UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA

E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

Impatto dovuto alla contaminazione di diete contenenti microplastiche su benessere e crescita di zebrafish adulti (*Danio rerio*)

Impact due to contamination of diets containing microplastics on welfare and growth of zebrafish adults (*Danio rerio*)

Tesi di Laurea Magistrale di:

Fabio Marongiu

Relatore.

Chiar.mo Prof. Ike Olivotto

Correlatore:

Dott. Matteo Zarantoniello

Sessione Straordinaria Febbraio

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

1 INTRODUZIONE 1

1.1 Microplastiche in ambiente 1

1.2 MPs e acquacoltura 7

1.3 MPs e benessere animale 9

2 SCOPO TESI 16

3. MATERIALI E METODI 18

3.1. Modello sperimentale (Zebrafish) 18

3.3. Formulazione diete 20

3.4. Disegno sperimentale 22

3.5. Biometria 23

3.6. Digestione KOH mediata 23

3.7. Microscopia confocale 24

3.8. Istologia 25

3.9. Biologia Molecolare 25

3.9.1. Estrazione RNA e sintesi cDNA 25

3.9.2. Real-Time PCR 26

3.10. Analisi statistica 27

4. RISULTATI 29

4.1. Biometria 29

4.2. Analisi istologiche 29

4.3. Rilevamento MPs 32

4.4. Quantificazione delle MP 34

4.5. Espressione genica 36

4.5.1. Fattori di crescita 36

4.5.2. Marker di risposta allo stress. 37

4.5.3. Stress ossidativo. 38

4.5.4. Risposta immunitaria. 38

4.5.5. Appetito 39

***5.* DISCUSSIONE 40**

6. CONCLUSIONI 43

BIBLIOGRAFIA 44

1 INTRODUZIONE

1.1 Microplastiche in ambiente

Il termine "plastica", dal latino *plastícus*, risale al greco plastikós che significa "formare, modellare" ed è utilizzato per indicare un'ampia gamma di materiali differenziati per caratteristiche, usi e proprietà. La IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) definisce le materie plastiche come "materiali polimerici che possono contenere altre sostanze finalizzate a migliorarne le proprietà e/o ridurne i costi". Tutte queste sostanze vengono prodotte in laboratorio, partendo da monomeri, cioè macromolecole derivate dal petrolio o da altre fonti come carbone, cellulosa e gas naturale (Plastics Europe, 2021).

Il primo materiale plastico brevettato risale alla seconda metà dell'Ottocento, quando Alexander Parkes iniziò a produrre Parkesine, seguito pochi anni dopo dal nitrato di cellulosa creato dai fratelli Hyatt nel tentativo di trovare un materiale che potesse sostituire l'avorio nella produzione delle palle da biliardo (Rasmussen, 2021). Durante il secolo successivo, visto il notevole successo di questo materiale, si creò un notevole interesse per le materie plastiche che portò all'invenzione di molti polimeri, come la bachelite, il cloruro di polivinile (PVC), il cellophane e la poliammide (nylon), le quali peculiarità portarono l'aumento del loro impiego a discapito dei materiali comuni come carta, legno, metallo, pelle e vetro (Rocha-Santos & Duarte, 2017). I polimeri plastici hanno cambiato il mondo dell'industria creando oggetti relativamente economici, sicuramente molto competitivi, che possono essere modellati in qualsiasi forma, colore, dimensione, spessore e consistenza, dal più duro al più morbido. Così grazie alla sua versatilità, dinamicità e "plasticità" questi materiali sono diventati un elemento indispensabile nella vita di tutti i giorni (Andrady & Neal, 2009).

Nonostante gli innumerevoli vantaggi ed applicazioni dal settore industriale, tessile, sanitario fino a quello alimentare, lo svantaggio dell'utilizzo di questo materiale è rappresentato dal suo accumulo direttamente nell'ambiente, con diversi effetti di inquinamento osservabili in tutti gli ecosistemi terrestri, marini e d'acqua dolce (Bergmann et al., 2015; Wagner, 2017; Zeng, 2018). Le materie plastiche sono ad oggi diffuse e ubiquitarie in ambiente a tal punto da essere utilizzate come marcatori stratigrafici per la datazione paleontologica dei sedimenti e per evidenziare, svolgendo un ruolo simile a quello dei fossili, l'attuale era geologica, nota come Antropocene (Zalasiewicz et al., 2016).

Il destino delle plastiche in mare dipende dalle loro proprietà fisiche oltre che dalle condizioni ambientali. La densità dei materiali influisce sulla galleggiabilità (Avio et al., 2017), le condizioni meteo-marine, come il rimescolamento verticale innescato dal vento (Kukulka et al., 2012), il biofouling (Fazey & Ryan, 2016) o l'incorporazione negli aggregati fitoplanctonici marini (Long et al., 2015) possono modificare il collocamento delle plastiche in colonna d'acqua portando quelle più pesanti a raggiungere il fondale marino dove si accumulano a concentrazioni spesso superiori a quelle riportate per le acque superficiali (Galgani et al., 2015; Gerigny et al., 2019). In acqua o nei sedimenti, la scarsa luce e la bassa temperatura favoriscono la resistenza delle plastiche alla degradazione, permettendo una lunga permanenza in ambiente (Galgani et al., 2015): il processo di degradazione in acqua, anidride carbonica, metano e altre molecole non sintetiche, avviene in periodi di tempo molto lunghi. Ad esempio, una bottiglia in plastica può restare in ambiente anche 400 anni prima di degradarsi del tutto (Barnes et al., 2009).

Per effetto di processi chimici, fisici e biologici come l'esposizione alla luce UV, l'idrolisi, l'azione delle onde e delle correnti, fenomeni di risospensione ed attività microbica, le macroplastiche sono soggette a fenomeni di frammentazione e degradazione (Barnes et al.,

2009) che portano alla formazione di particelle più piccole definite microplastiche (MPs). Le MPs furono studiate per la prima volta dall'ecologo marino Richard Thompson, che notò delle piccole particelle depositate lungo la linea di marea durante l'attività di pulizia del litorale sull'Isola di Man (Mar d'Irlanda); nel 2004 ipotizzò che tali particelle potessero accumularsi in mare in grandi quantità e coniò il termine microplastiche (Thompson et al., 2004). Con MPs si intendono tutti i frammenti di plastica con dimensioni inferiori ai 5 mm (Browne et al., 2015), anche se non esiste ancora una definizione comune a livello globale né per il limite superiore né per quello inferiore (Frias & Nash, 2019; Van Cauwenberghe et al., 2015). Non esistono solo le MPs derivanti dalla degradazione naturale di detriti di plastica di maggiori dimensioni, definite per questo "secondarie" (Barnes et al., 2009; Wright et al., 2013), ma esistono anche MPs "primarie" intenzionalmente preparate di dimensioni microscopiche, solitamente come esfolianti in formulazioni cosmetiche, abrasivi industriali e agenti di "sabbiatura" o per applicazioni tessili (Fendall & Sewell, 2009; Gregory, 1996; Maynard, 2006). Le MPs raggiungono il mare attraverso gli effluenti dei sistemi di trattamento delle acque reflue che non sono in grado di bloccare adeguatamente le microparticelle raccolte dai rifiuti urbani e industriali e attraverso l'acqua piovana e di deflusso (Horton et al., 2017). Le microplastiche terrestri possono provenire anche dai film agricoli, dalla lavorazione, dalla produzione e dal trasporto della plastica e dalla cattiva gestione dei rifiuti plastici (compresi gli scarti e le discariche) (Dong et al., 2021). Le microplastiche atmosferiche, che successivamente possono raggiungere il mare, sono generate dalla produzione, dall'uso e dall'usura delle fibre tessili di plastica, dalle discariche e dall'incenerimento dei rifiuti, dalle emissioni di gas di scarico, dall'abrasione di strade e pneumatici, dalla degradazione delle plastiche e dalla risospensione delle polveri (Chen et

al., 2020; Dris et al., 2016). In sintesi, le fonti di microplastiche sono varie e vaste, tanto che l'inquinamento da microplastiche ubiquitario e persistente.

Una volta in mare le plastiche vengono trasportate attraverso il vento e le correnti che le ridispongono a profondità variabili a seconda della loro densità lungo tutta la colonna d'acqua. Generalmente le MPs con densità maggiore di quella dell'acqua di mare ($>1.02 g/cm^3$) affonderanno andando ad accumularsi nei sedimenti e ciò rende il benthos il maggior deposito a lungo termine di MPs (Courtene-Jones et al., 2017); al contrario, le MPs a bassa densità tendono a galleggiare, anche se non è affatto esclusa la possibilità di ritrovare MPs con densità superiore rispetto a quella dell'acqua marina in superficie (Kane & Clare, 2019). Tutti questi processi inducono spostamenti verticali e orizzontali di microplastiche, da acque oceaniche e costiere poco profonde a zone più profonde. I canyon sottomarini possono fungere da canali preferenziali di questi spostamenti agevolando i moti di downwelling e aumentando la persistenza di MPs in determinate località (Canals et al., 2013; White et al., 2008).

Le MPs grazie alla loro ridotta dimensione possono facilmente essere ingerite da parte di differenti organismi in modo, diretto o indiretto, volontario e involontario, così sono trasferite nel comparto biotico (GESAMP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection, 2015). Le MPs possono entrate nei diversi habitat attraverso organismi con strategie di alimentazione molto diversificate come pesci pelagici e bentonici (Davison & Asch, 2011; McGoran et al., 2017), organismi filtratori (De Witte et al., 2014) e fauna bentonica (Van Cauwenberghe et al., 2015). Risultano estremamente rilevanti per l'interazione con gli organismi la taglia, la forma e la tipologia delle MPs.

Queste caratteristiche, infatti, influenzano e determinano distribuzione, appetibilità e biodisponibilità delle particelle stesse (Gray & Weinstein, 2017; Kögel et al., 2020).

In laboratorio è stata dimostrata la capacità da parte di microrganismi planctofagi di assumere MPs durante l'alimentazione, questo vale anche per altri invertebrati come bivalvi, echinodermi, policheti e decapodi (Browne et al., 2008; Cole et al., 2013; Galloway et al., 2017; Hart, 1991; Murray & Cowie, 2011; Setälä et al., 2014, 2016), con la possibilità di accumularsi a livello subcellulare e nei livelli biologici superiori (Galloway et al., 2017). In alcune specie è stata dimostrata l'assunzione di particelle di plastica, da parte dell'organismo, dopo che queste erano state intrappolate dalle strutture branchiali (Gregory, 2009).

Gli organismi planctivori che si nutrono di microalghe possono ingerire accidentalmente microplastiche vista la somiglianza in dimensioni e peso specifico con il fitoplancton (Brillant & MacDonald, 2000). Simili per dimensioni e colore alle particelle di cibo e materia organica naturali, le MPs sono ubiquitarie e facilmente ingerite dallo zooplancton, per ingestione accidentale o attiva. Le MPs si accumulano sempre più spesso nella catena alimentare e vengono trasferiti a livelli trofici superiori (Rodríguez-Torres et al., 2020).

Anche in specie commercialmente pescate e mangiate sono state ritrovate microplastiche, nel Mediterraneo centrale, circa il 18% dei grandi predatori come il pesce spada (*Xiphias gladius*)e l'alalunga (*Thunnus alalunga*) sono stati trovati positivi all'ingestione di micro-, meso-(5-25 mm) e macroplastiche (>25 mm) (Romeo et al., 2015). In Adriatico su 500 organismi appartenenti a specie diverse di pesci e invertebrati sono state osservate frequenze di ingestione tra il 10 e il 75% con percentuali maggiori nelle specie bento-pelagiche rispetto a quelle bentoniche o pelagiche, con differenze geografiche legate alle dimensioni e alle forme delle particelle probabilmente connesse al runoff locale dei fiumi e alle dinamiche di corrente (Cau et al., 2020).

Le densità maggiori di MPs sono state registrate, soprattutto in aree portuali, in prossimità di scarichi urbani ed industriali e presso le foci dei fiumi dove in genere si osserva una quantità di MPs maggiore sia nell'acqua che nei sedimenti dopo fenomeni di precipitazione con concentrazioni di MPs superiori nei sedimenti vicino alla costa piuttosto che in mare aperto (Wang et al., 2019), suggerendo che la distribuzione delle MPs è influenzata dalla distanza dalla costa e da fattori antropici (shan et al., 2018). È in queste zone che si concentra l'attività di maricoltura, soprattutto di organismi filtratori come i bivalvi, ciò rende l'acquacoltura offshore vulnerabile alle MPs a causa della disponibilità e dell'accumulo di queste (Vázquez-Rowe et al., 2021), diventando una minaccia per la sopravvivenza delle specie animali allevate (M. Chen et al., 2018; Yu et al., 2020). Le concentrazioni di MPs nei mitili *Mytilus edulis* sono significativamente più elevate nei mitili di allevamento rispetto a quelli selvatici (Mathalon & Hill, 2014). Risultati simili sono stati raggiunti in tre molluschi del Canada (Murphy, 2018). Un altro studio dice che non esistono differenze significative nelle concentrazioni di MPs tra le vongole di Manila (*Venerupis philippinarum*) selvatiche e quelle coltivate (Davidson & Dudas, 2016). Ciò indica che gli animali acquatici d'allevamento filtratori non sono meno sensibili alle MPs rispetto agli animali selvatici e sono più facilmente influenzati dalle attività umane nelle condizioni di coltura.

Sia l'acquacoltura d'allevamento sia le specie selvatiche catturate sono soggette all'arricchimento di MPs e al relativo rischio di malattie, che possono causare seri problemi di sicurezza alimentare e rischi per la salute umana (Barboza et al., 2018; A. Lusher et al., 2017). Infatti, le MPs potrebbero agire come vettore plasmidico per gli agenti patogeni, aumentando il rischio di malattie nei prodotti acquatici allevati (Viršek et al., 2017).

