a 37000 xg per 15 minuti. Il contenuto di glutathione totale è stato determinato nel sovrinatante misurando per via spettrofotometrica ($\lambda = 412 \text{ nm}$) la differenza di assorbanza del campione ottenuta per reazione dei gruppi $-\text{SH}$ e l'acido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB). Il saggio è stato condotto in tampone K- fosfato 100 mM pH 7, EDTA 1 mM, DTNB 0.1 mM, NADPH 0.24 mM, glutathione riduttasi 1 U ed opportune aliquote di campione. I valori di assorbanza ottenuti sono stati convertiti in quantità di glutathione totale mediante una curva di standard di GSH.

La *Capacità Antiossidante Totale* (TOSC) è stata quantificata tramite il saggio TOSC che misura l'efficienza complessiva di un campione biologico di neutralizzare diverse forme di ROS tra cui i radicali perossilici ($\text{ROO}\cdot$) e i radicali idrossilici ($\text{HO}\cdot$) (Winston et al., 1998; Regoli e Winston, 1999; Gorbi e Regoli, 2003). Le analisi sono state effettuate sulla componente citosolica della ghiandola digestiva omogenata con un rapporto 1:5 p/v in un buffer

costituito da tampone K-fosfato 50 mM pH 7.5, NaCl 2.5% ed i seguenti inibitori di proteasi: aprotinina 0.008 TIU/mL, leupeptina 1 µg/mL, pepstatina 0.5 µg/mL. Gli omogenati così ottenuti sono stati centrifugati a 100000 xg per 1 ora e 10 minuti a 4°C, e la frazione citosolica aliquotata e conservata a - 80°C fino al momento delle analisi. Il saggio TOSC-A (Total Oxyradical Scavenging Capacity Assay) prevede la reazione tra le diverse forme di radicali che sono artificialmente generati, e l'acido α -cheto- γ -metiolbutirrico (KMBA), che funge da substrato e si ossida liberando gas etilene. La produzione di etilene risulta quantitativamente diminuita in presenza di agenti antiossidanti (come quelli contenuti nel materiale biologico) che reagiscono con i radicali neutralizzandoli e sottraendoli alla reazione con il KMBA. Il grado di inibizione della formazione di etilene rispetto alla reazione di controllo, permette di quantificare un parametro TOSC che rappresenta la capacità antiossidante totale del campione nei confronti di una determinata classe di radicali liberi (Winston et al., 1998). Poiché l'efficienza relativa degli antiossidanti può variare molto nei confronti di diverse forme di ossidanti, il metodo TOSCA è stato standardizzato nei confronti di più classi di radicali liberi, tra cui i radicali perossilici ed idrossilici. I radicali perossilici (ROO•) sono stati generati attraverso l'omolisi termica del 2,2'-azo-bis-

amidinopropano (ABAP) mentre i radicali idrossilici ($\text{HO}\cdot$) attraverso la reazione di Fenton ferro-ascorbato.

Le condizioni finali di saggio sono state le seguenti:

- per l'analisi con i radicali perossilici ($\text{ROO}\cdot$): un volume variabile di campione, KMBA 0.2 mM e ABAP 20 mM in tampone K-fosfato 100 mM pH 7.4;

- per l'analisi con i radicali idrossilici ($\cdot\text{OH}$): un volume variabile di campione, KMBA 0.2 mM, Fe^{3+} 1.8 μM , EDTA 3.6 μM e acido ascorbico 180 μM in tampone K-fosfato 100 mM pH 7.4;

Le reazioni sono state condotte in appositi contenitori di vetro da 10 mL (vials), sigillati con speciali tappi muniti di setto gas-tight Mininert per iniezioni multiple, mantenuti alla temperatura costante di 35°C in bagno termostatico continuamente agitato per consentire una generazione costante delle varie forme di radicali. Il KMBA viene ossidato dalle diverse forme di radicali generando gas etilene, aliquote di 200 μL sono state prelevate dallo spazio di testa ad intervalli di 10 minuti e la formazione dell'etilene è stata monitorata nel tempo mediante analisi gas-cromatografica su colonna capillare "Supelco SPB-1" (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm) e con rivelatore FID (Flame Ionization Detector), utilizzando le seguenti condizioni strumentali: temperatura del forno pari a 35°C, temperatura del FID pari a 220°C, temperatura d'iniezione pari a

160°C, flusso d'idrogeno pari a 30 mL/minuto; flusso d'elio pari a 3 mL/minuto.

La differenza nella produzione di etilene tra la reazione nei vials di controllo e la reazione nei vials contenenti i campioni, è stata calcolata matematicamente, integrando l'area al di sotto delle rispettive curve cinetiche della produzione d'etilene in funzione del tempo, considerando che ogni campione viene letto ogni 12 minuti per un tempo totale di saggio pari a 96 minuti. I risultati ottenuti permettono di quantificare il parametro TOSC, compreso tra 0 e 100, indice della capacità complessiva del campione analizzato, di neutralizzare le varie forme di specie reattive dell'ossigeno. I valori TOSC sperimentali ottenuti nei confronti delle varie forme di radicali sono quantificati dall'equazione: $TOSC = 100 - (\int SA / \int CA \times 100)$, dove $\int SA$ e $\int CA$ sono gli integrali delle aree al di sotto delle curve che rappresentano rispettivamente le reazioni di un campione SA (Sample Area), e del controllo CA (Control Area). Un campione che sia privo di qualsiasi capacità di neutralizzare i radicali mostrerà una produzione di etilene in funzione del tempo uguale a quella dei controlli ($\int SA / \int CA = 1$) ed il risultante valore TOSC sarà pertanto pari a 0. Al contrario un ipotetico valore TOSC=100 corrisponderebbe ad un campione che neutralizza tutte le specie reattive prodotte, inibendo completamente la formazione di etilene nell'intera durata del saggio ($\int SA = 0$). Dai risultati sperimentali viene ottenuto un valore

TOSC specifico, rapportato al contenuto di proteine ed espresso come unità TOSC/mg di proteine. Le proteine sono state analizzate secondo il metodo di Lowry, utilizzando albumina di siero bovino (BSA) come standard (Lowry *et al.*, 1951).

L'accumulo di *lipofuscina* è stato valutato su sezioni criostatiche di 8 µm di ghiandola digestiva, fissate in Baker's Ca-formolo (10 mL di Formaldeide al 40%; 1 g di CaCl₂, NaCl al 2.5% in un volume finale di 100 mL) per 15 minuti a 4°C e successivamente incubate per 5 minuti in una soluzione di colorazione (soluzione di Schmorl), costituita da cloruro ferrico 1% e K-ferricianuro 1% (5:1) portata al volume di 50 mL con acqua distillata. I vetrini sono poi stati lavati in acido acetico al 2% e acqua distillata e montati in Eukitt. Attraverso un software d'analisi d'immagine è stata quantificata l'intensità di colorazione dei granuli di lipofuscina, evidenziati come granuli dal colore verde-azzurro, su 8 foto per ciascun campione, e rapportata alla superficie totale di ciascuna immagine.

Il contenuto di *lipidi neutri* è stato determinato su sezioni criostatiche di 8 µm di ghiandola digestiva, fissate in Baker's Ca-formolo per 15 minuti a 4°C e poi incubate per 15 minuti in una soluzione satura di Oil Red O (1% in alcool isopropilico), sciacquate in alcool isopropilico al 60% e poi in acqua distillata, e montate con gelatina di glicerolo (Moore, 1988; Regoli, 1992). Attraverso un

software d'analisi d'immagine è stata quantificata l'intensità di lipidi neutri, evidenziati come gocce di colore rosso, su 8 foto per ciascun campione, e rapportata alla superficie totale di ciascuna immagine.

3.4 Analisi statistica

Per l'esperimento con le microfibre, gli effetti dei fattori "Trattamento" (4 livelli: *CTL*, *PEST*, *PA* e *CO*) e "Fase sperimentale" (3 livelli: *esposizione*, *recovery* e *heatwave*) e della loro interazione sono stati analizzati attraverso l'analisi della varianza a 2 vie (2-way ANOVA, Tabella 3), dopo aver verificato la distribuzione normale dei dati e l'omogeneità delle varianze attraverso i test di Shapiro-Wilk e Levene. In seguito all'analisi della varianza, i confronti di interesse sono stati analizzati con un test *post-hoc* (Tukey HSD). L'analisi delle componenti principali (PCA) è stata applicata per visualizzare la separazione dei diversi trattamenti per ciascuna fase sperimentale.

Per l'esperimento con le diverse taglie di PE, l'analisi della varianza ad una via (1-way ANOVA) seguita dal *post-hoc* Tukey HSD è stata applicata per investigare possibili differenze significative tra le diverse classi di taglia, quando le assunzioni dell'ANOVA erano rispettate (omogeneità delle varianze, test di Levene, e distribuzione normale dei dati, test di Shapiro-Wilk). L'analisi

delle componenti principali (PCA) è stata applicata per visualizzare la separazione dei diversi trattamenti.

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software RStudio (versione 1.2.5033).

Capitolo 4

RISULTATI

4.1 Risposte biologiche in M. galloprovincialis esposto a microfibre

4.1.1 Parametri immunitari

L'esposizione a MFs non ha causato effetti in termini di rapporto tra granulociti e ialinociti, tuttavia negli organismi precedentemente esposti a PEST e CO è stato osservato un aumento statisticamente significativo in risposta al secondo stress (HEAT STRESS postEXP) (Fig. 7A, Tab.3).

Per quanto riguarda la fagocitosi, al termine della fase di esposizione è stata osservata una diminuzione significativa negli organismi esposti a tutte le tipologie di microfibre, effetto che non è stato riscontrato al termine della fase di recupero; alla stessa maniera non sono state osservate differenze tra trattamenti in risposta all'aumento di temperatura, sebbene in tutti gli organismi esposti a microfibre la fagocitosi è aumentata in maniera statisticamente significativa rispetto alla fase di esposizione (Fig. 7b, Tab.3).

La stabilità delle membrane lisosomiali è stata significativamente ridotta negli organismi esposti a PA ed in misura minore ma non significativa anche negli organismi esposti a PEST (Fig. 7C, Tab.3). Questo effetto è perdurato anche nella fase di depurazione, sia a temperatura di controllo che a temperatura

elevata; inoltre, gli organismi esposti a microfibre di cotone, hanno mostrato una ridotta stabilità delle membrane lisosomiali quando esposti all'aumento di temperatura (Fig. 7C, Tab.3).

Per quanto riguarda la frequenza dei micronuclei, non sono state osservate differenze né durante la fase di esposizione né durante la fase di recupero, in entrambi gli scenari di temperatura (Fig. 7D, Tab.3).

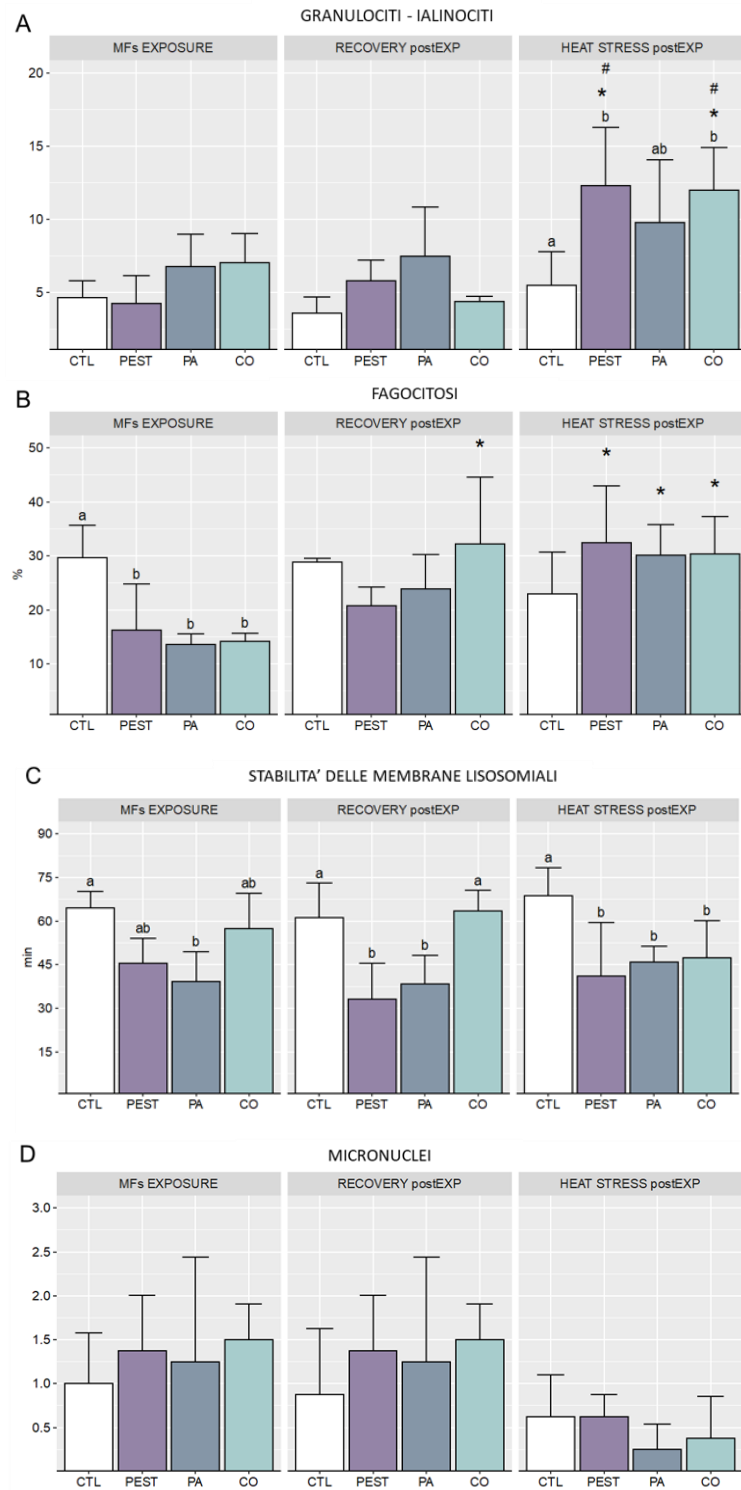


Figura 7 - Rapporto granulociti - ialinociti (A), fagocitosi (B), stabilità delle membrane lisosomiali (C) e frequenza dei micronuclei (D) negli emociti di mitili (CTL, controllo; PEST, poliestere; PA, poliamide; CO, cotone), durante le fasi di esposizione (MFs EXPOSURE), recovery (RECOVERY postEXP) e stress termico dopo l'esposizione a MFs (HEAT STRESS postEXP). Le lettere indicano differenze significative tra trattamenti della stessa fase sperimentale; gli asterischi (*) indicano differenze tra le fasi post-esposizione ed esposizione dello stesso trattamento; cancelletto (#) indica differenze tra le due fasi post-esposizione di ciascun trattamento. I valori sono espressi come media \pm deviazione standard (n=4).