1.2 MPs e acquacoltura

Non solo la maricoltura ma anche l'acquacoltura interna può essere soggetta a inquinamento da MPs in quanto le fonti di acqua utilizzate sono molto estese e dipendono dalle acque sotterranee, dai fiumi e laghi, dalle sorgenti, dalle acque costiere e marine, dalle acque piovane e di scarico trattate di provenienza urbana, agricola e industriale (Lebel et al., 2019). Non sorprende che quasi tutte queste fonti d'acqua contengano MPs, alcune delle quali sono anche estremamente grandi. Ad esempio, ogni giorno vengono generate più di 1900 particelle di fibre nelle acque reflue del processo di lavaggio del bucato (Browne et al., 2011; Cutroneo et al., 2020; Lenaker et al., 2019; W. Li et al., 2020; Panno et al., 2019; Talvitie et al., 2017; van der Hal et al., 2017), e il contenuto di MPs raggiunge le 43.000 particelle per km^2 in più del 95% dei siti rilevati in cinque Grandi Laghi negli Stati Uniti (Eriksen et al., 2013).

Per quanto riguarda le fonti di MPs endogene, la perdita e la frantumazione degli attrezzi in plastica per la pesca e le attrezzature dell'impianto di allevamento, che includono attrezzature in plastica, esche, aeratori, pompe per l'acqua, cavi elettrici e altro, sono probabilmente diventate le principali fonti di MPs in acquacoltura (M. Chen et al., 2018). Al contrario, le precipitazioni atmosferiche, i fiumi, i laghi, i mari, la pesca ricreativa e le acque superficiali sotterranee, l'afflusso e l'erosione del suolo sono le fonti di input esterni per le MPs in acquacoltura (Klein & Fischer 2019; Wright et al. 2020; Zhang et al. 2020; Wang et al. 2020b). Inoltre, i mangimi rappresentano un'altra importante fonte di MPs nel sistema di acquacoltura (Wright et al. 2013; Van Cauwenberghe et al. 2015). Gli ingredienti dei mangimi sono vari e le MPs sono facilmente introdotte in uno o tutti i loro processi di fabbricazione, lavorazione, produzione, trasporto, conservazione e vendita. Ad esempio, la farina di pesce, uno degli ingredienti più utilizzati nella produzione dei mangimi per

l’acquacoltura, contiene grandi quantità di MPs. In particolare, quando sono state analizzate tre marche commerciali malesi di farina di pesce, sono state trovate 336 particelle, tra cui più del 50% erano polimeri plastici, un quarto erano particelle di pigmento e la forma dominante di MPs erano i frammenti (Karbalaei et al., 2020). La farina di pesce deriva dalla lavorazione di pesce di piccole dimensioni pescato in diverse zone del globo, tra cui aree fortemente contaminate dalla presenza di MPs come Cina e Indonesia, per tanto potrebbe contenere alte concentrazioni di plastica nel proprio organismo. Il pesce per essere trasformato in farina, utilizzata successivamente per la formulazione di mangimi, deve essere lavorato; durante la fase di lavorazione e macinazione si possono verificare contaminazioni dovute alla frammentazione delle parti plastiche presenti nelle strumentazioni. La farina di pesce prodotta per essere poi commercializzata deve essere confezionata e anche durante questo procedimento si può creare una potenziale contaminazione dovuta al packaging spesso costituito da materiali plastici (Gündoğdu et al., 2021). La presenza di MPs nel mangime può intaccare la produzione ittica, in particolare gli effetti negativi sono stati ritrovati principalmente nella fase larvale in quanto i pesci possono scambiare le particelle plastiche per lo zooplancton di cui si cibano, causando un’ostruzione del tratto gastrointestinale e la riduzione dell’attività predatoria dovuta alla sensazione di sazietà apparente, ciò alla fine porterà alla riduzione della crescita e a uno sviluppo inefficiente dei pesci in una stadio di vita in cui sono vulnerabili (Campos et al., 2021).

Anche i composti artificiali, come i coloranti dei mangimi, sono una delle fonti di MPs. Infine, i medicinali per pesci e i prodotti per la protezione degli animali sono un'altra importante fonte di MPs nell'ambiente dell'acquacoltura (J. Li et al., 2018). Al giorno d’oggi, molti tipi di prodotti chimici e antibiotici sono diventati tra i principali input per l’acquacoltura, queste sostanze vengono adsorbite dalle MPs e vi rimangono a lungo.

Pertanto, un gran numero di plastiche e MPs può entrare nell'ambiente dell'acquacoltura per la prevenzione e il trattamento dei disturbi acquatici, il miglioramento della qualità dell'acqua, l'antistress e il potenziamento dell'acquacoltura (Koelmans et al., 2016; J. Li et al., 2018; Mato et al., 2001).

L'acquacoltura è un settore in forte crescita, i dati FAO 2022 indicano che essa rappresenta il 50% della produzione ittica mondiale con una produzione di 70 milioni di tonnellate divise in 580 specie tra cui teleostei, molluschi, crostacei, anfibi, rettili, piante acquatiche e altri invertebrati acquatici. Statistiche FAO mostrano che nel 2020, sulla base di una produzione totale a livello mondiale di pesci, molluschi e crostacei pari a 132.5 milioni di tonnellate, ben 42.3 milioni di tonnellate provenivano dall'acquacoltura, pari a circa il 32% del totale mentre agli inizi degli anni '70 l'incidenza non oltrepassava il 4%. Questa enorme crescita è dovuta alla richiesta di proteine che la pesca da sola non è più in grado di sostenere, soprattutto nei paesi in via di sviluppo in cui le autorità sanitarie raccomandano l'aumento del consumo del pesce (Kris-Etherton et al., 2009). La crescita dell'acquacoltura è anche dovuta all'andamento produttivo sempre più altalenante della pesca a causa del sovrasfruttamento degli stock ittici. Le previsioni di crescita secondo la FAO porteranno il settore dell'acquacoltura ad uguagliare la produttività di quello della pesca già nel 2030.

La costante crescita dell'acquacoltura ha portato la comunità scientifica a interessarsi alle problematiche ad essa associate, tra queste quella delle MPs è ampiamente documentata; infatti, oltre alle specie ittiche pescate la presenza di questo inquinante è stata ritrovata anche in specie allevate (Vázquez-Rowe et al., 2021).

1.3 MPs e benessere animale

Visto l'incombere del problema delle MPs, vari studi sui loro effetti sul benessere animale sono stati fatti e si è visto che queste particelle potrebbero avere un impatto chimico, fisico

e biologico sugli organismi che le ingeriscono direttamente, ma potrebbero potenzialmente avere un effetto indiretto anche su organismi che consumano prede contaminate (Oehlmann et al., 2009). L'ingestione di MPs può intaccare la qualità della vita influenzando l'attività d'alimentazione, ostruendo il tratto digerente e causando una sensazione di sazietà, malnutrizione e debolezza generale, che influiscono poi le funzioni respiratorie, la riproduzione e la crescita (Avio et al., 2015; Détrée & Gallardo-Escárate, 2018; Karami et al., 2017; Paul-Pont et al., 2016; Pedà et al., 2016) oltre ad alterazioni istologiche, reazioni infiammatorie e risposte ecotossicologiche a livello cellulare, biochimico e molecolare (Avio et al., 2015; Cole et al., 2015; Gregory, 2009; Guzzetti et al., 2018; Pedà et al., 2016; Pittura et al., 2018). Nei pesci, le MPs dopo l'ingestione possono accumularsi nel tratto gastrointestinale dei pesci, causando blocchi in tutto l'apparato digerente e riducendo l'alimentazione a causa della sazietà (A. L. Lusher et al., 2013; Wright et al., 2013). L'ingestione di MPs può anche portare a deterioramenti strutturali e funzionali del tratto gastrointestinale, che a loro volta causerebbero problemi nutrizionali e di crescita ai pesci (Jabeen et al., 2018; Pedà et al., 2016). In uno studio condotto sullo scorfano coreano (*Sebastes schlegelii*) dopo l'esposizione a 106 particelle/L di MPs di polistirene, il tasso di incremento di peso, di crescita specifico e l'energia lorda dei pesci sono diminuiti rispettivamente del 65,4%, 65,9% e 9,5% rispetto al gruppo di controllo (Yin et al., 2018). L'ingestione di MPs può anche disturbare il sistema immunitario innato nei pesci (Greven et al., 2016), indurre risposte infiammatorie e modificare i loro profili metabolici (Y. Lu et al., 2016a; Mattsson et al., 2015) . Inoltre, le particelle di plastica molto piccole sono in grado di traslocare dal tratto gastrointestinale in altri organi del pesce, come il fegato e le branchie, causando danni in questi organi (Y. Lu et al., 2016a; Yin et al., 2018).

In studi dove le MPs sono state incluse nella dieta di specie commerciali, come l'orata (*Sparus aurata*), si sono osservati altri effetti negativi come induzione di stress ossidativo e risposta pro-infiammatoria in organi target come fegato, intestino ed encefalo e alterazioni del comportamento sociale e alimentare in esemplari giovanili (Capó et al., 2021; Solomando et al., 2020). In uno studio condotto su giovanili di spigola (*Dicentrarchus labrax*) è stata dimostrato che le microplastiche fornite nella dieta, con un range dimensionale di 1-5 μm, possono traslocare nel filetto spostando l'attenzione sui potenziali rischi per la salute umana (Zeytin et al., 2020).

Negli invertebrati acquatici, la maggior parte delle MPs si trova all'interno del tratto digestivo, della testa e delle branchie (Devriese et al., 2015) con alcune eccezioni, come nel caso di molluschi e vongole e di alcuni echinodermi (A. Lusher et al., 2017). In *Mytilus trossulus* e *Macoma balthica* è stato osservato un accumulo di MPs maggiore nella ghiandola digestiva rispetto alle branchie (Setälä et al., 2016). Inoltre, è stato dimostrato che le MPs si aggregano sia nelle cellule digestive che in quelle branchiali (Avio et al., 2015). L'accumulo di MPs nella ghiandola digestiva dei mitili può portare con un tempo di esposizione prolungato a un falso senso di sazietà, con conseguente diminuzione del metabolismo degli acidi grassi e inedia dell'organismo (Capillo et al., 2018; Faggio et al., 2016; Freitas et al., 2019, 2020; Kühn et al., 2015; Pagano et al., 2016, 2017; Stara et al., 2020). Sono stati riportati effetti negativi sulla riproduzione delle ostriche del Pacifico (*Crassostrea gigas*) dopo la loro induzione con MPs, dove il numero di ovociti prodotti è diminuito significativamente (Sussarellu et al., 2016). Per quanto riguarda gli altri effetti sub-letali delle MPs: è stato riscontrato l'aumento della formazione di ROS in Mytilus spp. (Paul-Pont et al., 2016) e l'alterazione delle concentrazioni di composti antiossidanti in *M. edulis* (Hamm & Lenz, 2021). Le MPs hanno causato cambiamenti a livello del trascrittoma (Détrée

& Gallardo-Escárate, 2017) e della degradazione del DNA (Masiá et al., 2022) in *M. galloprovincialis.*

Le MPs, a causa della natura idrofobica dei polimeri di cui sono composte e all'elevato rapporto superficie/volume sono in grado di accumulare efficacemente gli inquinanti organici dall'acqua di mare circostante (Avio et al., 2015), con una capacità di assorbimento che varia a seconda dei polimeri e delle sostanze chimiche considerate (Rochman, 2015).

Il problema della relazione tra MPs e contaminanti intacca maggiormente gli embrioni di pesce e gli stadi vitali giovanili, i quali sono più sensibili alle varie esposizioni da xenobiotici a causa dei processi metabolici e antiossidanti non ancora completamente sviluppati (Hodkovicova et al., 2020; Medkova et al., 2022; Sehonova et al., 2019). Inoltre, occorre tenere presente la possibilità di un trasferimento materno delle particelle di plastica nei pesci (Franzellitti et al., 2019). Tuttavia, gli studi sulle MPs e sui loro effetti sui vari fattori necessari per il corretto sviluppo dei pesci sono ancora limitati. Prima della schiusa l'embrione è protetto dal corion che presenta piccoli pori con diametri fino a 600-700 nm (Z. Y. Chen et al., 2020; Pitt et al., 2018). Pertanto, l'embrione nei primi giorni di sviluppo è relativamente al sicuro dagli effetti di vari xenobiotici. Tuttavia, è stato riportato che le plastiche hanno un'elevata capacità di adsorbimento per aderire alla superficie dell'embrione causando alterazioni dello sviluppo anche se non passano attraverso la barriera del corion (Duan et al., 2020); inoltre, l'acqua e i vari tipi di additivi adsorbiti sulla superfice delle plastiche possono causare effetti negativi (Batel et al., 2016; Franzellitti et al., 2019; Jang et al., 2016). Le microplastiche con taglia minore di 0,1 μm, grazie alle loro nano dimensioni, sono in grado di penetrare i pori del corion e di provocare effetti avversi negli organismi in via di sviluppo (Kashiwada, 2006; van Pomeren et al., 2017).

L’effetto delle MPs sul benessere animale è stato studiato ampiamente sull’organismo modello zebrafish (*Dario rerio*), in cui numerosi esperimenti hanno valutato i danni che queste particelle possono avere su di esso. Le MPs hanno causato cambiamenti di tipo comportamentale e morfologico, come la curvatura della coda verso l'alto o verso il basso (difetto vascolare), la deformazione della mandibola, edema pericardico, cuore a corda, la diminuzione della frequenza cardiaca e della competenza nel nuoto nelle larve di zebrafish (Mak et al., 2019; Pitt et al., 2018; Qiang & Cheng, 2019; Trevisan et al., 2019).