4.1.2 Attività enzimatica acil-CoA ossidasi e acetilcolinesterasi

Durante la fase di esposizione sono stati osservati effetti significativi a carico dell'attività dell'enzima acil-CoA ossidasi nella ghiandola digestiva di mitili esposti a PA, mentre al termine della fase di recovery non sono state osservate differenze tra trattamenti. L'aumento di temperatura ha causato una riduzione dell'attività di questo enzima negli organismi di controllo (CTL HEATWAVE vs. CTL RECOVERY), che hanno mostrato un'attività significativamente più bassa rispetto agli organismi esposti a PEST, PA e CO (Fig. 8A, Tab.3).

L'attività dell'acetilcolinesterasi nell'emolinfa non ha mostrato differenze statisticamente significative tra trattamenti al termine della fase di esposizione, mentre al termine della fase di recupero è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra gli organismi esposti alle microfibre di PA e quelli di controllo (Fig.8B, Tab.3); l'esposizione al secondo stress ha causato una riduzione dell'attività di questo enzima in tutti i trattamenti, in maniera particolare per quelli esposti a PEST e PA rispetto alla fase di recovery (Fig.8B, Tab.3). Per quanto riguarda l'attività di questo enzima nelle branchie, al termine della fase di esposizione non sono stati evidenziati effetti; al contrario, dopo la fase di recupero, negli organismi esposti a PA e CO è stata osservata un'induzione di questo enzima, significativo per il primo trattamento (Fig.8C, Tab.3). L'aumento di temperatura ha causato un'induzione di questo enzima

negli organismi di controllo, con differenze significative tra questi organismi e quelli precedentemente esposti a microfibre di cotone (Fig.8C, Tab.3).

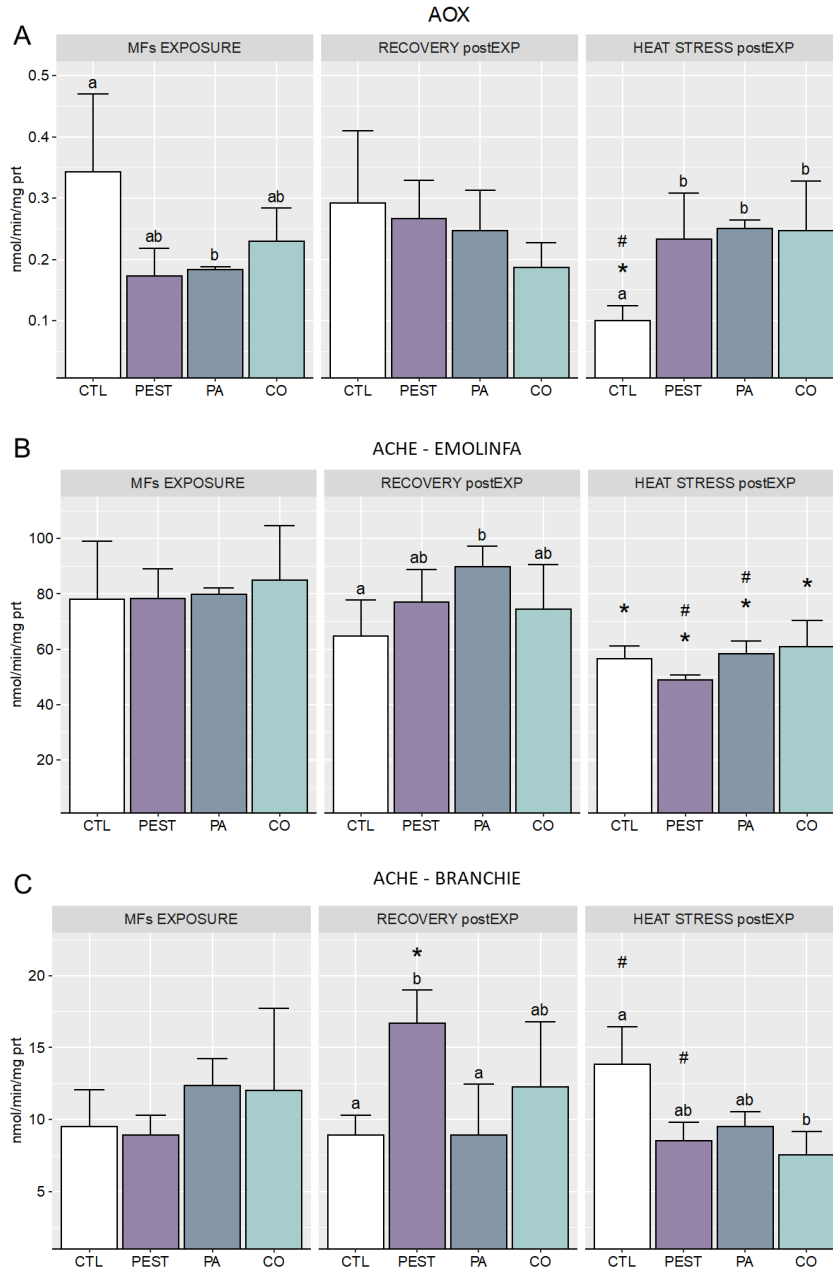


Figura 8 - Attività enzimatica dell'acil-CoA ossidasi nella ghiandola digestiva (A) e dell'acetilcolinesterasi nell'emolinfa (B) e nelle branchie (C) di mitili durante le fasi di esposizione (MFs EXPOSURE), recovery (RECOVERY postEXP) e stress termico dopo l'esposizione a MFs (HEAT STRESS postEXP). Le lettere indicano differenze significative tra trattamenti della stessa fase sperimentale; gli asterischi (*) indicano differenze tra le fasi post-esposizione ed esposizione dello stesso trattamento; cancelletto (#) indica differenze tra le due fasi post-esposizione di ciascun trattamento. I valori sono espressi come media \pm deviazione standard (n=4).

4.1.3 Difese antiossidanti

Il contenuto di glutazione totale (TGSH) è diminuito negli organismi esposti alle microfibre di cotone al termine della fase di esposizione; tali differenze non sono state osservate al termine della fase di recupero, mentre è stato osservato un aumento di glutazione totale nel trattamento PA in risposta all'aumento di temperatura (Fig. 9A, Tab. 3).

Per quanto riguarda la capacità antiossidante totale nei confronti del radicale perossilico (TOSC ROO•), nel trattamento PA è stato osservato un aumento al termine della fase di esposizione: tale effetto non è stato osservato alla fine del recupero né in risposta ad un secondo stress (Fig. 9B, Tab. 3).

In maniera analoga, tale effetto è stato osservato anche per quanto riguarda la capacità antiossidante totale nei confronti del radicale idrossilico (TOSC HO•) nel trattamento PA alla fine dell'esposizione (Fig. 9C, Tab. 3); al contrario però questo parametro è risultato significativamente più alto negli organismi esposti al cotone in risposta allo stress termico rispetto al relativo controllo (CO HEATWAVE vs. CTL HEATWAVE, Fig. 9C, Tab. 3).

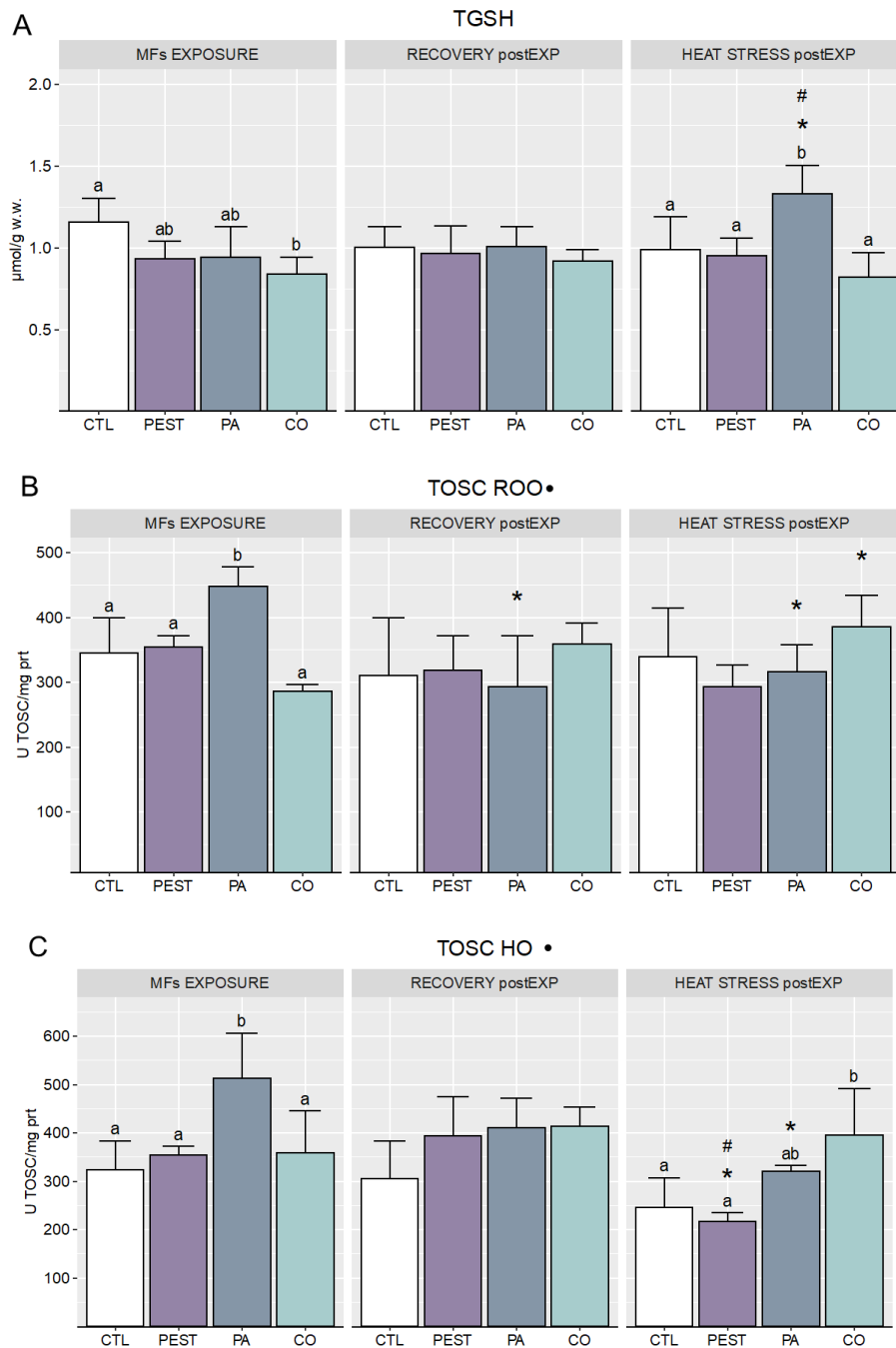


Figura 9 – Contenuto di glutazione totale (A) e capacità antiossidante totale (TOSC ROO• e HO•, B e C) nella ghiandola digestiva di mitili (CTL, controllo; PEST, poliestere; PA, poliamide; CO, cotone), durante le fasi di esposizione (MFs EXPOSURE), recovery (RECOVERY postEXP) e stress termico dopo l'esposizione a MFs (HEAT STRESS postEXP). Lettere indicano differenze significative tra trattamenti della stessa fase sperimentale; gli asterischi (*) indicano differenze tra le fasi post-esposizione ed esposizione dello stesso trattamento; cancelletto (#) indica differenze tra le due fasi post-esposizione di ciascun trattamento. I valori sono espressi come media \pm deviazione standard (n=4).

4.1.4 Accumulo di lipofuscina e lipidi neutri

Non sono state osservate differenze in termini di contenuto di lipofuscina al termine della fase di esposizione, ma al contrario questo parametro è risultato aumentato in tutti gli esposti a microfibre al termine della fase di recovery, in maniera significativa negli organismi esposti al cotone (CO RECOVERY); l'aumento di temperatura ha causato un aumento di lipofuscina indipendentemente dall'esposizione a microfibre, meno evidente negli organismi esposti a PA (Fig. 10A, Tab.3).