Esistono numerose prove che dimostrano che le MPs attraversano le barriere biologiche ed entrano nel sistema circolatorio. Le MPs causano un'alterazione meccanica e sono responsabili di una diminuzione della riserva energetica che, influisce sul sistema immunitario (Wright et al., 2013). È stato dimostrato un aumento significativo dei livelli di mRNA e proteine dei geni (IL1A, IL1B e IFN) legati al sistema immunitario innato (Jin et al., 2018). La presenza delle MPs all'interno del tratto intestinale influisce sul microbioma intestinale e causa infiammazione. È stato osservato un aumento dell'infiammazione in diversi tessuti (fegato e intestino) con sovra-regolazione del gene IL1B (Lei et al., 2018; Y. Lu et al., 2016a; Qiang & Cheng, 2019; Qiao, Deng, et al., 2019; Qiao, Sheng, et al., 2019). Gli organismi sono dotati di un sistema di difesa antiossidante che mantiene il livello di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e protegge le biomolecole vitali dai danni dei radicali liberi. Un aumento dei ROS e dello stress ossidativo nelle cellule è stato implicato in gravi malattie e disturbi (Suzuki & Mittler, 2012). Numerosi rapporti dimostrano che queste particelle interferiscono con il metabolismo dei ROS e causano stress ossidativo alterando i livelli di antiossidanti in *D.rerio*. Superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), glutatione-transferasi (GST), glutatione (GSH), glutatione perossidasi (GPX), glutatione reduttasi (GR)

sono biomarcatori importanti e indispensabili per misurare lo stress ossidativo in un organismo (Bhagat et al., 2016).

L'aumento della produzione di ROS è associato a danni al DNA nell'embrione di zebrafish esposto a MPs (Sökmen et al., 2020). Il danno al DNA e l'alternanza nell'espressione di un gene che codifica le vie di riparazione del DNA forniscono una base cruciale per misurare l'effetto delle MPs in zebrafish. Il citocromo P450 (CYP) è un enzima che svolge un ruolo importante nel metabolizzare gli xonobiotici compatibili con i recettori degli idrocarburi arilici (AhR) ed è codificato dal gene cyp1a. La sovra-regolazione di cyp1a è stata rilevata nel tessuto epatico di zebrafish esposti a MPs (Mak et al., 2019). L'aumento di geni legati alla riparazione del DNA è stato osservato nell'esposizione combinata tra MPs, Cu e materia organica naturale (Qiao, Lu, et al., 2019). L'alterazione dei metaboliti, rivelata dall'aumento della regolazione degli acidi grassi e dalla riduzione degli amminoacidi, ha fornito indicazioni sul meccanismo molecolare della tossicità delle MPs (Y. Lu et al., 2016b).

Alcuni studi hanno dimostrato che le MPs aumentano l'accumulo e la tossicità del cadmio (Cd) (K. Lu et al., 2018) e del rame (Cu) (Qiao, Lu, et al., 2019) nel fegato, nell'intestino e nelle branchie di zebrafish adulti. Nell'esposizione combinata di cadmio e MPs è stata riportata una significativa sovra-regolazione dei geni della detossificazione dei metalli (mt1 e mt2), della risposta infiammatoria (tnfa, il1b e ifng1-2) e una sotto-regolazione dello stress ossidativo (sod1, sod2 e nfe212) (K. Lu et al., 2018).

Anche in specie consumate dall'uomo sono state individuate microplastiche e questo ha sollevato molte preoccupazioni per la salute umana anche se risultano necessari ulteriori studi (Carbery et al., 2018). La maggioranza degli studi effettuati ha documentato che la maggior parte delle MPs è contenuta nell'intestino degli organismi marini, un organo che

generalmente non viene consumato direttamente dall'uomo tranne che nei piccoli pesci che vengono mangiati interamente (Galloway, 2015).

Le quantità di particelle ingerite dall'uomo attraverso prodotti ittici sono scarsamente quantificate: alcune stime variano da 1 (Vandermeersch et al., 2015) a 30 particelle al giorno (Van Cauwenberghe et al., 2015) a seconda del consumo di pesce e simili. Ad oggi non sono inoltre disponibili dati sul potenziale impatto della cottura e/o del processamento di prodotti ittici ad alte temperature sulla tossicità delle MPs eventualmente presenti (A. Lusher et al., 2017). Ma comunque per la loro diffusione lungo la catena trofica marina, le MPs potrebbero intaccare la sicurezza alimentare e la salute umana (Vethaak & Leslie, 2016).

2 SCOPO TESI

L'inquinamento da plastica è problema attuale e in costante espansione; si stima pertanto che entro il 2050 circa 12.000 milioni di tonnellate di plastiche saranno immessi in ambiente con conseguenze sugli ecosistemi stessi e gli organismi acquatici che ne fanno parte.

In particolare, le MPs, sono la parte di più difficile da gestire e quella con più problemi legati al benessere animale e alla salute umana in quanto possono entrare nella componente biotica proprio grazie alle loro ridotte dimensioni.

La sempre maggiore presenza di MPs in ambiente va a scontrarsi con un altro settore in forte crescita come l'acquacoltura, uno dei principali settori per l'alimentazione umana e che si stima possa arrivare nel 2030 a fornire circa il 62% del prodotto ittico andando a costituire una delle principali fonti di proteine per l'uomo. Di conseguenza, la contaminazione dell'acquacoltura da parte della plastica, in particolare MPs, sarà sempre più frequente.

Una delle fonti principali di questa contaminazione deriva direttamente dal mangime consumato dagli organismi allevati. Il processo produttivo dei mangimi è assai articolato e le MPs sono facilmente introdotte attraverso i processi di fabbricazione, lavorazione, produzione, trasporto, conservazione e vendita oltre essere presenti nella componente principale di questi mangimi, la farina di pesce, derivata direttamente dal pesce pescato in un mare sempre più contaminato dalla presenza di queste particelle.

La qualità e la sicurezza del prodotto ittico allevato, potenzialmente soggetto a una fonte diretta di contaminazione da MPs contenuta nei mangimi, sono strettamente correlate alla salute non solo dei pesci ma anche del consumatore. Nonostante i numerosi studi sulla presenza di MPs nei pesci le informazioni in merito gli effetti avversi dell'esposizione alle MPs sia in termini di accumulo sia in termini di benessere animale e al possibile

trasferimento di queste dal tratto gastrointestinale ad altri tessuti, tra cui la porzione edibile, sono ancora scarse.

Pertanto, il seguente progetto si prefigge di: (i) formulare diete specifiche contenenti due diversi polimeri di MPs, amino formaldehyde polymer (AFP) di taglia 1-5 μm e polietilene (POL) di taglia 40-47 μm a due diverse concentrazioni per ogni polimero, 0,05 g/kg e 0,5 g/kg ; (ii) testare le diete sperimentali su esemplari adulti dell'organismo modello zebrafish (*Dario rerio*); (iii) valutare le performance di crescita, il benessere e l'accumulo delle MPs in relazione a taglia e concentrazione nei pesci allevati attraverso un approccio multidisciplinare che include analisi biometriche, istologiche, molecolari e di microscopia confocale e a fluorescenza per comprendere meglio le risposte fisiologiche e il benessere della specie allevata; (iv) individuare il polimero e la concentrazione con gli effetti più negativi sui pesci allevati.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Modello sperimentale (Zebrafish)

Figura 1. Esemplari di zebrafish (*Danio rerio*)

Danio rerio, conosciuto come zebrafish (Fig.1), è un teleosteo d'acqua dolce (3-4 cm) appartenente alla famiglia Cyprinidae ed originario del Sud-Est Asiatico. Il corpo è affusolato e compresso lateralmente con la bocca rivolta verso l'alto e la mascella inferiore che protende in avanti. La livrea presenta linee orizzontali blu, più spesse, e bianche, più sottili, che si alternano. La coda e la pinna anale mostrano la stessa colorazione del resto del corpo, mentre le altre pinne pettorali hanno un colore olivastro. Vive nelle aree tropicali soggette alle tipiche fluttuazioni climatiche dei monsoni, abitando fiumi, piccoli corsi d'acqua e altri canali, pozze stagnanti o a lento movimento in prossimità di corsi d'acqua e risaie (McClure et al., 2006). È un organismo onnivoro, che si nutre di zooplancton, insetti e composti di natura algale e vegetale (Spence et al., 2006). In cattività questo pesce viene nutrito con rotiferi, naupli di Artemia salina e cibo granulare secco (Ribas & Piferrer, 2014). Zebrafish si sta affermando negli ultimi anni come organismo modello nel campo della ricerca di base e dell'acquacoltura e non solo, grazie ad una serie di caratteristiche che ne

favoriscono l'ampio uso: facilità di allevamento, bassi costi di mantenimento, semplicità nell'induzione della riproduzione, produzione di uova ed embrioni praticamente trasparenti, raggiungimento dell'età adulta in 3-4 mesi (Spence et al., 2008). Zebrafish si riproduce facilmente in cattività, le femmine depongono continuamente uova a intervalli frequenti ma irregolari e una singola femmina può produrre, in presenza di condizioni ottimali per la riproduzione e crescita, diverse centinaia di uova in un unico evento di deposizione (Spence et al., 2006). Le uova sono demersali e non adesive, con un diametro di circa 0,7 mm, ed una volta rilasciate vengono immediatamente fecondate dai maschi. In cattività devono essere utilizzati particolari accorgimenti per evitare fenomeni di cannibalismo nei confronti delle uova (Lee et al., 1999). Dopo solo 18 ore dalla fecondazione, zebrafish mostra occhi e segmenti muscolari e cerebrali ben sviluppati; dopo circa 24 ore la segmentazione è completata, dopo 48-72 ore avviene la schiusa e la larva fuoriesce. La larva appena schiusa è lunga circa 3 mm, non ha l'intestino pienamente sviluppato e l'insufflazione della vescica natatoria avviene circa dopo due giorni dalla schiusa (Laale, 1977). Nei primi giorni di vita le larve crescono rapidamente, il sacco vitellino viene consumato e l'intestino, che prima era tubiforme si ripiega prendendo una forma a "S". Dopo il secondo giorno dalla schiusa, insieme allo sviluppo della vescica natatoria che permette loro di nuotare attivamente, le larve iniziano a respirare dalle branchie e a muovere le mascelle; ciò produce un cambiamento anche nella ricerca della preda e nell'alimentazione (Kimmel et al., 1995). Oltre alla facilità nell'allevamento un altro motivo per cui zebrafish è un ottimo organismo modello è che il suo intero genoma è stato sequenziato, riportando un'elevata similitudine con quello umano; infatti, condivide con l'uomo il 70% del corredo genomico e i geni associati allo sviluppo delle malattie mostrano un'omologia pari al 84% circa con quelli umani. Zebrafish si è rilevato utile nel comprendere i meccanismi di insorgenza, crescita e

diffusione dei tumori, dal momento che la biologia delle neoplasie dei pesci e degli umani è la stessa. Zebrafish è inoltre ampiamente usato in molti campi dell'acquacoltura per lo studio e l'identificazione di geni coinvolti nei meccanismi che presiedono il metabolismo dei nutrienti, lo sviluppo muscolare e lo stress (Rahman Khan & Sulaiman Alhewairini, 2019; Reed & Jennings, 2011). Un' importante caratteristica, utile per lo sviluppo degli studi biologici, è data dal fatto che gli embrioni e le larve sono completamente trasparenti; in questo modo è possibile osservare in maniera diretta lo sviluppo dei vari organi oltre alla visualizzazione dei vasi e del flusso circolatorio grazie all'uso di marker fluorescenti (Ribas & Piferrer, 2014).

3.2. Etica

La manipolazione degli animali è stata eseguita seguendo le procedure stabilite dalla Direttiva del Consiglio delle Comunità Europee (86/609/CEE e 2010/63/UE) per il benessere degli animali e con l'approvazione del comitato etico dell'Università Politecnica delle Marche. Durante lo studio sono state utilizzate condizioni ottimali di allevamento. Ogni accortezza è stata impiegata allo scopo di minimizzare la sofferenza dei pesci con utilizzo di anestetico (MS222), il quale è stato usato con una concentrazione di 0,3 g/L per la soppressione.

3.3. Formulazione diete

Le diete sperimentali sono state formulate presso l'Università degli Studi di Udine con l'utilizzo di ingredienti convenzionali e in accordo con le esigenze nutrizionali di *Danio rerio*. I pesci sono stati alimentati con una dose giornaliera di cibo pari al 3% della biomassa presente in vasca.

Le diete sono state formulate partendo dalla composizione di una dieta commerciale disponibile sul mercato per zebrafish (Zebrafeed, Sparos ltd, Olhão, Portogallo; Tabella 1) in modo da apportare tutti i nutrienti necessari alla specie oggetto di studio.

Ingredienti	**g/kg**
Farina di pesce	470
Mix vegetale (idrolizzato proteico di pisello : glutine di frumento, 0,7 : 1)	220
Farina di frumento	198
Olio di pesce	80
Lecitina di soia	8
Integratori di minerali e vitamine	14
Legante	10

Tabella 1. Dieta standard per zebrafish - formulazione

Il presente studio ha impiegato due diversi polimeri di MPs che si differenziano per la composizione (amino formaldehyde polymer e polietilene), per il range dimensionale (pari a 1-5 µm e 45-47 µm, rispettivamente) e per la fluorescenza (AFP ha un picco di emissione di 636nm quando eccitato a 584 nm, POL ha un picco di emissione di 607 nm quando eccitato a 575 nm). La scelta è stata effettuata sia sulla base della disponibilità commerciale delle MPs fluorescenti (Cospheric LLC, Goleta, CA, USA; vedi allegato tecnico azienda), sia su dati presenti in letteratura che indicano che, nei teleostei, frammenti di microplastica > di 10 µm svolgono un ruolo prevalentemente abrasivo a livello intestinale, mentre frammenti < di 10 µm oltrepassano la barriera intestinale potendosi pertanto dislocare in altri distretti corporei. Le due diverse tipologie di microplastiche sono state pertanto addizionate a due concentrazioni diverse alle diete per zebrafish (0,5 e 0,05 g/kg mangime, diete CTRL, AFP50, AFP500, POL50, POL500; Tabella 2) che sono state formulate partendo da formulazioni note per la specie in oggetto al fine di garantire il corretto apporto di tutti i nutrienti durante la fase sperimentale.

Gruppo sperimentale	*Dieta*	*Polimero*	*Dimensione microplastiche*	*Concentrazione microplastiche*
A	*Dieta CTRL zebrafish (controllo)*	nessun polimero	-	-
B	*Dieta AFP50 zebrafish*	amino formaldehyde polymer - FMV-1.3 (Cospheric)	1-5 µm	0,05 g/kg
C	*Dieta AFP500 zebrafish*	amino formaldehyde polymer - FMV-1.3 (Cospheric)	1-5 µm	0,5 g/kg
D	*Dieta POL50 zebrafish*	Polietilene - UVPMS-BR (Cospheric)	40-47 µm	0,05 g/kg
E	*Dieta POL500 zebrafish*	Polietilene - UVPMS-BR (Cospheric)	40-47 µm	0,5 g/kg

Tabella 2. Schema alimentare per zebrafish.

3.4. Disegno sperimentale

Le larve di zebrafish sono state inizialmente allevate in 15 vasche da 20 litri (3 vasche per gruppo sperimentale con 64 pesci per vasca, 192 per gruppo dietetico) e alimentate con le 5 diete sperimentali. Dopo 30 giorni dalla deposizione delle uova (dps), i pesci di ogni vasca sono stati trasferiti in 15 vasche da 100 L, tre vasche per gruppo sperimentale, dotate di termoregolazione e filtraggio biologico (Panaque, Italia) al fine di mantenere ottimali i parametri chimico-fisici dell'acqua durante tutta la sperimentazione (pH 7, ammoniaca e nitriti assenti, nitrati < 20 mg/L, temperatura 28 °C), dove sono stati allevati per un periodo di 6 mesi, fino al raggiungimento dell'età adulta, alimentandoli con la stessa dieta, due volte al giorno. Lo stato di salute e benessere dei pesci è stato valutato quotidianamente attraverso ispezione visiva.

Tutti gli animali sono stati alimentati con una quantità di cibo giornaliera pari al 3% del peso corporeo (Jovanović et al., 2018).

3.5. Biometria

La lunghezza standard e il peso fresco sono stati misurati per ogni esemplare campionato. La lunghezza standard è stata determinata con calibro Measy 2000 Typ 5921, Svizzera, precisione: 0,1 mm. Il peso è stato valutato con bilancia analitica OHAUS Eplorer (Greifensee, Switzerland), precisione: 0,1 mg.

3.6. Digestione KOH mediata

La digestione di 5 campioni di pacchetto viscerale e di 5 campioni di muscolo per vasca (15 campioni per gruppo sperimentale di pacchetto viscerale e muscolo) è stata eseguita presso il laboratorio di Biologia della Riproduzione e dello sviluppo del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DISVA) dell'Università Politecnica delle Marche (Ancona, Italia). I campioni sono stati conservati a -20°C e pesati prima della digestione. La digestione è avvenuta aggiungendo i campioni a una soluzione pre-filtrata di KOH al 10% (filtro in fibra di vetro, pori da 0,7 µm, Whatman 30 GF/A) realizzata con acqua deionizzata e compresse di KOH (Sigma-Aldrich). La soluzione è stata aggiunta a ciascun campione (rapporto 1:10 p/v) e incubata a 40 °C per 48 ore modificando il protocollo esistente descritto da Di Renzo et al. (2021). Poi, i prodotti della digestione sono stati filtrati su filtri di fibra di vetro (0,7 µm di dimensione dei pori, Whatman GF/A) utilizzando una pompa da vuoto collegata a un imbuto filtrante. Le membrane filtranti sono state essiccate a temperatura ambiente e poste in piastre di Petri di vetro fino all'ispezione visiva per l'identificazione e la caratterizzazione delle particelle di MPs. Per evitare la contaminazione da plastica, i materiali plastici sono stati evitati quando possibile e le superfici di lavoro e gli strumenti di laboratorio sono stati accuratamente e ripetutamente lavati con etanolo al 70% pre-filtrato

durante l'intero processo di digestione e filtrazione. Durante tutte le procedure sono stati indossati camici di cotone, maschere facciali e guanti di lattice monouso.

I filtri di fibra di vetro, una volta asciutti, sono stati analizzati singolarmente utilizzando un microscopio a fluorescenza Zeiss Axio Imager.A2 (Zeiss, Oberkochen, Germania) in modo da indentificare le possibili particelle di MPs fluorescenti derivanti dalle diete sperimentali ingerite dai pesci.

3.7. Microscopia confocale

Durante il campionamento sono stati prelevati 5 campioni di pacchetto viscerale e 5 campioni di muscolo per vasca (15 campioni per gruppo sperimentale di pacchetto viscerale e muscolo) che sono stati immersi in una soluzione di PFA per 24 ore. Successivamente, la soluzione è stata cambiata con PBS 1x fino al momento delle analisi. Tutti i campioni sono stati immersi in una soluzione di glicerolo 50%-PBS1x 50% per l'osservazione al microscopio.

Il microscopio confocale utilizzato per questo studio è stato il Nikon A1R Confocal Laser Microscope, montato su un microscopio invertito Eclipse Ti2 - 40 Ei. Questo strumento opera nel campo degli ingrandimenti della normale microscopia ottica, ma la fonte luminosa utilizzata per eccitare il campione è costituita da uno o più laser, generalmente a semiconduttore, per ogni diversa frequenza di eccitazione richiesta. Il microscopio confocale a scansione integra componenti del microscopio ottico con sistemi di scansione per sezionare otticamente il campione e permette la visualizzazione di un campione biologico ad alta definizione e potenzialmente in 3D.

Il microscopio confocale ha permesso di osservare la presenza delle MPs fluorescenti studiate nei campioni e valutare se queste siano state internalizzate nei diversi tessuti.

3.8. Istologia

Alla fine della sperimentazione, cinque pesci per vasca (15 per gruppo sperimentale) sono stati prelevati in modo casuale. Gli esemplari di zebrafish sono stati immersi interamente in una soluzione di Bouin per essere fissati. Dopo 24 ore a 4 °C, i campioni sono stati lavati tre volte con etanolo al 70% e mantenuti in questa soluzione. Dopo il processo di disidratazione in soluzioni a diluizione decrescente di etanolo (80%, 95%, 100%), i campioni sono stati lavati con xilene (Bio-Optica, Milano, Italia) e inclusi in paraffina (Bio-Optica). I blocchi di paraffina solidificati sono stati tagliati con un microtomo (Leica RM2125 RTS, Nussloch, Germania) e le sezioni da 5 μm sono state colorate con ematossilina Mayer ed eosina Y (Merck KGaA) oppure con Alcian Blue a seconda dell'obiettivo dell'analisi. Le sezioni sono state osservate utilizzando un microscopio Zeiss Axio Imager.A2 (Zeiss, Oberkochen, Germania) e le immagini sono state acquisite utilizzando una fotocamera digitale a colori combinati (Axiocam 105, Zeiss) e analizzate utilizzando il software ZEN 2.3 (Zeiss).

Nei campioni colorati con ematossilina Mayer ed eosina Y (Merck KGaA) è stata effettuata la valutazione morfometrica dell'altezza dei villi intestinali e dello spessore della sottomucosa. Mentre nei campioni colorati con Alcian Blue è stata valutata la presenza e l'abbondanza relativa delle cellule caliciformi mucipare contenti mucine acide.

3.9. Biologia Molecolare

3.9.1. Estrazione RNA e sintesi cDNA

L'RNA totale è stato estratto da campioni di fegato (pool di 3 fegati per campione) e intestino, prelevati da 15 esemplari per gruppo sperimentale utilizzando il reagente RNAzol ™ (Merck KGaA). L'RNA totale estratto è stato diluito in 20 μL di RNAse-free water

(Qiagen). La concentrazione finale di RNA è stata determinata dall'uso di uno spettrofotometro NanoPhotometer P-Class (Implen, München, Germania) e l'integrità dell'RNA è stata verificata mediante GelRed^{TM} evidenziando le bande di RNA ribosomiale 28S e 18S su gel di agarosio all'1%. L'RNA è stato conservato a -80 °C fino all'uso. La sintesi del cDNA è stata eseguita utilizzando il kit di retro-trascrizione di cDNA ad alta capacità (Bio-Rad, Milano, Italia) seguendo le istruzioni del produttore utilizzando 1 μg di RNA totale.

3.9.2. Real-Time PCR

Le analisi PCR sono state eseguite con il metodo SYBR green in un termociclatore iQ5 iCycler (Bio-Rad). Il profilo termico per tutte le reazioni è stato di: 3 min a 95 °C, seguito da 45 cicli di 20s a 95 °C, 20s a Temperatura di Melting diverse a seconda del gene (vedere TM in tabella 3) e 20s a 72 °C. Il segnale fluorescente è stato rilevato alla fine di ogni ciclo ed è stata eseguita l'analisi della curva di melting per confermare che in ogni reazione era presente un solo prodotto della PCR. I controlli negativi non hanno rivelato alcun prodotto di amplificazione e non è stata evidenziata nessuna formazione di dimeri di primer nei bianchi sperimentali.

La quantificazione relativa dell'espressione dei geni coinvolti nella risposta allo stress [glucocorticoid receptor (*nr3c1*), heat shock protein 70 (*hsp70.1*)], nella crescita dei pesci [insulin-like growth factor-1 (*igf1*)] e nella risposta allo stress ossidativo [superoxide dismutase 1 (*sod1*), superoxide dismutase 2 (*sod2*), catalase (*cat)*] è stata eseguita su campioni di fegato. La quantificazione relativa dell'espressione dei geni coinvolti nella risposta infiammatoria [interleukin-1β (*il1b*), interleukin-10 (*il10*), tumor necrosis factor alpha (*tnfα*)] e dell'appetito [ghrelin (*ghrl*)] è stata eseguita su campioni di intestino. I geni ribosomal protein L13 (*rpl13*) e actin related protein 2/3 complex, subunit 1A (*arpc1a*) sono

stati utilizzati come geni housekeeping per standardizzare i risultati. Le sequenze dei primer utilizzati sono riportate nella Tabella 3. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software iQ5 versione 2.0 (Bio-Rad) che include i file GeneEx Macro iQ5 Conversion e GeneEx Macro iQ5.

Geni	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Numero ID	TM(°C)
nr3c1	5'-AGACCTTGGTCCCCTTCACT-3'	5'-CGCCTTTAATCATGGGAGAA-3'	ZDB-GENE-050522-503	58
hsp70.1	5'-TGTTCAGTTCTCTGCCGTTG-3'	5'-AAAGCACTGAGGGACGCTAA-3'	ZDB-GENE-990415-91	58
igf1	5'-GGCAAATCTCCACGATCTCTAC-3'	5'-CGGTTTCTCTTGTCTCTCTCAG-3'	ZDB-GENE-010607-2	53
sod1	5'- GTCGTCTGGCTTGTGGAGTG-3'	5'- TGTCAGCGGGCTAGTGCTT-3'	ZDB-GENE-990415-258	60
sod2	5'-CCGGACTATGTTAAGGCCATCT-3'	5'-ACACTCGGTTGCTCTCTTTTCTCT-3'	ZDB-GENE-030131-7742	60
cat	5'-CCAAGGTCTGGTCCCATAA-3'	5'-GCACATGGGTCCATCTCTCT-3'	ZDB-GENE-030131-7742	60
il1b	5'-GCTGGGGATGTGGACTTC-3'	5'-GTGGATTGGGGTTTGATGTG-3'	ZDB-GENE-040702-2	54
il10	5'-ATTTGTGGAGGGCTTTCCTT-3'	5'-AGAGCTGTTGGCAGAATGGT-3'	ZDB-GENE-051111-1	56
tnfα	5'-TTGTGGTGGGGTTTGATG-3'	5'-TTGGGGCATTTTATTTTGTAAG-3'	ZDB-GENE-050317-1	53
ghrl	5'-CAGCATGTTTCTGCTCCTGTG-3'	5'-TCTTCTGCCCACTCTTGGTG-3'	ZDB-GENE-070622-2	58
rpl13 (HK)	5'-TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC-3'	5'-AGACGCACAATCTTGAGAGCAG-3'	ZDB-GENE-031007-1	59
arpc1a(HK)	5'-CTGAACATCTCGCCCTTCTC-3'	5'-TAGCCGATCTGCAGACACAC-3'	ZDB-GENE-040116-1	60

Tabella 3. Sequenze di primer e numeri di identificazione. (HK) = geni housekeeping

3.10. Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il pacchetto software Prism 8 (software GraphPad).

I dati relativi alle biometrie, all'analisi istologica e alla quantificazione relativa dell'espressione genica sono stati analizzati attraverso l'analisi della varianza a una via (one-way ANOVA) seguita dal test di Tukey. L'ipotesi di normalità è stata verificata utilizzando

il test di Shapiro Wilk. Tutti i dati sono stati espressi come media ± deviazione standard (SD). La significativa è stata settata a $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1. Biometria

Per quanto riguarda la lunghezza standard (Fig. 2a), gli zebrafish dei gruppi POL50 e POL500 hanno mostrato valori significativamente più bassi ($p < 0.05$) rispetto a quelli dei gruppi CTRL, AFP50 e AFP500. Considerando il peso fresco (Fig. 2b), non sono state evidenziate differenze significative tra i gruppi sperimentali.