Al termine della fase di esposizione, è stato osservato un aumento significativo del contenuto di lipidi neutri negli organismi esposti a PA; tale effetto non è stato osservato al termine della fase di recovery, dove invece gli organismi esposti a PA e CO hanno mostrato una significativa riduzione dell'attività di questo enzima (Fig.10B, Tab.3). L'aumento di temperatura ha prodotto un accumulo di lipidi neutri negli organismi di controllo, risultati significativamente più elevati rispetto ai livelli osservati negli organismi esposti a microfibre, sia naturali che sintetiche.

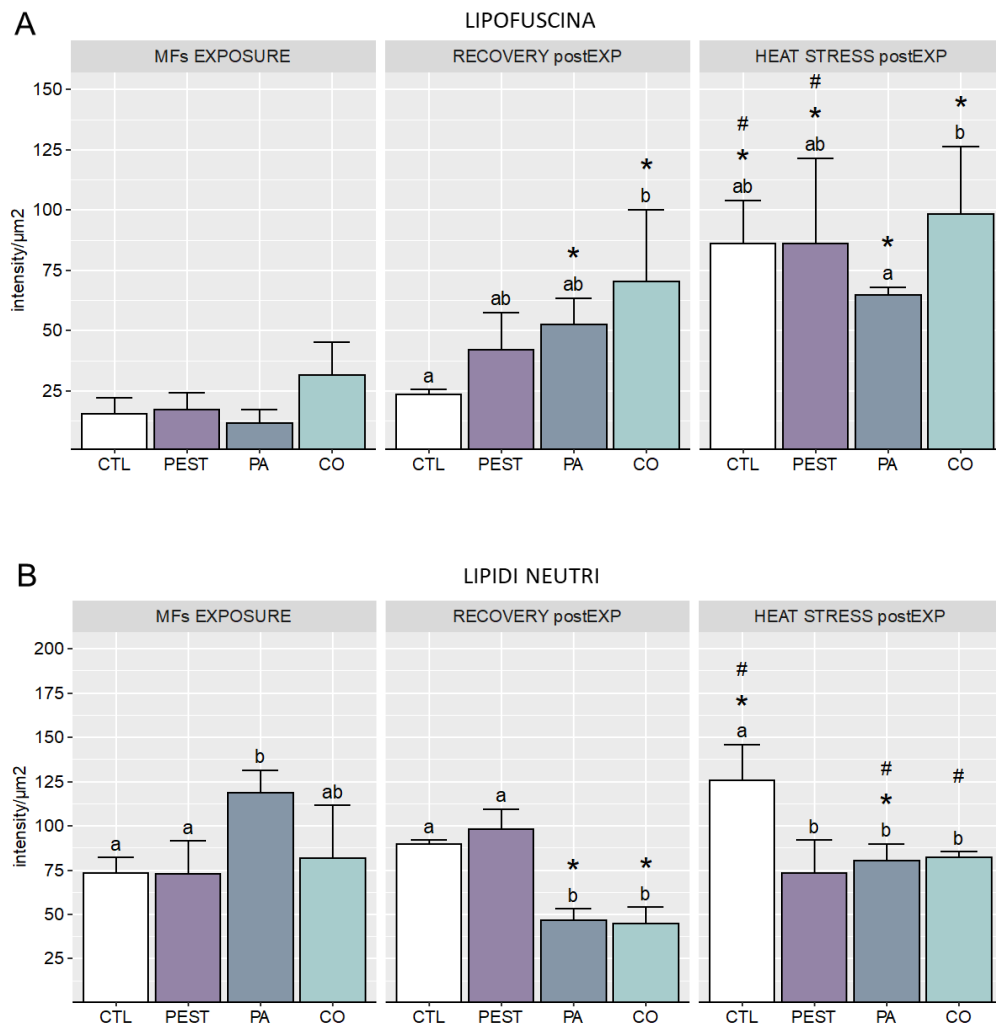


Figura 10 - Contenuto di lipofuscina (A) e di lipidi neutri (B) in sezioni criostatiche di ghiandola digestiva di mitili (CTL, controllo; PEST, poliestere; PA, poliamide; CO, cotone), durante le fasi di esposizione (MFs EXPOSURE), recovery (RECOVERY postEXP) e stress termico dopo l'esposizione a MFs (HEAT STRESS postEXP). Lettere indicano differenze significative tra trattamenti della stessa fase sperimentale; gli asterischi (*) indicano differenze tra le fasi post-esposizione ed esposizione dello stesso trattamento; cancelletto (#) indica differenze tra le due fasi post-esposizione di ciascun trattamento. I valori sono espressi come media \pm deviazione standard (n=4).

PARAMETRI	FATTORI		
	Trattamento	Fase sperimentale	Trattamento x fase sperimentale
Stabilità delle membrane lisosomiali (LMS)	p < 0.001 F = 14.23	p = 0.8236 F = 0.1952	p = 0.2546 F = 1.33682
Granulociti : Ialinociti (GRA_IALINO)	p < 0.01 F = 4.88	p < 0.001 F = 16.29	p = 0.061714 F = 2.23
Fagocitosi (PHAGO)	p = 0.3344 F = 1.17	p < 0.001 F = 10.18	p < 0.01 F = 3..66
Frequenza dei micronuclei (MN)	p = 0.6318 F = 0.5802	p < 0.01 F = 7.4542	p = 0.8834 F = 0.3855
Acetilcolinesterasi emolinfa (AChE_HL)	p = 0.1789 F = 1.77266	p < 0.0001 F = 19.265	p = 0.3354 F = 1.1865
Acetilcolinesterasi branchie (AChE_BR)	p = 0.33144 F = 1.17	p = 0.6309 F = 0.4666	p = 0.03198 F = 2.63
Acil-CoA ossidasi (ACOX)	p = 0.99817 F = 0.119	p = 0.10393 F = 2.49	p = 0.0128 F = 3.37
Glutazione totale (TSGH)	p < 0.01 F = 6.268	p = 0.5180 F = 0.6698	p = 0.01116 F = 3.2818
TOSC_ROO•	p = 0.5062 F = 0.7923	p = 0.127 F = 2.1848	p = 0.0015 F = 4.55
TOSC_HO•	p < 0.001 F = 9.218	p < 0.001 F = 9.97	p = 0.0184 F = 2.97
Lipofuscina	p < 0.01 F = 4.88	p < 0.001 F = 5157	p = 0.1932 F = 1.54
Lipidi neutri	p = 0.077 F = 2.47	p = 0.004 F = 6.28	p < 0.001 F = 6.98

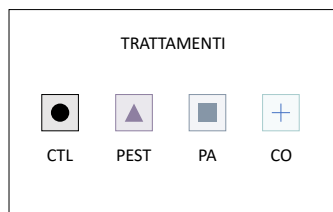
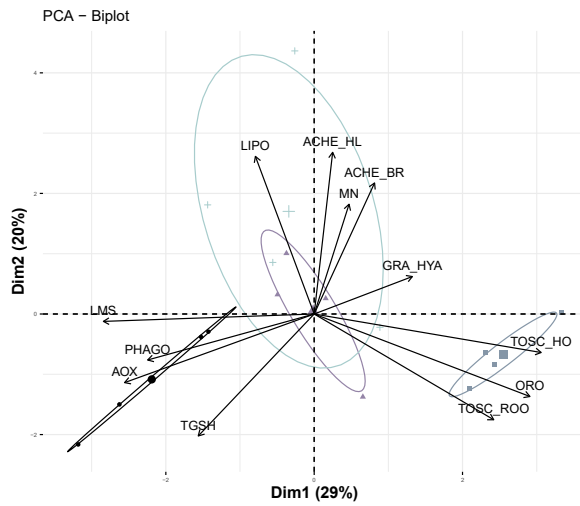
Tabella 3 – Risultati dell’ANOVA a due vie per i fattori trattamento (CTL, PA, PEST e PA) e fase sperimentale (ESPOSIZIONE, RECOVERY e HEATWAVE) e loro interazione. Valori di F e p sono riportati per ciascun parametro analizzato.

4.1.5 Analisi delle componenti principali

L’analisi delle componenti principali ha rivelato una chiara separazione lungo la componente principale 1 (29% della varianza totale) tra il controllo e i diversi trattamenti al termine dell’esposizione, in maniera particolarmente evidente per la PA (Fig.11A). Tale separazione è stata supportata da stabilità delle membrane lisosomiali, fagocitosi, attività ACOX, contenuto TGSH, capacità antiossidante totale e accumulo di lipidi neutri; una ulteriore discriminazione tra trattamenti è stata supportata lungo la componente 2 (20% della varianza totale), cui hanno contribuito maggiormente l’attività dell’AChE e il contenuto

di lipofuscina. Al termine della fase di recovery, è stata osservata una separazione tra gli organismi lasciati a depurare a temperatura di controllo e quelli esposti allo stress termico (Fig. 11B), supportata dalle variazioni dell'attività AChE nell'emolinfa, la capacità antiossidante totale nei confronti del radicale idrossilico, contenuto di lipofuscina e lipidi neutri, stabilità delle membrane lisosomiali e attività ACOX, con un contributo alla varianza totale del 20.9%; inoltre gli organismi esposti a microfibre hanno mostrato una maggiore separazione dal rispettivo controllo nel gruppo sottoposto a stress termico rispetto a quelli lasciati a depurare a temperatura di esposizione, supportato dall'attività AChE nelle branchie e dai parametri immunitari (rapporto granulociti-ialinociti, fagocitosi e stabilità delle membrane lisosomiali), spiegando il 18.1% della varianza totale osservata.

A) ESPOSIZIONE A MICROFIBRE



B) RECOVERY e HEAT STRESS postEXP

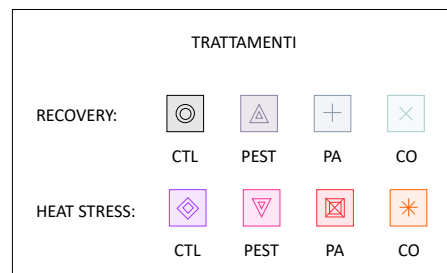
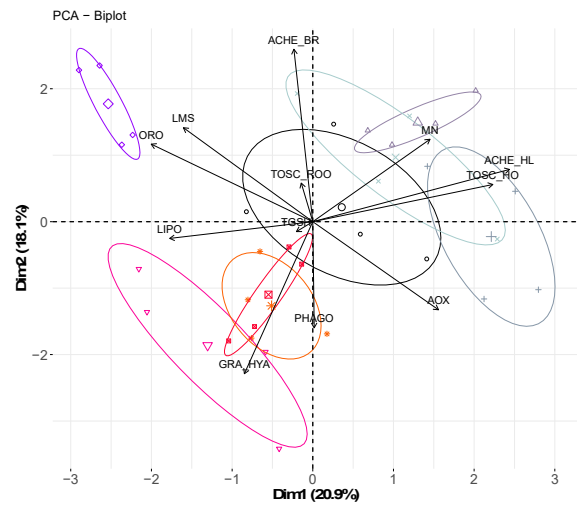


Figura 11 - Rappresentazione grafica bidimensionale dell'analisi delle componenti principali (PCA), elaborata per la fase di esposizione (A) e per il recovery ad entrambe le temperature (B). Le frecce indicano i parametri che hanno contribuito alla separazione lungo le rispettive componenti, e la lunghezza della freccia è proporzionale al contributo della variabile.

4.2 Risposte biologiche in *M. galloprovincialis* esposto a microplastiche

4.2.1 Parametri immunitari

La stabilità delle membrane lisosomiali è risultata significativamente ridotta negli organismi esposti ai trattamenti XS (20 – 50 μm) e S (50 – 100 μm), sebbene un trend in aumento sia stato osservato nei mitili sottoposti ai trattamenti M (100 – 250 μm) e L (250 – 500 μm), ma in maniera non significativa (Fig. 12A).

Non vi è stata alcuna variazione statisticamente significativa tra i vari trattamenti sia per quanto riguarda il rapporto granulociti - ialinociti ($p = 0.99$) che per il tasso di fagocitosi ($p = 0.08$) (Fig. 12B e 12C).

Infine, un aumento statisticamente significativo ($p < 0.01$) è stato osservato nella frequenza dei micronuclei negli organismi esposti al trattamento L (250 – 500 μm) e XL (500 – 1000 μm) e in maniera meno significativa nei mitili sottoposti ai trattamenti XS (20 – 50 μm), S (50 – 100 μm) e M (100 – 250 μm) (Fig. 12D).

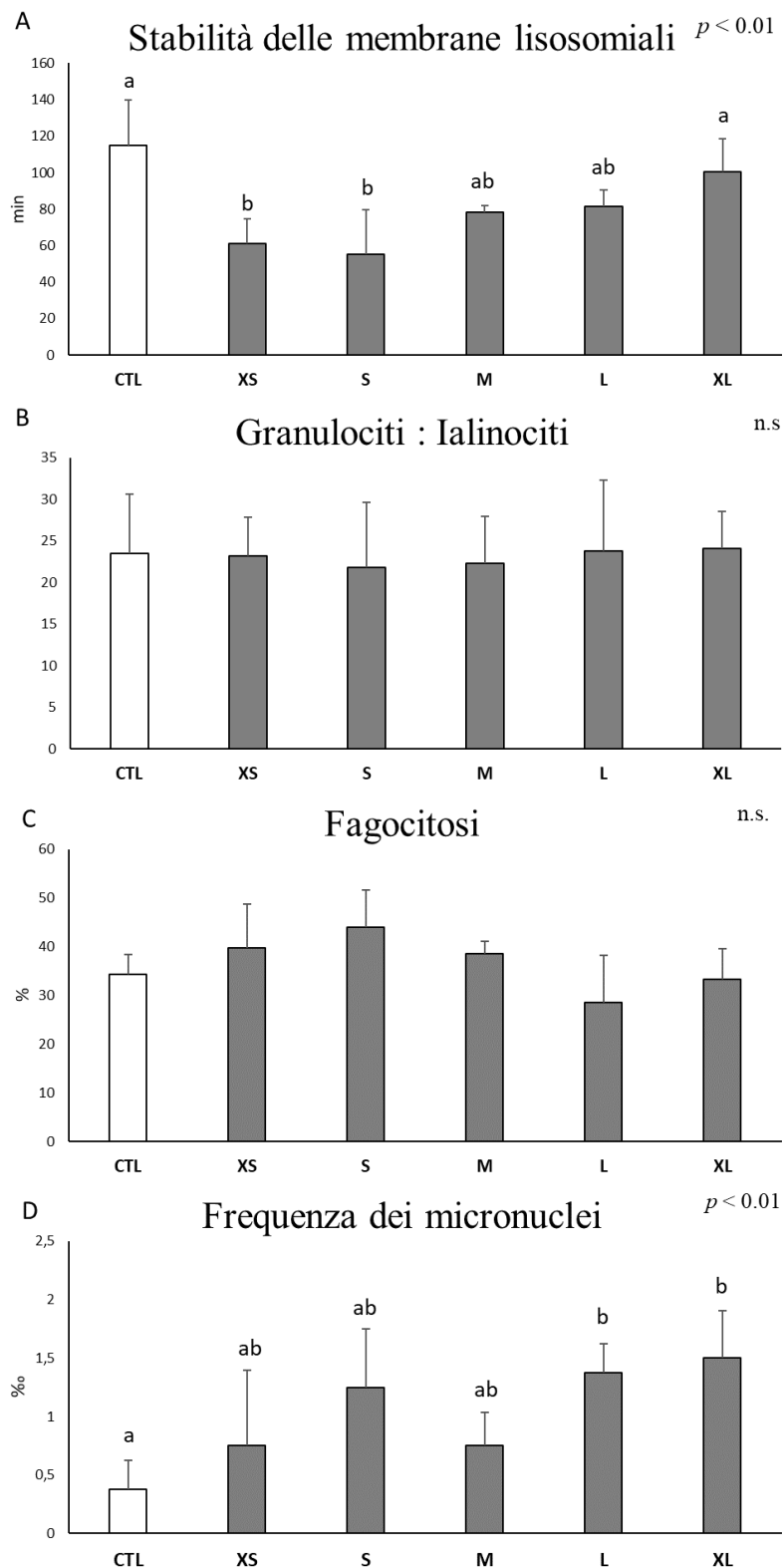


Figura 12 - Parametri immunitari misurati negli emociti di mitili esposti (Controllo – CTL; XS: 20 – 50 μm ; S: 50 – 100 μm ; M: 100 – 250 μm ; L: 250 – 500 μm ; XL: 500 – 1000 μm): stabilità delle membrane lisosomiali (A), rapporto granulociti - ialinociti (B), fagocitosi (C) e frequenza dei micronuclei (D). I valori sono espressi come media \pm deviazione standard ($n = 4$).

4.2.2 Attività enzimatica dell'acetilcolinesterasi

L'attività dell'acetilcolinesterasi nell'emolinfa non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i vari trattamenti (Fig. 13A).

Per quanto riguarda l'attività di questo enzima nelle branchie, negli organismi esposti è stata osservata un'induzione di questo enzima rispetto al gruppo di controllo (CTL), significativo per il trattamento M (100 – 250 μm) e in maniera minore per i trattamenti S (50 – 100 μm) ed L (250 – 500 μm) (Fig. 13B).

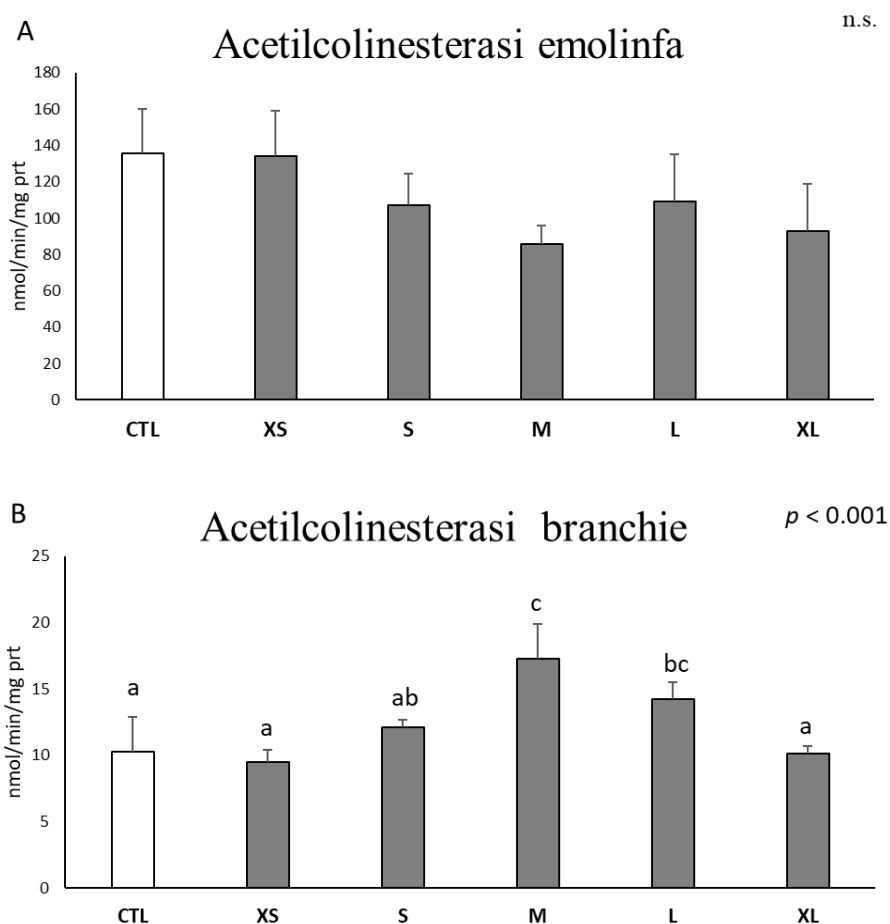


Figura 13 - Attività enzimatica dell'acetilcolinesterasi misurata nell'emolinfa (A) e nelle branchie (B) di mitili di mitili esposti (Controllo – CTL; XS: 20 – 50 μm ; S: 50 – 100 μm ; M: 100 – 250 μm ; L: 250 – 500 μm ; XL: 500 – 1000 μm). I valori sono espressi come media \pm deviazione standard (n = 4)

4.2.3 Analisi delle componenti principali

L'analisi delle componenti principali ha rivelato una chiara separazione tra organismi esposti e non esposti a microplastiche, con ulteriore separazione in funzione della taglia: la separazione più marcata è stata osservata tra gli organismi di controllo e quelli esposti a microplastiche di taglia S e M.

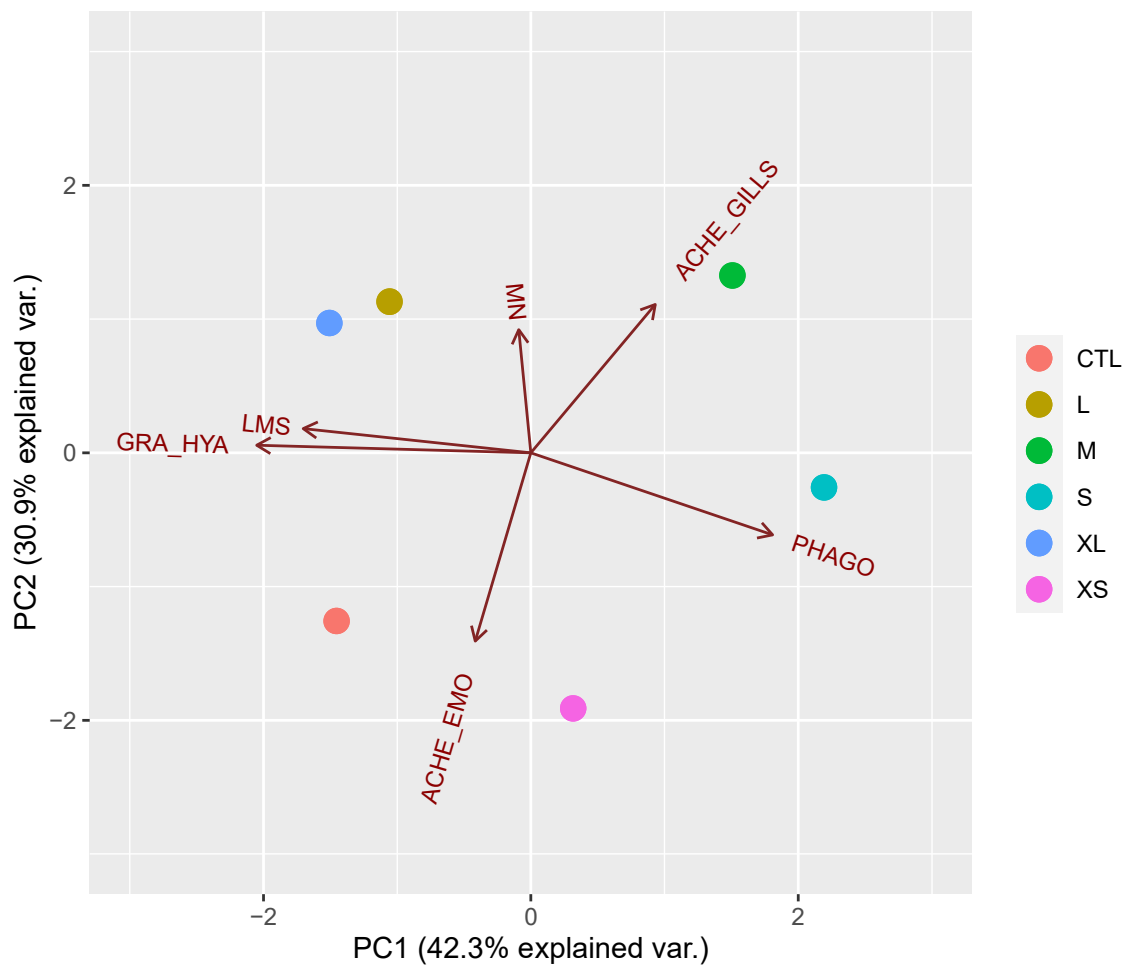


Figura 14 - Visualizzazione grafica dell'analisi delle componenti principali (PCA).

Capitolo 5

DISCUSSIONE

5.1 Effetti dell'esposizione a microfibre di diversa natura

Recentemente, diversi studi ambientali hanno confermato come le microfibre siano ampiamente presenti in ambiente marino, sebbene queste possano essere sia di origine sintetica (ad esempio poliammide, poliestere e poliacrilato) che naturali (di origine animale, come la chitina, o vegetale, come cotone e lino), ponendo l'attenzione della comunità scientifica su questa problematica. Tuttavia, indipendentemente della loro origine, sono ancora poco chiari i meccanismi attraverso cui le microfibre possono impattare sugli organismi marini. Pertanto, obiettivo di questo studio è stato quello di valutare gli effetti dell'esposizione a microfibre sintetiche e naturali nel mitilo mediterraneo *M. galloprovincialis*, e discriminare eventuali differenze legate alla tipologia di microfibra.

Nei bivalvi, gli emociti sono coinvolti in numerosi processi biologici, svolgono un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria e nella regolazione neuroendocrina (Caraville e Pal, 1995; Blaise *et al.*, 2002), e rappresentano una delle principali popolazioni cellulari coinvolte nella risposta a condizioni di stress (Melagoli *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Bayne, 1990; Pipe 1992). Sulla base delle caratteristiche morfologiche e funzionali, gli emociti possono essere

divisi in due sottopopolazioni, i granulociti e gli ialinociti: i primi sono grandi, abbondanti, presentano pseudopodi e sono dotati di un citoplasma ricco di numerosi granuli di origine lisosomiale (da cui il nome), coinvolti nei processi di fagocitosi di particelle esogene, gli ialinociti invece hanno dimensioni minori e sono meno abbondanti, sprovviste di pseudopodi e di granuli, e sono maggiormente coinvolte nei processi ematopoietici e nei meccanismi di riparazione (Caraville e Pal, 1995).

Nel presente studio, l'esposizione a microfibre di qualsiasi tipologia non ha causato variazioni nel rapporto tra le due popolazioni emocitarie, confermando i risultati ottenuti da Cole *et al.* (2020) su mitili esposti a microfibre di poliammide ed estendendoli anche al poliestere e al cotone.

D'altra parte, l'esposizione a MFs (sia naturali che sintetiche) ha causato una riduzione della fagocitosi nei granulociti, suggerendo un effetto sulla funzionalità di questa tipologia cellulare, ipoteticamente dovuto ad un disturbo prettamente fisico. Questo d'altra parte potrebbe essere accompagnato da un disturbo chimico causato dalle microfibre di origine sintetica, come evidenziato dalla ridotta stabilità delle membrane lisosomiali negli organismi esposti a PA ed in misura minore in quelli esposti a PEST e PA. Considerando l'importanza del comparto lisosomiale per la funzionalità degli emociti, questi risultati rafforzano l'ipotesi che i polimeri plastici siano in grado di alterare la risposta

immunitaria: effetti simili sono stati osservati negli emociti di *Tegillarca granosa* esposta per 4 giorni a 1 mg L^{-1} di microparticelle di polistirene di dimensioni di $30 \text{ }\mu\text{m}$ e 500 nm (Tang *et al.*, 2020), e negli emociti di *M. galloprovincialis* esposti *in vitro* a nanoparticelle di PS 50 nm (Canesi *et al.* 2016). Al contrario, tali effetti non sono stati evidenziati da Cole *et al.* (2020) in *Mytilus* spp. esposti per 7 giorni a 500 ng mL^{-1} MFs di PA.