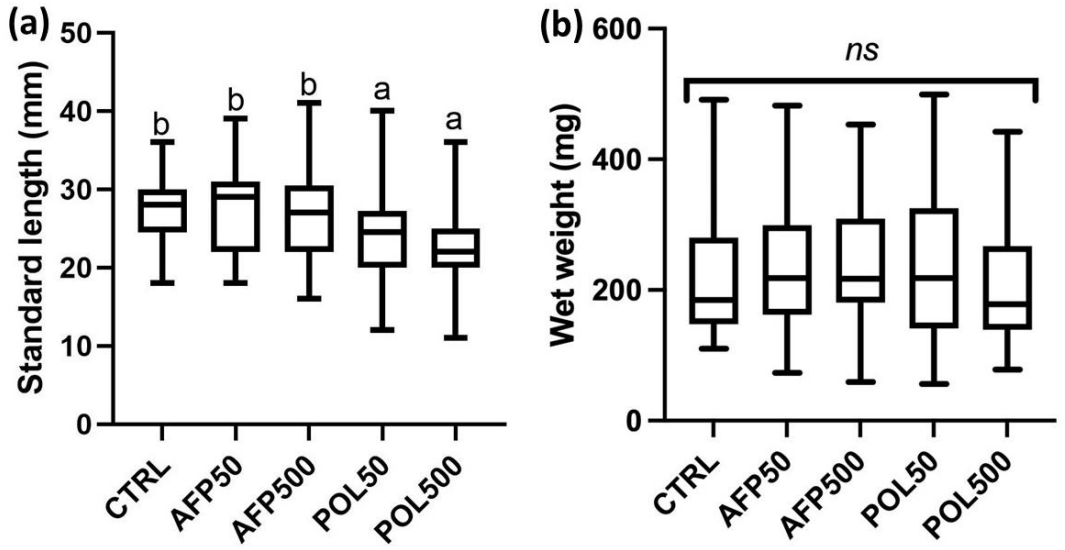

Figura 2: (a) lunghezza standard (mm) e (b) peso fresco (mg) di zebrafish adulti. Le lettere differenti indicano differenze significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0.05$). I valori sono presentati come media ± deviazione standard (n=40).

4.2. Analisi istologiche

I campioni di intestino provenienti dai diversi gruppi sperimentali hanno evidenziato una normale architettura dell'epitelio assorbente, senza alterazioni patologiche o segni di infiammazione. I risultati derivanti dall'applicazione degli indici isto-patologici dell'intestino sono riportati nella Tabella 4.

Tabella 4. Indici istologici (altezza villi intestinali, abbondanza di cellule caliciformi mucipare e presenza di infiammazione) misurati nell'intestino di zebrafish alimentati con diete sperimentali.

	CTRL	AFP50	AFP500	POL50	POL500
Altezza villi intestinali (μm)	123.8 ± 9.0	125.2 ± 11.2	123 ± 26.8	91.2 ± 8.7	90.9 ± 14.3
Cellule caliciformi mucipare	+	++	++	++	+++
Infiammazione	-	-	-	-	-

I valori dell'altezza dei villi sono mostrati come media ± DS (n = 15). Punteggi cellule caliciformi mucipare in base al numero medio presente per villo: + = <3, ++ = 3-6, +++=<6. Assenza di eventi infiammatori = -.

Per quanto riguarda l'altezza dei villi intestinali (Fig. 3), i gruppi POL50 e POL500 hanno mostrato un valore significativamente più basso rispetto ai gruppi CTRL, AFP50 e AFP500.

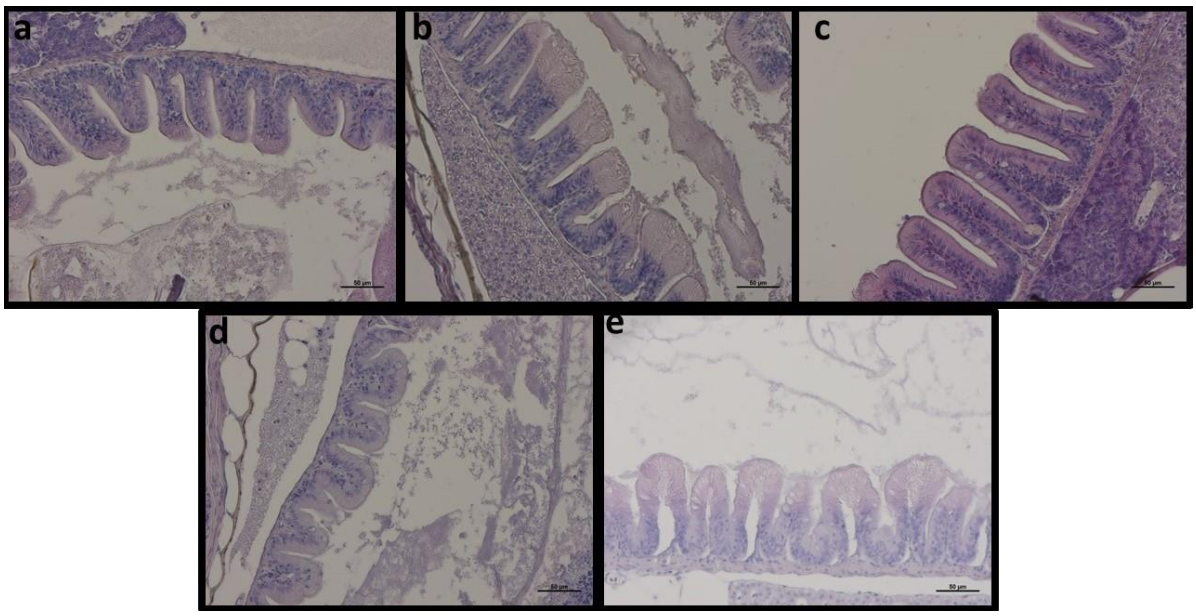

Figura 3. Istomorfologia dell'intestino di zebrafish adulti alimentati con diete sperimentali: (a) CTRL, (b) AFP50, (c) AFP500, (d) POL50 e (e) POL500. Scale bar = 50 μm.

Sono state osservate differenze significative nell'abbondanza di cellule mucipare (Fig.4) tra il gruppo CTRL, dove sono meno presenti, e il gruppo POL500 ($p < 0.05$), il gruppo con più abbondanza.

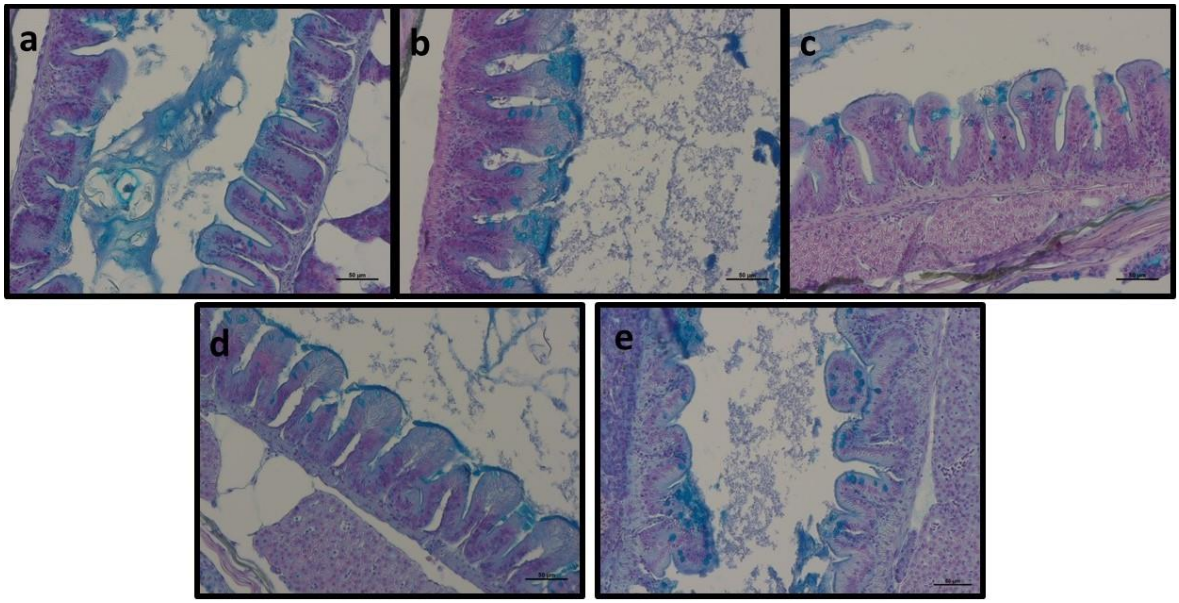

Figura 4. Istomorfologia dell'intestino di zebrafish adulti alimentati con diete sperimentali in cui sono evidenziate le cellule caliciformi mucipare: (a) CTRL, (b) AFP50, (c) AFP500, (d) POL50 e (e) POL500. Scale bar = 50 μm.

I risultati ottenuti dalle analisi istologiche sul fegato hanno mostrato una normale struttura del parenchima epatico e una bassa quantità di accumulo lipidico in tutti i gruppi sperimentali (Figura 5).

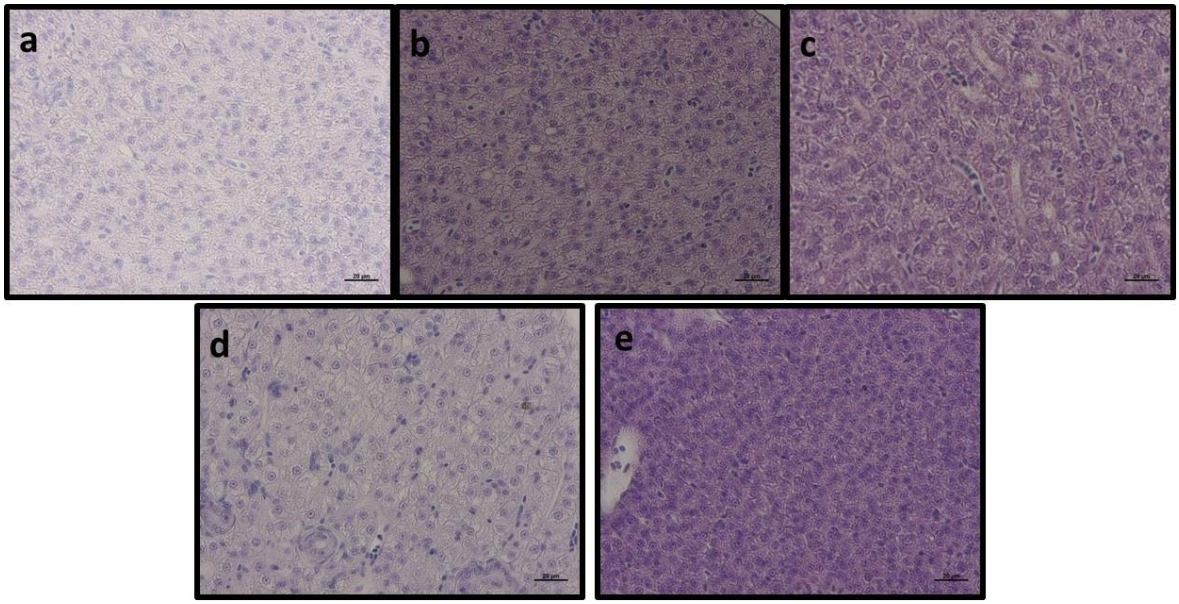

Figura 5. Immagini istologiche rappresentative del parenchima epatico di zebrafish adulti alimentati con diete sperimentali: (a) CTRL, (b) AFP50, (c) AFP500, (d) POL50 e (e) POL500. Scale bar = 20 μm.

4.3. Rilevamento MPs

L'analisi effettuata tramite microscopia confocale nei campioni di intestino di zebrafish (Fig.6) ha rivelato la presenza di MPs solo nei gruppi AFP50 (Fig.6b) e AFP500 (Fig.6c) (taglia 1-5 µm).

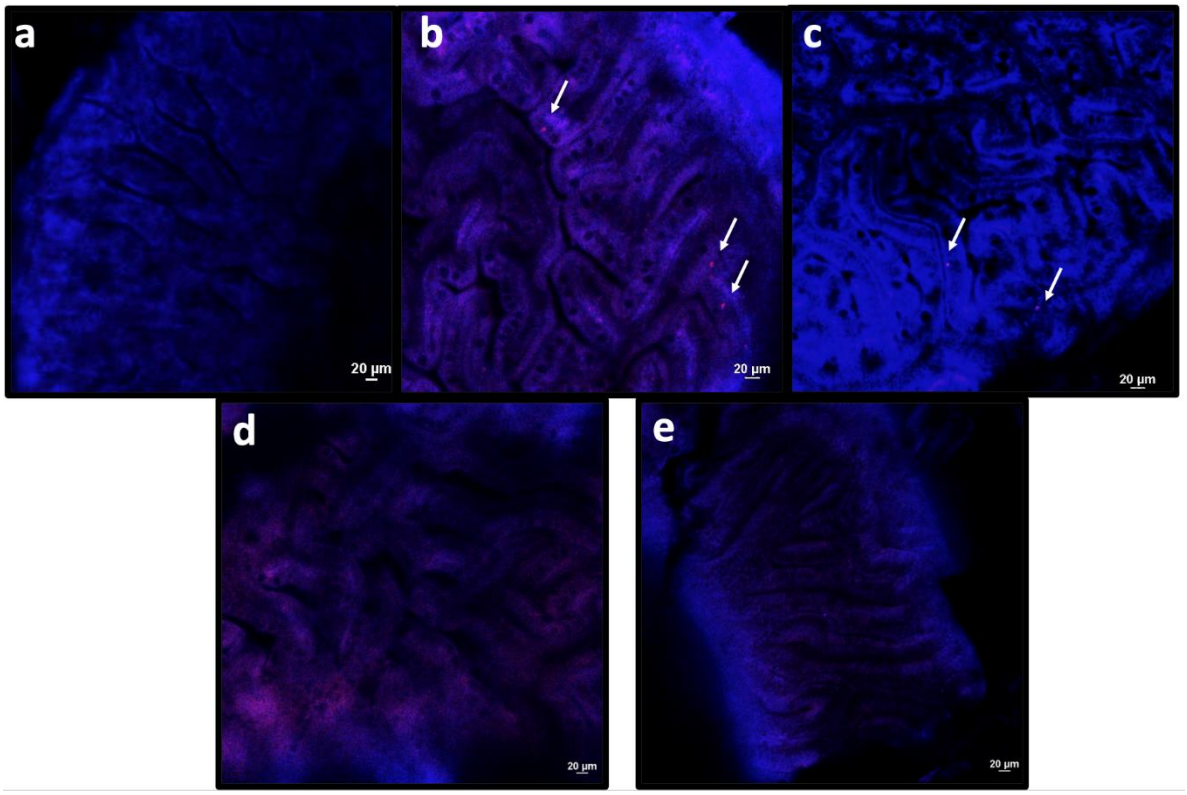

Figura 6. Immagini dell'intestino di zebrafish alimentati con diete sperimentali: (a) CTRL, (b) AFP50, (c) AFP500, (d) POL50 e (e) POL500. Scale bar = 20 µm. Le MPs sono rappresentate dai punti rossi (indicati con le frecce bianche).