L'ipotesi del limitato disturbo chimico è supportata dall'assenza di variazioni nella frequenza di micronuclei, confermando la ridotta attività genotossica delle microfibre di PA osservata da Cole *et al.*, 2020 ed estendendo il concetto a microfibre di PEST e CO.

I risultati ottenuti per l'attività dell'enzima ACOX al termine dell'esposizione confermano come gli organismi siano particolarmente suscettibili alle microfibre di poliammide, che inibiscono in maniera significativa la funzionalità di questo enzima coinvolto nei processi di beta-ossidazione degli acidi grassi (Gorbi *et al.*, 2012). Tale effetto assume una rilevanza ancora maggiore se considerato insieme ai risultati osservati in termini di accumulo di lipidi neutri, che aumentano sensibilmente negli organismi esposti a PA, suggerendo un disturbo del metabolismo lipidico come precedentemente osservato in giovanili *Calanus finmarchicus* esposto per 6 giorni a microfibre di PA (Cole *et al.*, 2019), e rafforzando il concetto che sia la forma che la

composizione polimerica giocano un ruolo fondamentale nella tossicità delle MPs.

Sebbene spesso i polimeri plastici siano stati suggeriti come promotori di effetto neurotossici (Prokić *et al.*, 2019), in questo studio non sono stati evidenziati effetti a carico dell'attività dell'enzima AChE al termine dell'esposizione, sia nell'emolinfa che nella branchia. Risultati simili sono stati ottenuti da Choi *et al.*, 2021 in mitili esposti a microfibre di PET di lunghezza 100 µm, i quali invece avevano esibito un aumento dell'attività di questo enzima quando esposti a microfibre di PET di lunghezza minore, suggerendo nuovamente la pari importanza di polimero e dimensioni per la valutazione degli effetti tossici.

L'esposizione a contaminanti e composti xenobiotici è spesso associata ad un'alterazione dello stato redox cellulare (Regoli e Giuliani, 2014). In queste condizioni le cellule attivano dei meccanismi di difesa che includono molecole ed enzimi antiossidanti atti ad inattivare le specie reattive dell'ossigeno (ROS), prevenendo così l'insorgenza di danni alle principali macromolecole e quindi agli organelli e alla loro funzionalità.

Tra gli antiossidanti, il glutathione ricopre un ruolo fondamentale, funzionando sia da co-fattore per numerosi complessi enzimatici sia da scavenger a basso peso molecolare direttamente coinvolto nei processi di inattivazione dei ROS

(CIT). Le microfibre utilizzate in questa esposizione hanno mostrato limitati effetti a carico del contenuto di glutatione totale, che è risultato moderatamente ridotto negli organismi esposti a CO. Tali risultati confermano in parte il potere pro-ossidante delle microplastiche, come ad esempio l'induzione di ROS osservata da Choi *et al.*, 2021 in *M. galloprovincialis* esposto a PET-MFs di 50 μm (100 mgL^{-1}), ma soprattutto evidenziano la suscettibilità delle difese antiossidanti nei confronti delle microfibre, come precedentemente osservato da Cole *et al.*, 2020 in *Mytilus* spp. dopo 24h di esposizione a microfibre di PA. Se infatti da un lato il contenuto di TGSH risulta principalmente ma non esclusivamente diminuito negli organismi esposti a CO, è ancor più interessante l'aumentata capacità antiossidante totale nei confronti dei radicali perossilici ed idrossilici negli organismi esposti a PA, che conferma l'elevata sensibilità dei mitili a questa microfibra sintetica e la necessità di contrastare un disturbo potenziando la capacità antiossidante totale. Tale evidenza è in accordo con il trend di accumulo di lipidi neutri osservato in questi organismi, probabilmente dovuto a necessità energetiche tese a supportare i meccanismi di difesa. Inoltre, un'aumentata pressione ossidativa, spiegherebbe, almeno parzialmente, la perdita di stabilità lisosomiale osservata negli emociti, provocata dall'alterazione dello stato redox cellulare e che culmina in una minore capacità di fagocitosi dimostrando come la risposta a stress esogeni sia

basata su sofisticati meccanismi di regolazione neuroendocrina- immunitaria e mediata da sistema antiossidante (Nardi *et al.*, 2021).

L'aumentata pressione ossidativa non ha d'altra parte causato un accumulo di lipofuscina, prodotto finale dei processi di perossidazione lipidica: tale effetto potrebbe essere dovuto in parte ad una buona capacità di contrastare i danni ossidativi, dall'altra alla durata e intensità dell'esposizione che non sarebbe in grado di produrre effetti cellulari in breve tempo.

Al termine della fase di esposizione, l'analisi delle componenti principali ha confermato come la PA sia la microfibra in grado di produrre i maggiori effetti tra quelle testate, supportata dalle variazioni della stabilità delle membrane lisosomiali, fagocitosi, attività ACOX, contenuto TGSH, capacità antiossidante totale e accumulo di lipidi neutri, supportando l'importanza della identificazione della natura polimerica di questi contaminanti emergenti nei processi di valutazione di impatto.

5.2 Capacità di recupero e Suscettibilità ad uno stress aggiuntivo

Contestualmente agli effetti osservabili al termine di una fase di esposizione, è necessario comprendere se tali effetti possano essere riscontrati o addirittura insorgere anche dopo un periodo di recupero dall'esposizione ad una condizione di stress. Inoltre, gli organismi marini vivono in un ambiente

caratterizzato dalla presenza di stress multipli (come acidificazione degli oceani, aumento della temperatura, variazioni di salinità, ipossia o anossia), ed è quindi necessario comprendere se i contaminanti possano alterare la suscettibilità degli organismi ad altri fattori di stress, al fine di migliorare la comprensione degli impatti e del rischio associato. (Autogoda *et al.*, 2021; Bertucci *et al.*, 2021; Hankins *et al.*, 2021; Nardi *et al.*, 2021).

Pertanto, un ulteriore obiettivo di questo studio è stato quello di analizzare la capacità di recupero dei mitili per capire se fossero in grado di ritornare a una condizione ottimale dopo un periodo di recovery di 7 giorni dall'esposizione a microfibre, in acqua non contaminata. In aggiunta, il terzo e ultimo obiettivo di questo esperimento è stato quello di comprendere se la pre-esposizione a MFs rendesse gli organismi più suscettibili ad un secondo stress, identificato in una condizione di heatwave.

Complessivamente la funzionalità della componente cellulare del sistema immunitario dei mitili ha mostrato una discreta capacità di recupero, supportata dal tasso di fagocitosi che torna a livelli comparabili a quelli degli organismi di controllo dopo 7 giorni di recovery; d'altra parte questa capacità non è stata osservata per la stabilità delle membrane lisosomiali, che risultano impattate da microfibre sintetiche nonostante il periodo di recovery. Inoltre, tali effetti sono stati esacerbati dall'aumento di temperatura negli organismi esposti a tutte le

tipologie di MFs, nei quali contestualmente è stato osservato un aumento del rapporto tra granulociti e ialinociti e della capacità fagocitaria. Sebbene questo possa far pensare a una maggior efficienza di fagocitosi promossa dall'aumento di temperatura, è verosimile che lo stress termico abbia stimolato meccanismi di proliferazione dei granulociti, come anche osservato da Rahman *et al.*, 2018; tali risultati sono in contrasto con gli effetti osservati in *Crassostrea virginica*, *Mytilus coruscus* e *Mytilus galloprovincialis*, i quali avevano mostrato una marcata diminuzione dei granulociti e conseguentemente della fagocitosi in seguito a stress termico (Hégaret *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2016; Nardi *et al.*, 2021).

I limitati effetti genotossici delle MFs osservati durante la fase di esposizione sono stati confermati dall'assenza di variazioni della frequenza dei micronuclei nel periodo post-esposizione ad entrambi i regimi di temperatura.

È interessante come invece l'assenza di effetti neurotossici osservata al termine dell'esposizione a MFs non sia stata confermata al termine del recovery, dove è stato osservato un aumento dell'attività dell'AChE nell'emolinfa degli organismi esposti a microfibre di PA e nelle branchie di quelli esposti a PEST. Questi risultati permettono di ipotizzare che gli effetti indotti dall'esposizione a questi contaminanti possano manifestarsi anche a distanza di tempo; inoltre l'aumento di temperatura ha provocato una diminuzione dell'attività di questo

enzima in tutti gli organismi, in particolar modo nelle branchie degli organismi esposti a MFs, suggerendo il peggioramento di una condizione non ottimale causata dalle microfibre.

Gli effetti osservati a carico dell'attività dell'AChE supportano in parte gli effetti osservati a carico del sistema immunitario: l'AChE contribuisce ad un'efficiente risposta immunitaria, regolando i livelli di neurotrasmettitori coinvolti capaci di modulare i processi infiammatori e la risposta immunitaria (Greco *et al.*, 2010; Nardi *et al.*, 2021). Se però da un lato lo stress termico ha causato una inibizione dell'AChE, dall'altro sembra aver stimolato la proliferazione di granulociti: è possibile ipotizzare che i mitili tentino di sopperire alle disfunzionalità del sistema neuro-endocrino attraverso un potenziamento della risposta immunitaria mediata dagli emociti. Tale ipotesi è supportata dal fatto che lo stress termico cui sono stati sottoposti i mitili, risulta comunque moderato e ampiamente nel range delle temperature sperimentate dai mitili in Adriatico nel periodo estivo.

I mitili esposti a microfibre hanno mostrato una buona capacità di recupero anche per quanto riguarda l'attività dell'ACOX, ritornata comparabile a quella degli organismi di controllo al termine del periodo di recovery; ciò nonostante, gli organismi esposti a PA e CO hanno mostrato livelli di lipidi neutri

sensibilmente più bassi al termine del recovery, ipoteticamente consequenziale a meccanismi di compensazione.

Inoltre, l'aumento di temperatura ha causato una inibizione dell'attività dell'ACOX negli organismi di controllo seguita da un accumulo di lipidi neutri; l'effetto opposto è stato invece osservato negli organismi precedentemente esposti a MFs, suggerendo effetti sinergici tra i due stress, che causano disordini del metabolismo lipidico, probabilmente dovuti ad un'aumentata pressione ossidativa in seguito all'esposizione a MFs.

Difatti, il contenuto di glutatione totale (TGSH) è aumentato in risposta allo stress termico negli organismi precedentemente esposti a PA, suggerendo la persistenza di un lieve disturbo del bilancio redox. D'altra parte, gli effetti causati da questo polimero sulla capacità antiossidante totale nei confronti del radicale perossilico (TOSC ROO•) e idrossilico (TOSC HO•) durante la fase di esposizione, non sono stati osservati al termine del recovery, suggerendo una buona capacità di recupero. Tuttavia, la diminuzione dei livelli di TOSC HO• negli organismi soggetti a stress termico, suggerisce un coinvolgimento attivo per contrastare un potenziale incremento dello stress ossidativo causato dall'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno in eccesso (ROS) in risposta all'aumento di temperatura (Benedetti *et al.*, 2022). D'altra parte, questo declino può anche essere indicativo di una ridotta competenza per la

neutralizzazione dei ROS, rendendo gli organismi più soggetti a danno ossidativo (Magara *et al.*, 2018). Infatti, negli organismi esposti a microfibre, ed in particolar modo in quelli esposti a cotone, è stato osservato un aumento di lipofusina al termine della fase di recovery, confermando l'ipotesi di possibili effetti posticipati dell'esposizione a tali contaminanti a carico dei processi ossidativi.

L'analisi delle componenti principali (PCA) ha rivelato una chiara separazione tra le due condizioni di recovery influenzata dalla temperatura, una buona capacità di recupero nei mitili sottoposti a recovery a temperatura di controllo e una chiara discriminazione nello scenario di stress termico tra organismi pre-esposti a microfibre e quelli non esposti (Fig. 11B).

Ciò evidenzia una moderata capacità delle MFs di influenzare la suscettibilità allo stress termico, con interazioni sinergiche tra i due stress che influenzano il complesso network di cross-talk tra sistema neuroendocrino, immunitario e antiossidante, fondamentali nella modulazione delle risposte e della suscettibilità a stress esogeni in *Mytilus galloprovincialis*.

5.3 Effetto taglia-dipendente di frammenti di PE

A causa della loro persistenza e della presenza ubiquitaria negli oceani, le microplastiche rappresentano una delle principali minacce per gli organismi e gli ecosistemi marini (Alimba e Faggio, 2019; Strungaru *et al.*, 2019). La distribuzione delle MPs in colonna d'acqua, la biodisponibilità e gli effetti associati alla interazione con il biota possono essere differenti in base alla varietà di forme, dimensioni e polimeri che caratterizzano questa particolare classe di contaminati emergenti (Ma *et al.*, 2020).

Il secondo esperimento oggetto della presente tesi ha voluto quindi concentrarsi sugli effetti legati alla dimensione delle microplastiche in *M. galloprovincialis*, con l'obiettivo di evidenziare una eventuale risposta biologica taglia-dipendente.

Sono state per questo selezionate 5 classi dimensionali nel range di definizione delle MPs scegliendo come modello frammenti di polietilene (PE), poiché rappresentano rispettivamente la forma e la tipologia di polimero plastico più frequentemente rilevate negli ecosistemi marini e in tutte le matrici, organismi compresi. (Eriksen *et al.*, 2014; Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012; Reisser *et al.*, 2015; Suaria *et al.*, 2016; Fossi *et al.*, 2020; Baini *et al.*, 2018). In particolare, diversi studi hanno confermato i frammenti di PE come la tipologia di microplastica

maggiormente riscontrata nei tessuti di bivalvi, come *M. galloprovincialis*, *Ruditapes decussatus* e *Crassostrea gigas*, (Abidli *et al.* 2019).

Per poter valutare in maniera quantitativa l'effetto delle diverse taglie è stato scelto un set di biomarker di parametri neuro-immunitari vista la loro elevata responsività agli stress ambientali (Rahman *et al.*, 2019).

I risultati ottenuti hanno mostrato una variazione della stabilità delle membrane lisosomiali negli organismi esposti alle MPs di PE, confermando la validità di questo parametro come biomarker di esposizione a sostanze esogene: i lisosomi, infatti, rappresentano i principali siti per il sequestro intracellulare e la detossificazione di composti xenobiotici, risultando particolarmente sensibili anche alle microplastiche (Von Moss *et al.*, 2010; Pittura *et al.*, 2018; Capolupo *et al.*, 2021). È stata inoltre dimostrata una risposta taglia dipendente, infatti, una forte riduzione della stabilità delle membrane lisosomiali è stata osservata negli organismi esposti alle taglie più piccole di MPs (XS: 20 – 50 μm e S: 50 – 100 μm). Lo stesso effetto è stato riscontrato in organismi esposti a MPs di PE dello stesso range dimensionale delle taglie in questione (MPs XS e S) (Von Moos *et al.*, 2012; Pittura *et al.*, 2018).

L'effetto prodotto dalle particelle di taglia minore (MPs-XS, -S) rispetto a quelle più grandi (MPs-M, -L, -XL) potrebbe essere dovuto al fatto che le particelle più piccole hanno delle dimensioni nel range alimentare dei mitili e

di conseguenza possono essere più facilmente internalizzate, circolare con più probabilità nell'emolinfa e provocare alterazioni nei parametri immunitari (es. destabilizzazione delle membrane lisosomiali). È stato dimostrato che *M. edulis* e *Crassostrea virginica* accumulano nella ghiandola digestiva maggiori quantità di particelle di piccole dimensioni (100 nm) rispetto a quelle di dimensioni maggiori (10 µm), per via dell'assenza di meccanismi di selezione (Ward e Kach 2009). Diversi studi hanno inoltre dimostrato come al diminuire delle dimensioni delle MPs si osservi una destabilizzazione lisosomiale complessivamente più marcata, tantoché gli effetti maggiori si osservano in organismi esposti a nanoplastiche (NPs), cioè particelle di plastica minori di 1µm (Capolupo *et al.*, 2021; Greven *et al.*; 2016; Shi *et al.*,2020; Auguste *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2020). Gli studi suggeriscono come le NPs possano migrare all'interno dei lisosomi causando disfunzioni quali il blocco delle vie degradative o minor stabilità della membrana lisosomiale, riducendo così l'efficienza della risposta immunitaria a stress esogeni (Wang *et al.*, 2018).

Al contrario le particelle di taglia medio-grande (100-500µm) potrebbero accumularsi a livello branchiale e causare un disturbo fisico al tessuto, nel quale infatti è stata osservata un'induzione dell'AChE: tale effetto, potrebbe essere collegato alla necessità di attivare risposte immunitarie per favorire l'escrezione delle particelle estranee o attivare meccanismi di riparazione dei

danni al tessuto, vista l'importante connessione tra il sistema neuroendocrino e quello immunitario nei bivalvi (Rahman *et al.*, 2019). In questo contesto però, sia la composizione delle popolazioni emocitarie sia la loro funzionalità non sembrano essere modulate in funzione della taglia delle particelle cui sono state esposte, suggerendo nuovamente come l'insorgenza di alterazioni cellulari e funzionali possa essere asincrona rispetto a quelle molecolari-biochimiche; inoltre, sebbene sia stato valutato il rapporto tra sub-popolazioni di emociti, la conta totale degli emociti non è stata oggetto di questa indagine: in questo senso, l'assenza di effetti nelle proporzioni di composizione del pool di emociti potrebbe mascherare un effetto a carico del numero totale di cellule, come osservato per *T. granosa* in seguito all'esposizione a particelle di PS di 30 μm e 500 nm (Shi *et al.*, 2020), e in *Mytilus* spp. esposto a particelle di PS di 2 e 6 μm (Paul-Pont *et al.*, 2016).

D'altra parte, la frequenza dei micronuclei ha invece mostrato un trend opposto alla stabilità delle membrane lisosomiali, raggiungendo i valori più alti negli organismi esposti a particelle di taglia maggiore (L: 250 – 500 μm e XL: 500 – 1000 μm), che rientrano comunque in un range di variabilità mostrato da organismi campionati in siti esenti da impatti ambientali (Gorbi *et al.*, 2008) Tale effetto potrebbe essere in parte dovuto a un maggiore tasso di

proliferazione cellulare piuttosto che a un effetto genotossico delle particelle (Nardi *et al.*, 2017) .

In generale, l'analisi delle componenti principali (PCA) ha comunque rivelato una chiara separazione tra organismi esposti e non esposti a microplastiche, con ulteriore separazione in funzione della taglia: la separazione più marcata è stata osservata tra gli organismi di controllo e quelli esposti a microplastiche di taglia S e M, guidata principalmente da variazioni dell'attività dell'AChE nelle branchie e nell'emolinfa e dalla fagocitosi.

Vista l'importanza che ricopre il sistema immunitario nella risposta agli stress, attuata tramite un complesso cross-talk di cellule, molecole segnale e processi biochimici e interazioni con il sistema endocrino, i risultati di questo esperimento hanno evidenziato gli impatti delle MPs di taglia <250 μm e le possibili implicazioni per effetti a lungo termine di queste, sottolineando la suscettibilità del sistema neuroendocrino-immunitario dei bivalvi. Tali impatti potrebbero poi progredire verso danni cellulari e processi di apoptosi, alterazione del bilancio redox e dell'immunocompetenza (Hirt *et al.*, 2020; Teng *et al.*, 2020).

Capitolo 6

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti da questa attività sperimentale hanno permesso un avanzamento delle conoscenze sui meccanismi alla base degli effetti biologici causati dall'esposizione a microfibre tessili e microplastiche di classi di taglia differenti, sottolineando come la forma, la natura polimerica e le dimensioni siano fattori direttamente correlabili con diversi gradi di impatto.

Visti i crescenti livelli di microplastiche in ambiente, i risultati supportano le recenti evidenze circa la necessità di dare un maggiore peso alle caratteristiche di questi contaminanti, come forma, natura polimerica e taglia oltre che a considerarne la presenza e la quantità nelle matrici abiotiche e biotiche nel processo di valutazione del rischio associato, in quanto queste ne influenzano in maniera determinante sia il destino che gli effetti negli organismi.

Sebbene le microfibre ritrovate in ambiente siano nella maggior parte di origine naturale, le microfibre sintetiche sono in grado di produrre effetti ben più severi come mostrato dai risultati ottenuti; questo non esclude la necessità di approfondire le conoscenze sulle possibili conseguenze dell'esposizione a microfibre naturali, come supportato dalle risposte misurate negli organismi esposti a microfibre di cotone. Inoltre, entrambe le tipologie di microfibre sono state comunque in grado di alterare la suscettibilità degli organismi allo stress

termico, ed in un contesto di cambiamenti climatici globali gli effetti osservati implicano la necessità di valutare questi impatti nell'ottica di possibili sinergie tra stress multipli.

In conclusione, per una corretta valutazione del rischio associato alla presenza di questi contaminanti emergenti in ambiente, è necessario che i futuri approcci sperimentali e gestionali tengano in considerazione le loro caratteristiche intrinseche, come forma, età, dimensioni e tipologia di polimero, in quanto in grado di impattare gli organismi e gli ecosistemi marini con magnitudo, modalità e target di effetto differente.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Abidli S., Pinheiro M., Lahbib Y., Neuparth T., Santos M. M., Trigui El Menif N. (2021). Effects of environmentally relevant levels of polyethylene microplastic on *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia): filtration rate and oxidative stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 28 (21): 26643-26652.

Alimba C. G., Faggio, C. (2019). Microplastics in the marine environment: current trends in environmental pollution and mechanisms of toxicological profile. *Environmental toxicology and pharmacology*, 68: 61-74.

Allen J. I., Moore, M. N. (2004). Environmental prognostics: is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation?. *Marine Environmental Research*, 58(2-5): 227-232.

Almeida F., Nunes, B. (2019). Effects of acetaminophen in oxidative stress and neurotoxicity biomarkers of the gastropod *Phorcus lineatus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(10): 9823-9831.

Anbumani S., Kakkar, P. (2018). Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(15): 14373-14396.

Anderson A., Andrady, A., Arthur C., Baker, J., Bouwman, H., Gall, S., Hildalgo-Ruz V., Köhler A., Lavender Law K., Leslie H. A., Kershaw P., Pahl, S., Potemra, J., Ryan P., Joon S.W., Thompson R., Takada H., Turra A., Vethaak A.D., Wyles K. (2015). Sources, fate and effects of microplastics in the environment: a global assessment. *International Maritime Organization*, 90.

Auguste M., Balbi T., Ciacci C., Canonico B., Papa S., Borello A., Vezzulli L., Canesi, L. (2020). Shift in immune parameters after repeated exposure to nanoplastics in the marine bivalve *Mytilus*. *Frontiers in immunology*, 1: 426.

Avio C.G., Gorbi S., Milan M., Benedetti M., Fattorini D., D'Errico G., Pauletto M., Bargelloni L., Regoli F. Pollutants bioavailability and

toxicological risk from microplastics to marine mussels. (2015). *Environmental Pollution*, 198: 211-222.

Baini M., Fossi M. C., Galli M., Caliani I., Campani T., Finoia M. G., Panti C. (2018). Abundance and characterization of microplastics in the coastal waters of Tuscany (Italy): the application of the MSFD monitoring protocol in the Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 133: 543-552.

Barboza L. G. A., Vieira L. R., Guilhermino, L. (2018). Single and combined effects of microplastics and mercury on juveniles of the European seabass (*Dicentrarchus labrax*): changes in behavioural responses and reduction of swimming velocity and resistance time. *Environmental Pollution*, 236: 1014-1019.

Bargagli R., Monaci F., Sanchez-Hernandez, J. C., Cateni, D. (1998). Biomagnification of mercury in an Antarctic marine coastal food web. *Marine Ecology Progress Series*, 169: 65-76.

Batel A., Borchert F., Reinwald H., Erdinger L., Braunbeck, T. (2018). Microplastic accumulation patterns and transfer of benzo [a] pyrene to adult zebrafish (*Danio rerio*) gills and zebrafish embryos. *Environmental Pollution*, 235: 918-930.

Benedetti M., Giuliani M. E., Mezzelani M., Nardi A., Pittura L., Gorbi S., Regoli F. (2022). Emerging environmental stressors and oxidative pathways in marine organisms: Current knowledge on regulation mechanisms and functional effects. *Biocell*, 46(1): 37.

Bertucci J. I., Bellas J. (2021). Combined effect of microplastics and global warming factors on early growth and development of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *Science of The Total Environment*, 782, 146888.

Bessa F., Frias J., Kogel T., Lusher A, Andrade J.M., Antunes J., Sobral P., Pagter E., Nash R., O'Connor I., Pedrotti M.L., Kerros M.E., León V., Tirelli V., Suaria G., Lopes C., Raimundo J., Caetano M., Gago J., Viñas L., Carretero O., Magnusson K., Granberg M., Dris R., Fischer M., Scholz-Böttcher B., Muniategui S., Grueiro G., Fernández V., Palazzo L., De Lucia A., Camedda A., Avio C.G., Gorbi S., Pittura L., Regoli F., Gerdt G. (2019). Harmonized

protocol for monitoring microplastics in biota. Deliverable 4.3. *JPI-Oceans BASEMAN project*.

Besseling E., Wegner A., Foekema E. M., Van Den Heuvel-Greve M. J., Koelmans A. A. (2013). Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Environmental science & technology*, 47(1): 593-600.

Blaise C., Trottier S., Gagné F., Lallement C., Hansen P. D. (2002). Immunocompetence of bivalve hemocytes as evaluated by a miniaturized phagocytosis assay. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 17(3): 160-169.

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.

Boerger C. M., Lattin G. L., Moore S. L., Moore, C. J. (2010). Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. *Marine pollution bulletin*, 60(12): 2275-2278.

Boisseaux P., Noury P., Thomas H., Garric, J. (2017). Immune responses in the aquatic gastropod *Lymnaea stagnalis* under short-term exposure to pharmaceuticals of concern for immune systems: Diclofenac, cyclophosphamide and cyclosporine A. *Ecotoxicology and environmental safety*, 139: 358-366.

Boucher J., Friot, D. (2017). Primary microplastics in the oceans: a global evaluation of *sources* (Vol. 10). Gland, Switzerland: Iucn.