Anche le analisi effettuate sul parenchima epatico (Fig.7) hanno evidenziato la presenza delle stesse MPs solo nei gruppi AFP50 (Fig.7b) e AFP500 (Fig.7c).

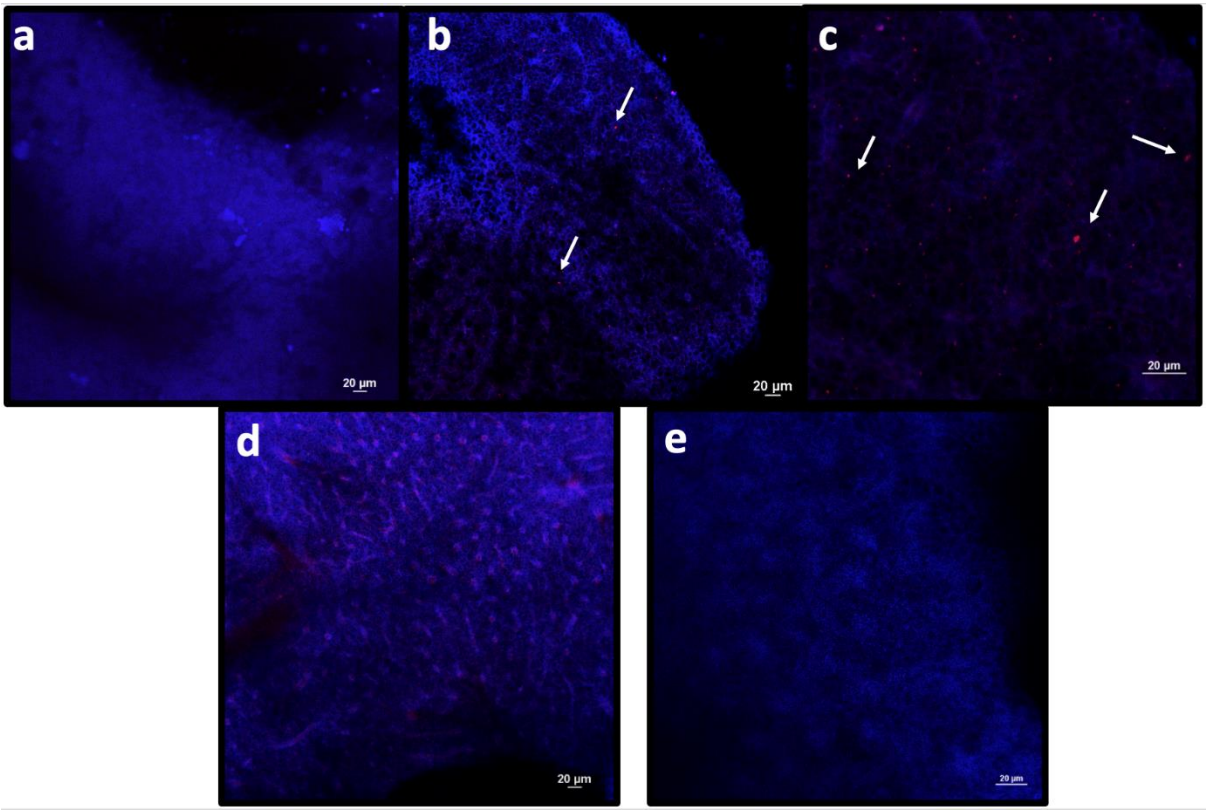

Figura 7. Immagini del parenchima epatico di zebrafish adulti alimentati con diete sperimentali: (a) CTRL, (b) AFP50, (c) AFP500, (d) POL50 e (e) POL500. Scale bar = 20 µm. Le MPs sono rappresentate dai punti rossi (indicati con le frecce bianche).

Anche nei campioni di muscolo (Fig.8), è stata riscontrata la presenza di MPs di taglia 1-5 µm solo nei gruppi AFP50 (Fig.8b) e AFP500 (Fig.8c).

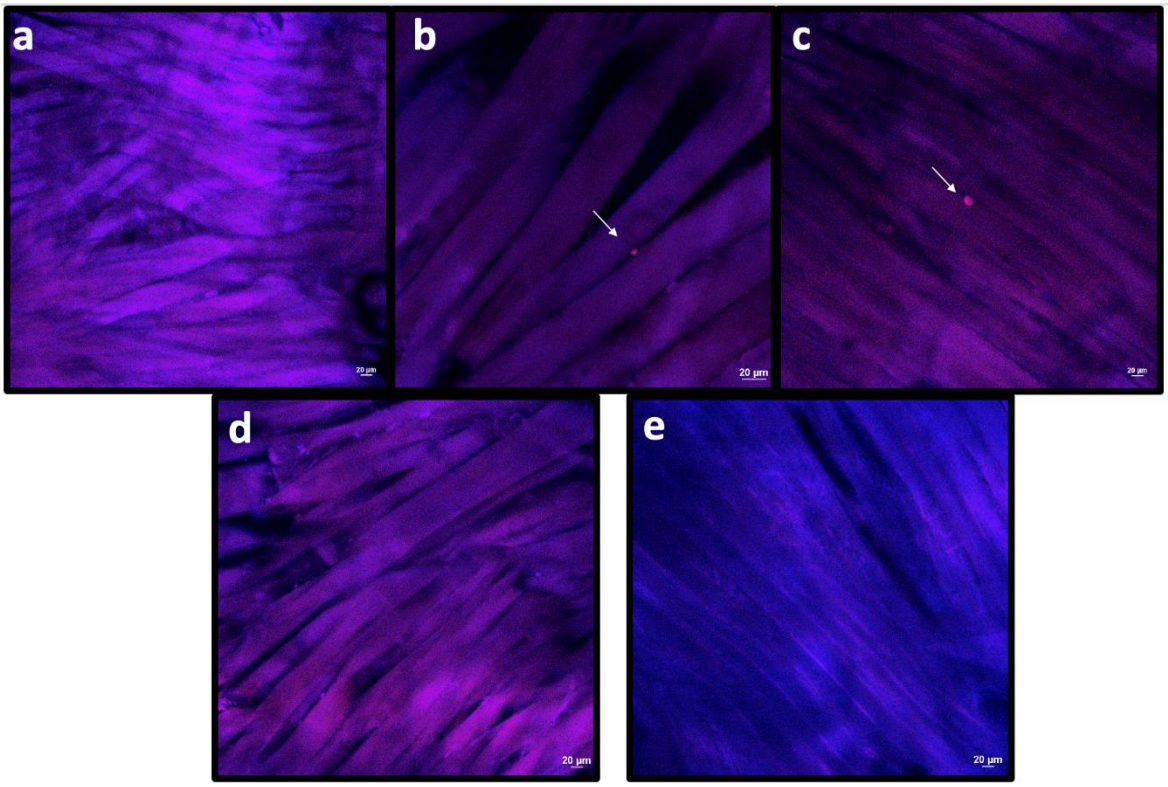

Figura 8. Immagini di muscolo di zebrafish adulti alimentati con diete sperimentali: (a) CTRL, (b) AFP50, (c) AFP500, (d) POL50 e (e) POL500. Scale bar = 20 µm. Le MPs sono rappresentate dai punti rossi (indicati con le frecce bianche).

4.4. Quantificazione delle MP

Dopo la digestione KOH 10% mediata dei campioni presi, è stata effettuata l'analisi dei filtri in fibra di vetro, che ha evidenziato (Tab.5) che, nei pacchetti viscerali, il contenuto di MPs trovate nel gruppo AFP500 sia significativamente maggiore rispetto a tutti gli altri gruppi. Mentre e analisi effettuate sui campioni di muscolo non hanno differenze significative tra i vari gruppi.

Tabella 5. Contenuto di MPs nei campioni di zebrafish adulti. I risultati sono espressi come media ± DS (n = 3). ns: nessuna differenza significativa. Lettere diverse nella stessa riga indicano differenze significative ($p < 0.05$).

	CTRL	AFP50	AFP500	POL50	POL500
Pacchetto viscerale (n/campione)	0^{a}	31.83 ± 23.8^{a}	5634 ± 2210^{b}	0.3333 ± 0.5774^{a}	0.5556 ± 0.5092^{a}
Muscolo (n/campione)	0^{ns}	2 ± 2^{ns}	48 ± 40.29^{ns}	0^{ns}	0^{ns}

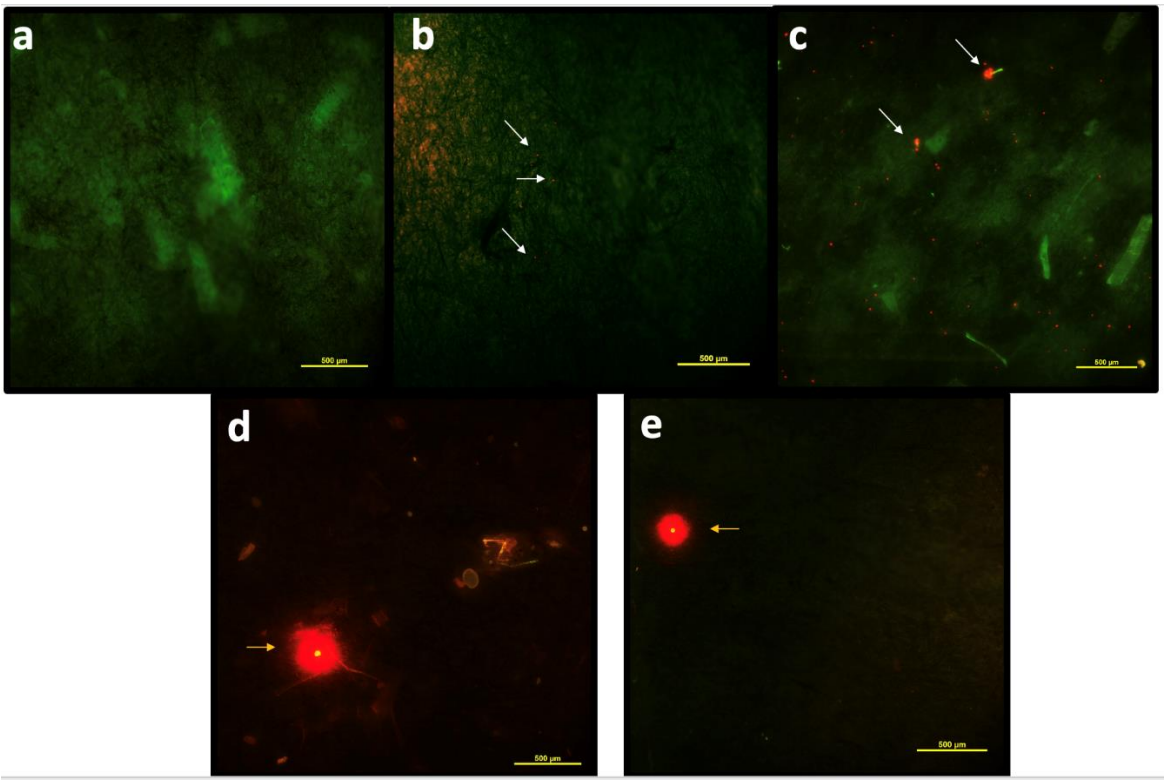

Figura 9 Immagini rappresentative della quantificazione MPs presenti nel pacchetto viscerale tramite microscopio a fluorescenza: (a) CTRL, (b) AFP50, (c) AFP500, (d) POL50 e (e) POL500. Scale bar = 200 µm. Le MPs sono rappresentate dai punti rossi (AFP indicate con frecce bianche, POL indicate con frecce gialle).

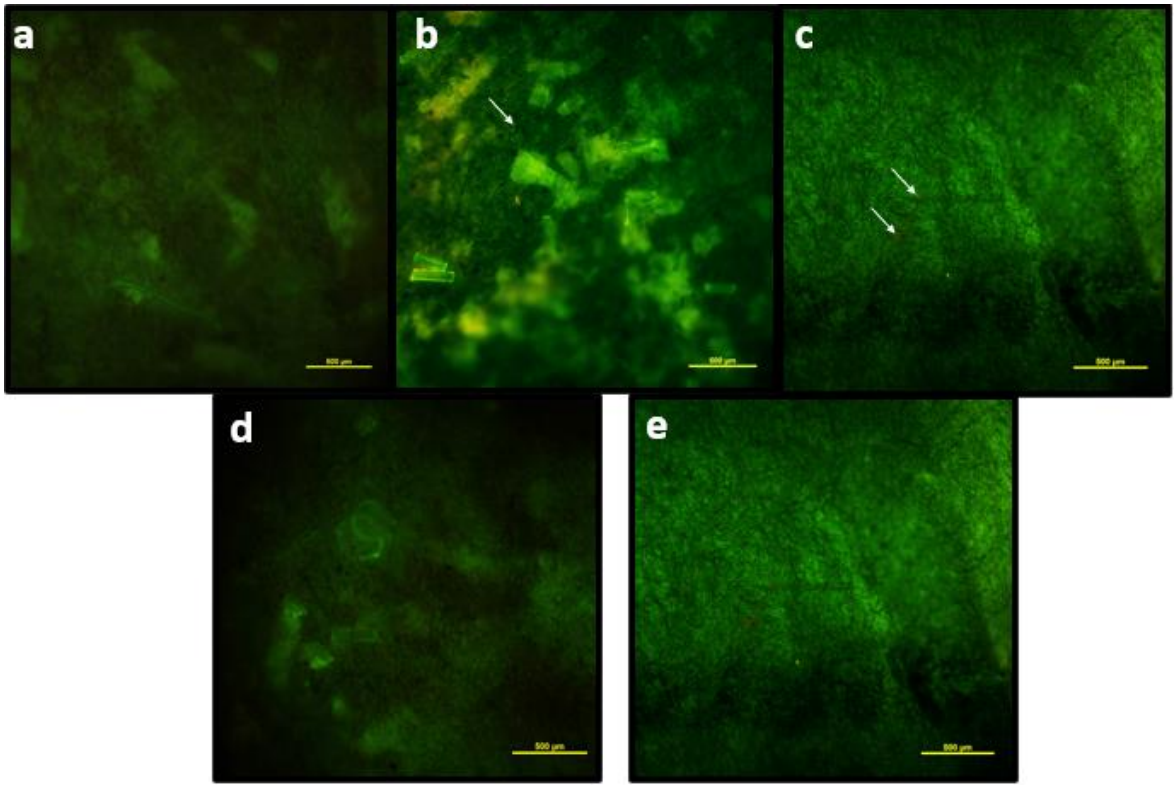

Figura 10. Immagini rappresentative della quantificazione MPs presenti nel muscolo tramite microscopio a fluorescenza: (a) CTRL, (b) AFP50, (c) AFP500, (d) POL50 e (e) POL500. Scale bar = 200 μm. Le MPs sono rappresentate dai punti rossi (AFP indicate con frecce bianche, POL indicate con frecce gialle).