Browne M. A., Niven S. J., Galloway T. S., Rowland S. J., Thompson R. C. (2013). Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current biology*, 23(23): 2388-2392.

Cajaraville M.P, Pal S.G. (1995). Morphofunctional Study of the Haemocytes of the Bivalve Mollusc *Mytilus galloprovincialis* with Emphasis on the Endolysosomal Compartment. *Cell structure and function*, 20: 355-367

- Canesi L., Ciacci C., Fabbri R., Balbi T., Salis A., Damonte G., Cortese V., Caratto V., Monopoli M.P., Dawson K., Bergami E., Corsi I. (2016). Interactions of cationic polystyrene nanoparticles with marine bivalve hemocytes in a physiological environment: Role of soluble hemolymph proteins. *Environmental research*, 150:73-81.
- Capolupo M., Valbonesi P., Fabbri E. (2021). A comparative assessment of the chronic effects of micro-and nano-plastics on the physiology of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nanomaterials*, 11(3): 649.
- Carbery M., O'Connor W., Palanisami, T. (2018). Trophic transfer of microplastics and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health. *Environment international*: 115, 400-409.
- Caruso G. (2019). Microplastics as vectors of contaminants. *Marine pollution bulletin*, 146: 921-924.
- Caruso G., Pedà C., Cappello S., Leonardi M., La Ferla R., Lo Giudice A., Maricchiolo G., Rizzo C., Maimone G., Rapazzo A.C., Genovese L., Romeo T. (2018). Effects of microplastics on trophic parameters, abundance and metabolic activities of seawater and fish gut bacteria in mesocosm conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 30067 -30083.
- Chen Q., Gundlach M., Yang S., Jiang J., Velki M., Yin D., Hollert, H. (2017). Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity. *Science of the total environment*, 584: 1022-1031.
- Chiodi O. E., Soraya M., Chijioke U. E., Pozi M. (2018). Feasting on microplastics: ingestion by and effects on marine organisms. *Aquatic biology*, 27: 93–106.
- Choi J. S., Kim K., Hong S. H., Park K. I., Park J. W. (2021). Impact of polyethylene terephthalate microfiber length on cellular responses in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 168, 105320.
- Cole M., Coppock R., Lindeque P.K., Altin D., Reed S., Pond D.W., Sørensen L., Galloway T.S., Booth A.M. (2019). Effects of Nylon Microplastic on

Feeding, Lipid Accumulation, and Moulting in a Coldwater Copepod. *Environmental Science and Technology*, 53: 7075–7082.

Cole M., Liddle C., Consolandia G., Dragoa C., Hirda C., Lindeque P.K., Gallowaya T.S. (2020). Microplastics, microfibrils and nanoplastics cause variable sub-lethal responses in mussels (*Mytilus* spp.). *Marine Pollution Bulletin*, 160.

Cole M., Lindeque P. K., Fileman E., Clark J., Lewis C., Halsband C., Galloway T. S. (2016). Microplastics alter the properties and sinking rates of zooplankton faecal pellets. *Environmental science & technology*, 50(6): 3239-3246.

Cole M., Lindeque P., Fileman E., Halsband C., Galloway T. S. (2015). The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Environmental science & technology*, 49(2): 1130-1137.

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

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

Coyle R., Hardiman G., K O'Driscoll (2020). Microplastics in the marine environment: A review of their sources, distribution processes, uptake and exchange in ecosystems. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*. 2: 100010.

Cozar A., Echevarria F., Gonzales – Gordillo J.I., Irigoien X., Ubeda B., Hernandez – Leon S., Palma A.T., Navarro S., Garcia-deLomas J., Ruiz A., Fernandez-de-Puelles M.L., Duarte C.M. (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 10239 – 10244.

Crain C. M., Kroeker K., Halpern, B. S. (2008). Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology letters*, 11(12): 1304-1315.

De Sá L. C., Luís L. G., Guilhermino L. (2015). Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. *Environmental pollution*, 196: 359-362.

Deepak G., Pankaj K. T., Arvind A., Nitin C., Meenu A., S. K. Singh e Sunil G. (2021). The impact of microplastics on marine environment: A review, *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 16: 100552.

Depledge M. H., Fossi, M. C. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology*, 3(3): 161-172.

Détrée C., Gallardo-Escárate C. (2018). Single and repetitive microplastics exposures induce immune system modulation and homeostasis alteration in the edible mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & shellfish immunology*, 83: 52-60.

Doyle M. J., Watson W., Bowlin N. M., Sheavly, S. B. (2011). Plastic particles in coastal pelagic ecosystems of the Northeast Pacific ocean. *Marine environmental research*, 71(1): 41-52.

Egbeocha C. O., Malek S., Emenike C. U., Milow, P. (2018). Feasting on microplastics: ingestion by and effects on marine organisms. *Aquatic Biology*, 27: 93-106.

Ellen B., Anna W., Edwin M. F., Martine J. van D. H. G. and Albert A. K., (2013). Effects of Microplastic on Fitness and PCB Bioaccumulation by the Lugworm *Arenicola marina* (L.). *Environmental Science Technology*, 47, 1: 593–600.

Ellman G. L., Courtney K. D., Andres Jr V., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2): 88-95.

Enyoh, C. E., Shafea, L., Verla A. W., Verla E. N., Qingyue, W., Chowdhury T., Paredes M. (2020). Microplastics exposure routes and toxicity studies to ecosystems: an overview. *Environmental analysis, health and toxicology*, 35(1).

Eriksen M., Lebreton L. C., Carson H. S., Thiel M., Moore C. J., Borerro J. C., Galgani F., Ryan P.G., Reisser, J. (2014). Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PloS one*, 9(12): 111913.

Fonte E., Ferreira P., Guilhermino, L. (2016). Temperature rise and microplastics interact with the toxicity of the antibiotic cefalexin to juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): post-exposure predatory behaviour, acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation. *Aquatic toxicology*, 180: 173-185.

Fossi M. C., Pedà C., Compa M., Tsangaris C., Alomar C., Claro F., Ioakeimidis C., Galgani F., Hema T., Deudero S., Romeo T., Battaglia P., Andaloro F., Caliani I., Casini S., Panti C., Baini M. (2018). Bioindicators for monitoring marine litter ingestion and its impacts on Mediterranean biodiversity. *Environmental Pollution*, 237: 1023-1040.

Frenzilli G., Nigro M., Lyons, B. P. (2009). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation research/reviews in mutation research*, 681(1): 80-92.

Frias J. P. G. L., Nash R. (2019). Microplastics: finding a consensus on the definition. *Marine pollution bulletin*. 138: 145-147.

Geyer R., Jambeck J. R., Law K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science advances*, 3(7): 1700782.

Giuliani M.E, Accoroni S., Mezzelani M., Lugarini F., Bacchiocchi S., Siracusa M., Tavoloni T., Piersanti A., Totti C., Regoli F., Rossi R., Zigone A., Gorbi S. (2019). Biological Effects of the Azaspiracid-Producing Dinoflagellate *Azadinium dexteroporum* in *Mytilus galloprovincialis* from the Mediterranean Sea. *Marine Drugs*, 17: 595.

Gola D., Tyagi P. K., Arya A., Chauhan N., Agarwal M., Singh S. K., Gola, S. (2021). The impact of microplastics on marine environment: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 16, 100552.

Gomiero A., Strafella P., Pellini G., Salvalaggio V., Fabi, G. (2018). Comparative effects of ingested PVC micro particles with and without

adsorbed benzo (a) pyrene vs. spiked sediments on the cellular and sub cellular processes of the benthic organism *Hediste diversicolor*. *Frontiers in Marine Science*, 5: 99.

Gorbi S., Vino L. C., Notti AL., Benedetti M., Fattorini D., Moltedo G., Regoli F. (2008). An ecotoxicological protocol with caged mussels, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea. *Marine Environmental Research*, 65(1): 34.

Gorbi S., Bocchetti R., Binelli A., Bacchiocchi S., Orletti R., Nanetti L., Raffaelli A., Vignini S., Accorroni C., Totti C., Regoli, F. (2012). Biological effects of palytoxin-like compounds from *Ostreopsis cf. ovata*: A multibiomarkers approach with mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 89(5): 623-632.

Gorbi, S., Regoli, F. (2003). Total oxyradical scavenging capacity as an index of susceptibility to oxidative stress in marine organisms.

Greco L., Pellerin J., Capri E., Garnerot F., Louis S., Fournier M., Angela Sacchi, Fusi M., Lapointe D., Couture P. (2011). Physiological effects of temperature and an herbicide mixture on the soft-shell clam *Mya arenaria* (Mollusca, Bivalvia). *Environmental toxicology and chemistry*, 30(1): 132-141.

Greven A. C., Merk T., Karagöz F., Mohr K., Klapper M., Jovanović B., Palić, D. (2016). Polycarbonate and polystyrene nanoplastic particles act as stressors to the innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental toxicology and chemistry*, 35(12): 3093-3100.

Hankins C., Moso E., Lasseigne D. (2021). Microplastics impair growth in two atlantic scleractinian coral species, *Pseudodiploria clivosa* and *Acropora cervicornis*. *Environmental Pollution*, 275: 116649.

Hégaret H., Wikfors G. H., Soudant P. (2003). Flow cytometric analysis of hemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: II. Hemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 293(2): 249-265.

Hermabessiere L., Dehaut A., Paul-Pont I., Lacroix C., Jezequel R., Soudant P., Duflos G. (2017). Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: a review. *Chemosphere*, 182: 781-793.

Hidalgo-Ruz V., Gutow L., Thompson R. C., Thiel M. (2012). Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environmental science & technology*, 46(6): 3060-3075.

Hipfner J.M., Galbraith M., Tucker S., Studholme K.R., Domalik A.D., Pearson S.F., Good T.P., Ross S.P., Hodum P. (2018). Two forage fishes as potential conduits for the vertical transfer of microfibers in the Northern Pacific Ocean food webs. *Environmental Pollution*, 215-222.

Hirt N., Body-Malapel M. (2020). Immunotoxicity and intestinal effects of nano-and microplastics: a review of the literature. *Particle and fibre toxicology*, 17(1): 1-22.

Höher N., Köhler A., Strand J., Broeg, K. (2012). Effects of various pollutant mixtures on immune responses of the blue mussel (*Mytilus edulis*) collected at a salinity gradient in Danish coastal waters. *Marine environmental research*, 75: 35-44.

<https://plasticseurope.org/it>.

<https://www.unep.org/resources/report/microplastics>

Isobe A., Uchiyama-Matsumoto K., Uchida K., Tokai T. (2017). Microplastics in the southern ocean. *Marine pollution bulletin*, 114(1): 623-626.

JRC SCIENTIFIC AND POLICY REPORTS Report A guidance document within the Common Implementation Strategy for the Marine Strategy Framework Directive MSFD Technical Subgroup on Marine Litter (2013).

Kaposi K. L., Mos B., Kelaher B. P., Dworjanyn S. A. (2014). Ingestion of microplastic has limited impact on a marine larva. *Environmental science & technology*, 48(3): 1638-1645.

Kolandhasamy P., Su L., Li J., Qu X., Jabeen K., Shi H. (2018). Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: a novel way to uptake microplastics beyond ingestion. *Science of the total environment*, 610: 635-640.

- Lacaze E., Pédelucq J., Fortier M., Brousseau P., Auffret M., Budzinski H., Fournier, M. (2015). Genotoxic and immunotoxic potential effects of selected psychotropic drugs and antibiotics on blue mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes. *Environmental Pollution*, 202: 177-186.
- Lasaganà P., Caruso G., Corsi I., Bergami E., Venuti V., Majolino D., La Ferla R., Azzarro M., Cappello S. (2019). Do plastics serve as a possible vector for the spread of antibiotic resistance? First insights from bacteria associated to a polystyrene piece from King George Island (Antarctica). *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 222: 89-100.
- Laudicella V. A., Whitfield, P. D., Carboni, S., Doherty M. K., & Hughes A. D. (2020). Application of lipidomics in bivalve aquaculture, a review. *Reviews in Aquaculture*, 12(2): 678-702.
- Lei L., Wu S., Liu M., Song Y., Fu Z., SHi H., Raley-Susman K.M., He D. (2018). Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science of The Total Environment*, 619: 1-8.
- Leslie H. A., Brandsma S. H., Van Velzen M. J. M., Vethaak A. D. (2017). Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota. *Environment International*, 101: 133-142.
- Liebezeit G., Dubaish F. (2012). Microplastics in beaches of the East Frisian Islands Spiekeroog and Kachelotplate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89: 213 – 217.
- Liu J., Yang, Y. Ding, J. Zhu, B., Gao W. (2019). Microfibers: a preliminary discussion on their definition and sources. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(28): 29497-29501.
- Liu Y., Li L., Zheng L., Fu P., Wang Y., Nguyen H., Shen X., Sui Y. (2020). Antioxidant responses of triangle sail mussel *Hyriopsis cumingii* exposed to harmful algae *Microcystis aeruginosa* and high pH. *Chemosphere*, 243: 125241.