4.5. Espressione genica

4.5.1. Fattori di crescita

L'espressione del gene *igf1* (Fig.11) ha evidenziato un valore significativamente più alto nel gruppo POL500 rispetto al gruppo CTRL.

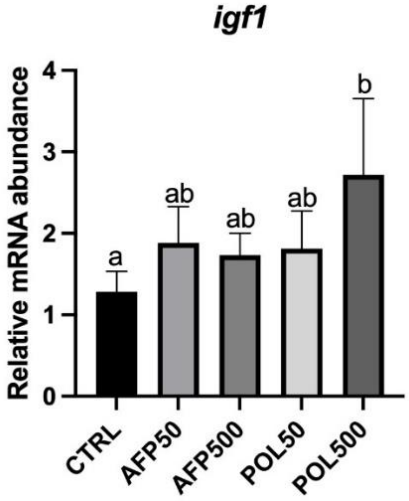

Figura 11. Abbondanza relativa di mRNA del gene *igf1* coinvolto nella crescita analizzato in campioni di fegato di zebrafish adulti alimentati con diete sperimentali. I valori sono mostrati come media ± DS (n = 9). Lettere diverse indicano differenze significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0.05$).

4.5.2. Marker di risposta allo stress.

L'espressione dei geni *hsp70.1* e *nr3c1* (Fig.12), analizzati nel fegato, ha mostrato dei valori significativamente più alti nei gruppi AFP50 e AFP500 rispetto agli altri gruppi sperimentali.

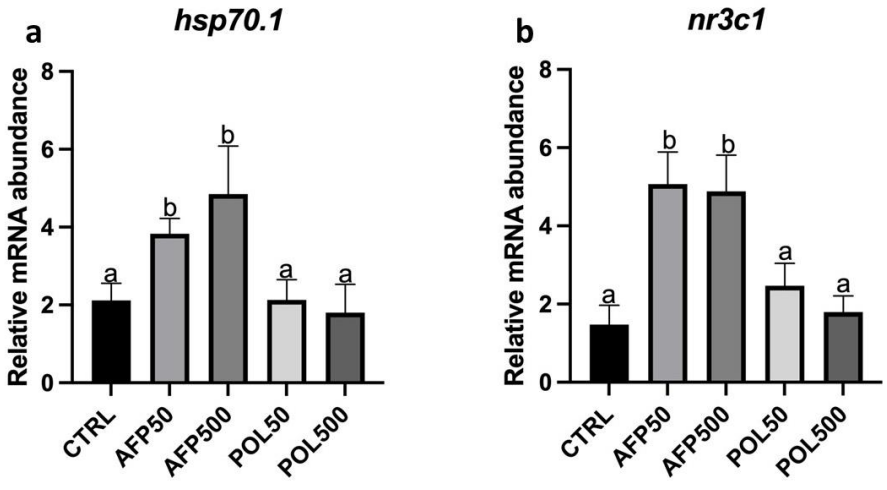

Figura 12. Abbondanza relativa di mRNA dei geni coinvolti nella risposta allo stress analizzati in campioni di fegato di zebrafish adulti alimentati con diete sperimentali. (a) *hsp70.1* e (b) *nr3c1*. I valori sono mostrati come media ± DS (n = 9). Lettere diverse indicano differenze significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0.05$).

4.5.3. Stress ossidativo.

Considerando l'espressione genica dei geni *cat* e *sod2* analizzati nel fegato (Figura 13a-c), sono stati osservati dei valori significativamente più alti nei gruppi AFP50 e AFP500 rispetto agli altri gruppi sperimentali. Per quanto riguarda il gene *sod1* (Figura 12b) il gruppo CTRL ha evidenziato un valore significativamente più basso rispetto agli altri gruppi sperimentali

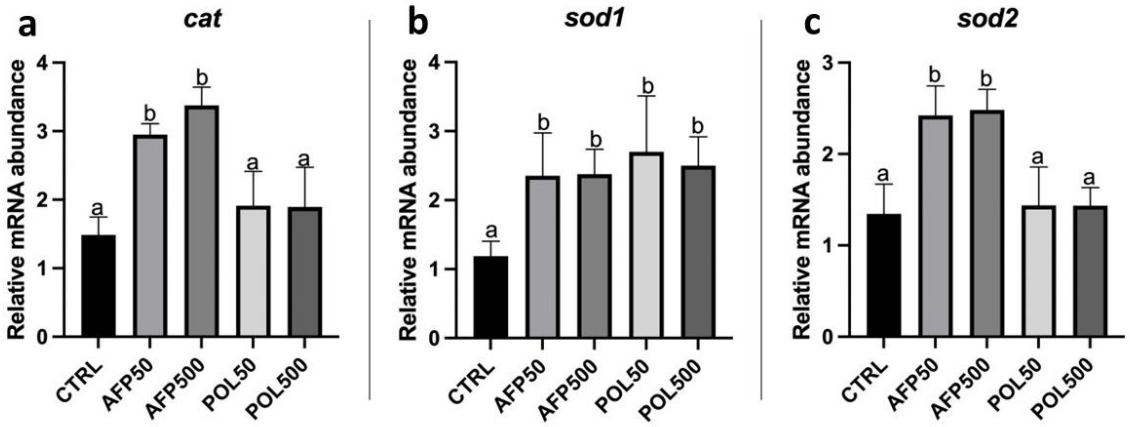

Figura 13. Abbondanza relativa di mRNA dei geni coinvolti nella risposta allo stress ossidativo analizzati in campioni di fegato di zebrafish adulti alimentati con diete sperimentali. (a) *cat*, (b) *sod1*, (c) *sod2*. I valori sono mostrati come media ± DS (n = 9). Lettere diverse indicano differenze significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0.05$).

4.5.4. Risposta immunitaria.

Considerando l'espressione genica dei geni *il1b*, *il10* e *tnfα* (Figura 14), analizzati nell'intestino, non sono state rilevate differenze significative tra i gruppi sperimentali.

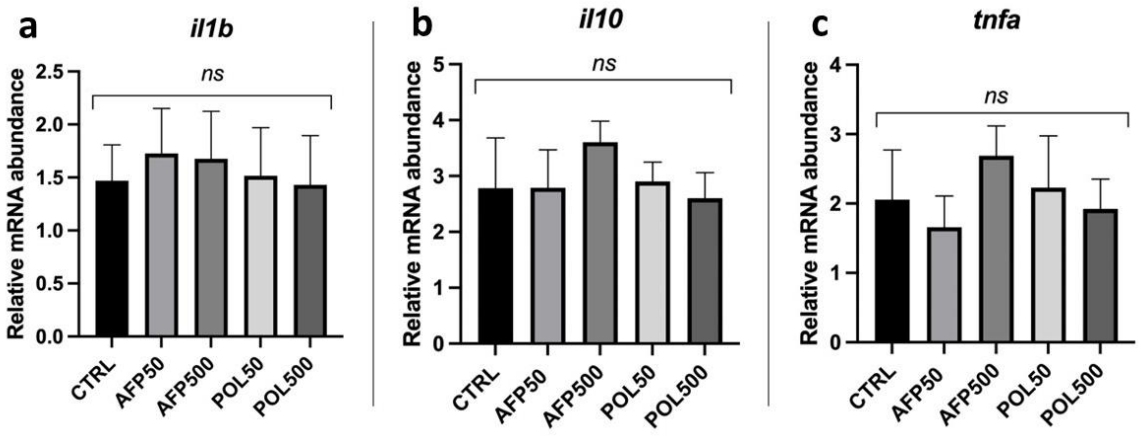

Figura 14. Abbondanza relativa di mRNA dei geni coinvolti nella risposta immunitaria analizzati in campioni d'intestino di zebrafish adulti alimentati con diete sperimentali. (a) *il1b*, (b) *il10*, (c) *tnfα*. I valori sono mostrati come media ± DS (n = 9). ns: nessuna differenza significativa. Lettere diverse indicano differenze significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0.05$).

4.5.5. Appetito

Considerando l'espressione genica del gene *ghrl* (Figura 15) analizzato nell'intestino, sono stati osservati dei valori significativamente più alti nei gruppi CTRL e POL50 rispetto agli altri gruppi spetAFP50, AFP500 e POL500.

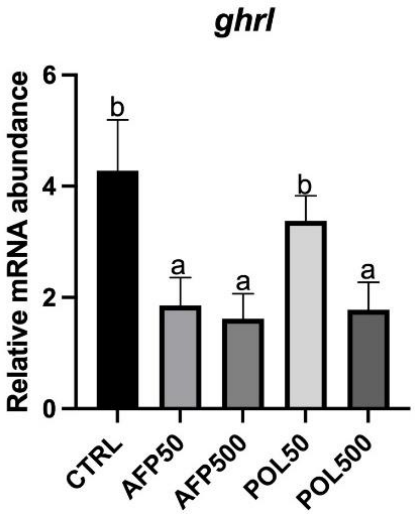

Figura 15. Abbondanza relativa di mRNA del gene *ghrl* coinvolto nell'appetito analizzati in campioni d'intestino di zebrafish adulti alimentati con diete sperimentali. I valori sono mostrati come media ± DS (n = 9). ns: nessuna differenza significativa. Lettere diverse indicano differenze significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0.05$).

5. DISCUSSIONE

L'inquinamento da microplastiche è un problema attuale e in continuo aumento con potenziali ripercussioni sia sul benessere delle specie allevate sia sulla salute umana (GESAMP, 2015). La contaminazione in allevamento può derivare dalla presenza di MPs nel mangime consumato, introdotte durante i vari processi di fabbricazione, lavorazione, produzione, trasporto, conservazione e vendita (Gündoğdu et al., 2021). Inoltre, le MPs sono presenti nella componente principale di questi mangimi, la farina di pesce, derivata direttamente dal pesce pescato in un mare sempre più contaminato dalla presenza di queste particelle (Karbalaei et al., 2020). La qualità e la sicurezza del prodotto ittico allevato, potenzialmente soggetto a una fonte diretta di contaminazione da MPs contenute nei mangimi, sono strettamente correlate alla salute non solo dei pesci ma anche del consumatore (Vethaak & Leslie, 2016).

Pertanto, il seguente studio ha avuto lo scopo di formulare diete specifiche contenenti due diversi polimeri aventi diversa dimensione e a due diverse concentrazioni per ogni polimero, andando a valutare le performance di crescita, il benessere e l'accumulo delle MPs in relazione a taglia e concentrazione negli individui adulti dello zebrafish (*Dario rerio*) usato come organismo modello.

La somministrazione delle diete sperimentali non ha influenzato le performance di crescita degli zebrafish in termini di peso fresco, ma ha portato ad una riduzione della lunghezza standard nei gruppi alimentati con diete POL. Tale risultato è in accordo con quanto osservato nello studio di Cormier et al., 2021 ma è in contrasto con quanto visto da Tarasco et al., 2022 sempre su esemplari di zebrafish alimentati con diete incluse con microplastiche. Nel caso di Tarasco et al. i pesci a 90 giorni dopo la schiusa presentavano significative

riduzioni del peso e della lunghezza, probabilmente dovute alla diversa concentrazione delle MPs nei mangimi, che in questa sperimentazione erano maggiori.

I risultati delle biometrie non risultano in accordo con l'espressione del gene *igf1*, coinvolto nella crescita. Questo risultato può essere spiegato dalla natura pleiotropica di questo ormone che, negli esemplari adulti, è coinvolto in numerose altre funzioni.

Pur non influenzando le performance di crescita, i due polimeri somministrati hanno causato degli effetti sui principali organi target a seconda del loro range dimensionale. A livello intestinale il transito dei due polimeri non ha causato eventi infiammatori, come osservato grazie alle analisi istologiche e dal fatto che i marker molecolari della risposta immunitaria (*il1b, il10* e *tnfα*) analizzati non mostrano differenze significative di espressione. Tuttavia, sempre a livello intestinale si è osservata una alterazione dell'espressione del gene *ghrl,* coinvolto nell'appetito. Ciò potrebbe mostrare come i mangimi inclusi con microplastiche creino un senso di sazietà che non si manifesta nel gruppo CTRL. Il polimero POL, tuttavia, non è stato riscontrato nei villi dalla microscopia confocale e dalla digestione KOH-mediata, indipendentemente dalla concentrazione, suggerendo quindi un semplice transito di tali MPs. Tuttavia, questo transito ha determinato, negli animali dei gruppi POL50 e POL500 un accorciamento significativo dei villi (probabilmente a causa di un'azione abrasiva) e ad un aumento delle cellule mucipare implicate nella lubrificazione del tratto intestinale.