- Lowry O., Rosebrough N., Farr A. L., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.
- Ludovic H., Alexandre D., Ika P.P., Camille L., Ronan J., Philippe S., Guillaume D. (2017). Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. *Chemosphere*, 182: 781-793.
- Lusher A. L., Mchugh M., Thompson, R. C. (2013). Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine pollution bulletin*, 67(1-2): 94-99.
- Ma H., Pu S., Liu S., Bai Y., Mandal S., Xing B. (2020). Microplastics in aquatic environments: toxicity to trigger ecological consequences. *Environmental Pollution*, 261: 114089.
- Magara G., Elia A. C., Syberg K., Khan F. R. (2018). Single contaminant and combined exposures of polyethylene microplastics and fluoranthene: accumulation and oxidative stress response in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 81(16) 761-773.
- Malagoli D., Mandrioli M., Tascetta F., Ottaviani E. (2017). Circulating phagocytes: the ancient and conserved interface between immune and neuroendocrine function. *Biological Reviews*, 92 (1): 369-377.
- Malankowska M., Echaide-Gorriz C., Coronas J. (2021). Microplastics in marine environment: a review on sources, classification, and potential remediation by membrane technology. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 7(2): 243-258.
- Mark A. B., Stewart J. N., Tamara S. G., Steve J. R. & Richard C. T. (2013). Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current biology*, 23(23).
- McCarthy J. F., Jimenez B. D., Shugart L. R., Sloop F. V., Oikari A. (1990). Biological markers in animal sentinels: laboratory studies improve interpretation of field data. In *In Situ Evaluation of Biological Hazards of Environmental Pollutants*, 163-175.

- Mengoli, A. (1998). Aspetti morfo-funzionali dei mitili. *Laguna*, 4.
- Merel K., Albert A. K. (2019). Simplifying microplastic via continuous probability distributions for size, shape, and density. *Environmental Science & Technology Letters*, 6 (9), 551-557.
- Mezzelani M., Gorbi S., Da Ros Z., Fattorini D., Milan M., Bargelloni L., Regoli F. (2016). Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 121: 31-39.
- Mezzelani M., Nardi A., Bernardini I., Milan M., Peruzza L., d'Errico G., Fattorini D., Gorbi S., Patarnello T., Regoli, F. (2021). Environmental pharmaceuticals and climate change: The case study of carbamazepine in *M. galloprovincialis* under ocean acidification scenario. *Environment International*, 146: 106269.
- Abidli S., Pinheiro M., Lahbib Y., Neuparth T., Santos M.M., El Menif N.T. (2021). Effects of environmentally relevant levels of polyethylene microplastic on *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia): filtration rate and oxidative stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 28: 26643 – 26652.
- Michaela E. M., Mark H., Frederieke J. K. (2020). Bioaccumulation and biomagnification of microplastics in marine organisms: A review and meta-analysis of current data. *PlosOne*, 15: 2388-2392.
- Moore, M. N., Allen J. I. (2002). A computational model of the digestive gland epithelial cell of marine mussels and its simulated responses to oil-derived aromatic hydrocarbons. *Marine environmental research*, 54(3-5): 579-584.
- Morin S., Vivas-Nogues M., Duong T.T., Boudou A., Coste M., Delmas F. (2007). Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (RiouMort, France). *Fundamental and Applied Limnology* 168:179–187.
- Nardi A., Benedetti M., D'Errico G., Fattorini D., Regoli, F. (2018). Effects of ocean warming and acidification on accumulation and cellular responsiveness to cadmium in mussels *Mytilus galloprovincialis*: Importance of the seasonal status. *Aquatic Toxicology*, 204: 171-179.

- Nardi A., Benedetti M., Gorbi S., Regoli, F. (2021). Interactive Immunomodulation in the Mediterranean Mussel *Mytilus galloprovincialis* Under Thermal Stress and Cadmium Exposure. *Frontiers in Marine Science*, 1387.
- Nardi A., Mincarelli L. F., Benedetti M., Fattorini D., d'Errico G., Regoli F. (2017). Indirect effects of climate changes on cadmium bioavailability and biological effects in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 169, 493-502.
- Nigro M., Falleni A., Del Barga I., Scarcelli V., Lucchesi P., Regoli F., Frenzilli, G. (2006). Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology*, 77(4): 339-347.
- Norén F., Naustvoll, L. J. (2010). Survey of microscopic anthropogenic particles in Skagerrak. *Pilot study October-November 2010*.
- Paul-Pont I., Lacroix C., Fernández C. G., Hégaret H., Lambert C., Le Goïc N., Frère A., Cassone L., Sussarellu R., Fabioux C., Guymarch J., Albeno M., Huv A., Soundant P. (2016). Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. *Environmental pollution*, 216: 724-737.
- Pavlaki M.D., Arajuio M.J., Cardoso D.N., Silva A.R.R., Cruz A., Menedo S., Soares A.M.V.M., Calado R., Loureiro S. (2016). Ecotoxicity and genotoxicity of cadmium in different marine trophic levels. *Environmental Pollution*, 215: 201-212.
- Pedrotti M.L, Petit S., Eyheraguibel B., Kerros M.E., Elineau A., Ghiglione J.F., Loret J.F., Rostan A., Gorsky G. (2021). Pollution by anthropogenic microfibers in North-Western Mediterranean Sea and efficiency of microfiber removal by wastewater treatment plant. *Science of The Total Environment*, 144195.
- Pipe R. K., Coles J. A. (1995). Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve mollusks. *Fish & Shellfish Immunology*, 5(8): 581-595.

- Pittura L., Avio C. G., Giuliani M. E., d'Errico G., Keiter S. H., Cormier B., Gorbi S., Regoli, F. (2018). Microplastics as vehicles of environmental PAHs to marine organisms: combined chemical and physical hazards to the Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Frontiers in marine science*, 5: 103.
- Prata J. C. (2018). Microplastics in wastewater: State of the knowledge on sources, fate and solutions. *Marine pollution bulletin*, 129(1): 262-265.
- Prokić M. D., Radovanović T. B., Gavrić J. P., Faggio C. (2019). Ecotoxicological effects of microplastics: Examination of biomarkers, current state and future perspectives. *Trends in analytical chemistry*, 111: 37-46.
- Provenza F., Piccardo M., Terlizzi A., Renzi, M. (2020). Exposure to pet-made microplastics: particle size and pH effects on biomolecular responses in mussels. *Marine Pollution Bulletin*, 156: 111228.
- Rahman M. A., Henderson S., Miller-Ezzy P., Li X. X., Qin, J. G. (2019). Immune response to temperature stress in three bivalve species: Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and mud cockle *Katelysia rhytiphora*. *Fish & shellfish immunology*, 86: 868-874.
- Reddy J. K., Mannaerts G. P. (1994). Peroxisomal lipid metabolism. *Annual review of nutrition*, 14(1): 343-370.
- Regoli F., Giuliani M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*, 93: 106-117.
- Reichert J., Triplitz V., Anand R., Bach K., Knopp J., Schubert P., Wilke T., Zielgler M. (2021). Interactive effects of microplastic pollution and heat stress on reef-building corals. *Environmental Pollution*, 290: 118010.
- Reisser J., Slat B., Noble K., Du Plessis K., Epp M., Proietti M., J. de Sonnevile, T. Becker, Pattiaratchi, C. (2015). The vertical distribution of buoyant plastics at sea: an observational study in the North Atlantic Gyre. *Biogeosciences*, 12(4): 1249-1256.
- Revel M., Lagarde F., Perrein-Ettajani H., Bruneau M., Akcha F., Sussarellu R., Rouxel J., Costil K., Decottignies P., Cognie B., Chatel A., Mouneyrac C.

(2019). Tissue-Specific Biomarker Responses in the Blue Mussel *Mytilus* spp. Exposed to a Mixture of Microplastics at Environmentally Relevant Concentrations, 7: 33.

Roberto R. (2021). Morphological description of microplastic particles for environmental fate studies – Review. *Marine Pollution Bulletin* 171, 112716.

Setälä O., Norkko J., Lehtiniemi M. (2016). Feeding type affects microplastic ingestion in a coastal invertebrate community. *Marine pollution bulletin*, 102(1): 95-101.

Shi W., Han Y., Sun S., Tang Y., Zhou W., Du X., Liu G. (2020). Immunotoxicity of microplastics and sertraline, alone and in combination, to a bivalve species: size-dependent interaction and potential toxication mechanism. *Journal of hazardous materials*, 396:122603.

Singh R. P., Mishra S., Das A. P. (2020). Synthetic microfibers: Pollution toxicity and remediation. *Chemosphere*, 257: 127199.

Small G. M., Burdett K., Connock M. J. (1985). A sensitive spectrophotometric assay for peroxisomal acyl-CoA oxidase. *Biochemical Journal*, 227(1): 205-210.

Strungaru S. A., Jijie R., Nicoara M., Plavan G., Faggio C. (2019). Micro-(nano) plastics in freshwater ecosystems: abundance, toxicological impact and quantification methodology. *Trends in analytical chemistry*, 110: 116-128.

Suaria G., Achtypi A., Perold V., Lee R.J., Pierucci A., Bornman T.G., Aliani S., Ryan P.G. (2020). Microfibers in oceanic surface waters: a global characterization. *Science Advances*, 6.

Suaria G., Avio C. G., Mineo A., Lattin G. L., Magaldi M. G., Belmonte G., Moore C.J., Regoli F., Aliani, S. (2016). The Mediterranean Plastic Soup: synthetic polymers in Mediterranean surface waters. *Scientific reports*, 6(1): 1-10.

Suaria G., Melinte-Dobrinescu M. C., Ion G., Aliani, S. (2015). First observations on the abundance and composition of floating debris in the North-western Black Sea. *Marine Environmental Research*, 107, 45-49.

- Sussarellu R., Suquet M., Thomas Y., Lambert C., Fabioux C., Pernet M. E. J., Le Goic N., Quillien V., Mingant C., Epelboin Y, Corporeau C., Guymarch J., Robbens J., Paul-Pont I., Soudant P., Huvet A. (2016). Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proceedings of the national academy of sciences*, 113(9): 2430-2435.
- Tang Y., Rong J., Guan X., Zha S., Shi W., Han Y., Du X., Wu F., Huang W., Liu G. (2020). Immunotoxicity of microplastics and two persistent organic pollutants alone or in combination to a bivalve species. *Environmental Pollution*, 258 113845.
- Tang Y., Zhou W., Sun S., Du X., Han Y., Shi W., Liu G. (2020). Immunotoxicity and neurotoxicity of bisphenol A and microplastics alone or in combination to a bivalve species, *Tegillarca granosa*. *Environmental Pollution*, 265: 115115.
- Teng J., Zhao J., Zhu X., Shan E., Wang, Q. (2021). Oxidative stress biomarkers, physiological responses and proteomic profiling in oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to microplastics with irregular-shaped PE and PET microplastic. *Science of The Total Environment*, 786: 147425.
- Thompson R.C., Olsen Y., Mitchell R.P., Davis A., Rowland S.J., John A.W.G., McGonigle, Russell A.E. (2004). Lost at sea: where is all the plastic?. *Science*, 304 (838).
- Valeria H. R., Lars G., Richard C., Thompson and Martin T. (2012). Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environmental science and technology*, 46: 3060–3075.
- Van Bavel B., Lusher A., Jaccard P. F., Pakhomova S., Singdahl-Larsen C., Andersen J. H., Murray, C. J. (2020). Monitoring of microplastics in Danish marine waters using the Oslo-Kiel ferry as a ship-of-opportunity. *NIVA-rapport*.
- Van Cauwenberghe L., Vanreusel A., Mees J., Janssen C. R. (2013). Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environmental pollution*, 182:495-499.

- Verla A. W., Enyoh C. E., Verla E. N., Nwarnorh, K. O. (2019). Microplastic–toxic chemical interaction: a review study on quantified levels, mechanism and implication. *SN Applied Sciences*, 1(11): 1-30.
- Von Moos N. (2010). Histopathological and cytochemical analysis of ingested polyethylene powder in the digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis* (L.) (Doctoral dissertation, Faculty of Science, University of Basel, Switzerland).
- Von Moos N., Burkhardt-Holm P., Köhler A. (2012). Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental science & technology*, 46(20): 11327-11335.
- Wang F., Gómez-Sintes, R., Boya, P. (2018). Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic*, 19(12): 918-931.
- Wang W., Li M., Wang L., Chen H., Liu Z., Jia Z., Qiu L., Song L. (2017). The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology*, 67: 221-228.
- Ward J. E., Kach D. J. (2009). Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Marine environmental research*, 68(3): 137-142.
- Webb S., Gaw., S., Marsden I. D.,McRae, N. K. (2020). Biomarker responses in New Zealand green-lipped mussels *Perna canaliculus* exposed to microplastics and triclosan. *Ecotoxicology and environmental safety*, 201: 110871.
- Windsor F. M., Durance I., Horton A. A., Thompson R. C., Tyler C. R., Ormerod S. J. (2019). A catchment-scale perspective of plastic pollution. *Global Change Biology*, 25(4), 1207-1221.
- Winston G. W., Regoli F., Dugas Jr 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.

- Winston G. W., Regoli F., Dugas Jr. 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.
- Woodall L. C., Sanchez-Vidal A., Canals M., Paterson G. L., Coppock R., Sleight V., Calafat A., Rogers A.D., Narayanaswamy B.E., Thompson, R. C. (2014). The deep sea is a major sink for microplastic debris. *Royal Society open science*, 1(4): 140317.
- Wu F., Lu W., Shang Y., Kong H., Li L., Sui Y., Hu M., Wang, Y. (2016). Combined effects of seawater acidification and high temperature on hemocyte parameters in the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 56: 554-562.
- Xuan G., Jianlong W. (2019) The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 142: 1–14.
- Zakaria M., Nakane, K. (2020). Fabrication of Polypropylene Nanofibers from Polypropylene/Polyvinyl Butyral Blend Films Using Laser-Assisted Melt-Electrospinning. *Polymer Engineering & Science*, 60(2): 362-370