Il polimero AFP invece è stato ritrovato non solo nei villi intestinali ma anche a livello epatico, indice di una traslocazione delle MPs dall'intestino al fegato via circolo ematico e linfatico. Le analisi effettuate con la microscopia confocale e la quantificazione delle MPs mediante digestione, hanno mostrato un accumulo a livello intestinale ed epatico dose-dipendente. Inoltre, nel fegato dei pesci appartenenti ai gruppi AFP50 e AFP500 la presenza

di MPs ha causato effetti sull'espressione dei marker molecolari correlati alla regolazione dello stress (*hsp70.1* e *nr3c1*) e dello stress ossidativo (geni *cat* e *sod2).* La letteratura disponibile mostra risultati contrastanti. Altri studi effettuati sempre su zebrafish (Y. Lu et al., 2016a) o su specie di importanza commerciale come l'orata (*Sparus aurata*) (Capó et al., 2021) hanno evidenziato un aumento dello stress ossidativo in pesci alimentati con diete contenenti microplastiche. D'altra parte, studi condotti su spigola (*Dicentrarchus labrax)* dopo 3 settimane di esposizione a MPs alimentari non hanno mostrato un aumento nell'espressione dei geni correlati allo stress ossidativo (Espinosa et al., 2019). L'assenza di differenze nell'espressione genica è stata osservata anche nella triglia striata (*Mullus surmuletus*) quando si sono confrontati pesci con MPs presenti nel loro tratto digestivo con pesci senza MPs (Alomar et al., 2017). Tuttavia, tutti questi studi sono stati condotti o in brevi periodi di esposizione alle MPs, o con un'ampia gamma di concentrazioni o su campioni raccolti in natura, sottolineando come sia ancora necessario approfondire le conoscenze in questo ambito per avere risultati più solidi e consistenti.

Nel presente studio è poi emerso un dato potenzialmente allarmante per i consumatori di pesce: i pesci appartenenti ai gruppi AFP mostravano MP anche tra le fibre muscolari in accordo con uno studio di Zeytin et al., 2020 effettuato sulla spigola (*Dicentrarchus labrax*) con una dieta arricchita con MPs, aventi taglia 1-5 μm e condotto per 16 settimane.

6. CONCLUSIONI

Il presente studio ha evidenziato che le diete contenenti MPs di diverse dimensioni non incidono negativamente sulle performance di crescita degli zebrafish, ma a seconda delle dimensioni del polimero associato al mangime possono avere degli effetti negativi sugli animali esposti.

Mentre il polimero di dimensioni maggiori non è in grado di essere assorbito a livello intestinale e quindi esercita una semplice azione abrasiva a livello dei villi, il polimero di più piccole dimensioni, viene inizialmente internalizzato nei villi intestinali e successivamente accumulato a livello del fegato. Il transito nell'intestino è solo temporaneo e questo dato è confermato dall'assenza di infiammazione intestinale, mentre il danno a livello epatico è più marcato in quanto il suo accumulo causa un aumento della risposta allo stress ossidativo. Inoltre, il polimero più piccolo è presente anche a livello del filetto, dato di particolare interesse per i consumatori, in quanto parte edibile dei pesci allevati. Quindi l'incidenza delle microplastiche può non essere solo limitata al benessere animale ma costituisce un potenziale rischio anche per la salute umana. In conclusione, i risultati ottenuti nel seguente studio offrono le basi per approfondire il tema delle microplastiche in acquacoltura, su cui attualmente le conoscenze sono piuttosto limitate. Queste possono essere implementate, ad esempio, considerando altri organi target oltre quelli presi in esame in questo lavoro.

BIBLIOGRAFIA

Alomar, C., Sureda, A., Capó, X., Guijarro, B., Tejada, S., & Deudero, S. (2017). Microplastic ingestion by Mullus surmuletus Linnaeus, 1758 fish and its potential for causing oxidative stress. *Environmental Research*, *159*, 135–142. https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.043

Andrady, A. L., & Neal, M. A. (2009). Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *364*(1526), 1977–1984. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0304

Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., D'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., & Regoli, F. (2015). Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*, *198*, 211–222. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.021

Avio, C. G., Gorbi, S., & Regoli, F. (2017). Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Marine Environmental Research*, *128*, 2–11. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.05.012

Barboza, L. G. A., Dick Vethaak, A., Lavorante, B. R. B. O., Lundebye, A. K., & Guilhermino, L. (2018). Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 133, pp. 336–348). Pergamon. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.047

Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *364*(1526), 1985–1998. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205

Batel, A., Linti, F., Scherer, M., Erdinger, L., & Braunbeck, T. (2016). Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to Artemia nauplii and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *35*(7), 1656–1666. https://doi.org/10.1002/etc.3361

Bergmann, M., Gutow, L., & Klages, M. (2015). Marine anthropogenic litter. In *Marine Anthropogenic Litter*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3

Bhagat, J., Ingole, B. S., & Singh, N. (2016). Glutathione s-transferase, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and lipid peroxidation as biomarkers of oxidative stress in snails: A review. In *Invertebrate Survival Journal* (Vol. 13, Issue 1, pp. 336–349). https://doi.org/10.25431/1824-307X/ISJ.V13I1.336-349

Brillant, M. G. S., & MacDonald, B. A. (2000). Postingestive selection in the sea scallop, Placopecten magellanicus (Gmelin): The role of particle size and density. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *253*(2), 211–227. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00258-6

Browne, M. A., Chapman, M. G., Thompson, R. C., Amaral Zettler, L. A., Jambeck, J., & Mallos, N. J. (2015). Spatial and Temporal Patterns of Stranded Intertidal Marine Debris: Is There a Picture of Global Change? In *Environmental Science and Technology* (Vol. 49, Issue 12, pp. 7082–7094). American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/es5060572

Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., & Thompson, R. (2011). Accumulation of microplastic on shorelines woldwide: Sources and sinks. *Environmental Science and Technology*, *45*(21), 9175–9179. https://doi.org/10.1021/ES201811S/ASSET/IMAGES/MEDIUM/ES-2011-01811S_0003.GIF

Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., & Thompson, R. C. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, Mytilus edulis (L.). *Environmental Science and Technology*, *42*(13), 5026–5031. https://doi.org/10.1021/es800249a

Campos, D., Rodrigues, A. C. M., Rocha, R. J. M., Martins, R., Candeias-Mendes, A., Castanho, S., Soares, F., Pousão-Ferreira, P., Soares, A. M. V. M., Gravato, C., & Silva, A. L. P. (2021). Are microplastics impairing marine fish larviculture?—preliminary results with argyrosomus regius. *Water (Switzerland)*, *13*(1), 104. https://doi.org/10.3390/w13010104

Canals, M., Company, J. B., Martín, D., Sànchez-Vidal, A., & Ramírez-Llodrà, E. (2013). Integrated study of Mediterranean deep canyons: Novel results and future challenges. In *Progress in Oceanography* (Vol. 118, pp. 1–27). Pergamon. https://doi.org/10.1016/j.pocean.2013.09.004

Capillo, G., Silvestro, S., Sanfilippo, M., Fiorino, E., Giangrosso, G., Ferrantelli, V., Vazzana, I., & Faggio, C. (2018). Assessment of Electrolytes and Metals Profile of the Faro Lake (Capo Peloro Lagoon, Sicily, Italy) and Its Impact on Mytilus galloprovincialis. *Chemistry and Biodiversity*, *15*(5). https://doi.org/10.1002/cbdv.201800044

Capó, X., Company, J. J., Alomar, C., Compa, M., Sureda, A., Grau, A., Hansjosten, B., López-Vázquez, J., Quintana, J. B., Rodil, R., & Deudero, S. (2021). Long-term exposure to virgin and seawater exposed microplastic enriched-diet causes liver oxidative stress and inflammation in gilthead seabream Sparus aurata, Linnaeus 1758. *Science of the Total Environment*, *767*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.144976

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. In *Environment International* (Vol. 115, pp. 400–409). Environ Int. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.007

Cau, A., Avio, C. G., Dessì, C., Moccia, D., Pusceddu, A., Regoli, F., Cannas, R., & Follesa, M. C. (2020). Benthic Crustacean Digestion Can Modulate the Environmental Fate of Microplastics in the Deep Sea. *Environmental Science and Technology*, *54*(8), 4886–4892. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07705

Chen, G., Feng, Q., & Wang, J. (2020). Mini-review of microplastics in the atmosphere and

their risks to humans. In *Science of the Total Environment* (Vol. 703, p. 135504). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135504

Chen, M., Jin, M., Tao, P., Wang, Z., Xie, W., Yu, X., & Wang, K. (2018). Assessment of microplastics derived from mariculture in Xiangshan Bay, China. *Environmental Pollution*, *242*(Pt B), 1146–1156. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.133

Chen, Z. Y., Li, N. J., Cheng, F. Y., Hsueh, J. F., Huang, C. C., Lu, F. I., Fu, T. F., Yan, S. J., Lee, Y. H., & Wang, Y. J. (2020). The effect of the chorion on size-dependent acute toxicity and underlying mechanisms of amine-modified silver nanoparticles in zebrafish embryos. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(8). https://doi.org/10.3390/ijms21082864

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 and Technology*, *49*(2), 1130–1137. https://doi.org/10.1021/es504525u

Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental Science and Technology*, *47*(12), 6646–6655. https://doi.org/10.1021/es400663f

Cormier, B., Le Bihanic, F., Cabar, M., Crebassa, J. C., Blanc, M., Larsson, M., Dubocq, F., Yeung, L., Clérandeau, C., Keiter, S. H., Cachot, J., Bégout, M. L., & Cousin, X. (2021). Chronic feeding exposure to virgin and spiked microplastics disrupts essential biological functions in teleost fish. *Journal of Hazardous Materials*, *415*, 125626. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125626

Courtene-Jones, W., Quinn, B., Gary, S. F., Mogg, A. O. M., & Narayanaswamy, B. E. (2017). Microplastic pollution identified in deep-sea water and ingested by benthic invertebrates in the Rockall Trough, North Atlantic Ocean. *Environmental Pollution*, *231*(Pt 1), 271–280. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.026

Cutroneo, L., Reboa, A., Besio, G., Borgogno, F., Canesi, L., Canuto, S., Dara, M., Enrile, F., Forioso, I., Greco, G., Lenoble, V., Malatesta, A., Mounier, S., Petrillo, M., Rovetta, R., Stocchino, A., Tesan, J., Vagge, G., & Capello, M. (2020). Microplastics in seawater: sampling strategies, laboratory methodologies, and identification techniques applied to port environment. In *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 27, Issue 9, pp. 8938–8952). Springer. https://doi.org/10.1007/s11356-020-07783-8

Davidson, K., & Dudas, S. E. (2016). Microplastic Ingestion by Wild and Cultured Manila Clams (Venerupis philippinarum) from Baynes Sound, British Columbia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *71*(2), 147–156. https://doi.org/10.1007/s00244-016-0286-4

Davison, P., & Asch, R. G. (2011). Plastic ingestion by mesopelagic fishes in the North Pacific Subtropical Gyre. *Marine Ecology Progress Series*, *432*, 173–180. https://doi.org/10.3354/meps09142

De Witte, B., Devriese, L., Bekaert, K., Hoffman, S., Vandermeersch, G., Cooreman, K., & Robbens, J. (2014). Quality assessment of the blue mussel (Mytilus edulis):

Comparison between commercial and wild types. *Marine Pollution Bulletin*, *85*(1), 146–155. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.006

Détrée, C., & Gallardo-Escárate, C. (2017). Polyethylene microbeads induce transcriptional responses with tissue-dependent patterns in the mussel Mytilus galloprovincialis. *Journal of Molluscan Studies*, *83*(2), 220–225. https://doi.org/10.1093/mollus/eyx005

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 and Shellfish Immunology*, *83*, 52–60. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.018

Devriese, L. I., van der Meulen, M. D., Maes, T., Bekaert, K., Paul-Pont, I., Frère, L., Robbens, J., & Vethaak, A. D. (2015). Microplastic contamination in brown shrimp (Crangon crangon, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area. *Marine Pollution Bulletin*, *98*(1–2), 179–187. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.06.051

Di Renzo, L., Mascilongo, G., Berti, M., Bogdanović, T., Listeš, E., Brkljača, M., Notarstefano, V., Gioacchini, G., Giorgini, E., Olivieri, V., Silvestri, C., Matiddi, M., D'Alterio, N., Ferri, N., & Di Giacinto, F. (2021). Potential Impact of Microplastics and Additives on the Health Status of Loggerhead Turtles (Caretta caretta) Stranded Along the Central Adriatic Coast. *Water, Air, and Soil Pollution*, *232*(3), 1–20. https://doi.org/10.1007/s11270-021-04994-8

Dong, H., Chen, Y., Wang, J., Zhang, Y., Zhang, P., Li, X., Zou, J., & Zhou, A. (2021). Interactions of microplastics and antibiotic resistance genes and their effects on the aquaculture environments. In *Journal of Hazardous Materials* (Vol. 403). J Hazard Mater. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123961

Dris, R., Gasperi, J., Saad, M., Mirande, C., & Tassin, B. (2016). Synthetic fibers in atmospheric fallout: A source of microplastics in the environment? *Marine Pollution Bulletin*, *104*(1–2), 290–293. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.006

Duan, Z., Duan, X., Zhao, S., Wang, X., Wang, J., Liu, Y., Peng, Y., Gong, Z., & Wang, L. (2020). Barrier function of zebrafish embryonic chorions against microplastics and nanoplastics and its impact on embryo development. *Journal of Hazardous Materials*, *395*. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122621

Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., Farley, H., & Amato, S. (2013). Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine Pollution Bulletin*, *77*(1–2), 177–182. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.007

Espinosa, C., Esteban, M. Á., & Cuesta, A. (2019). Dietary administration of PVC and PE microplastics produces histological damage, oxidative stress and immunoregulation in European sea bass (Dicentrarchus labrax L.). *Fish and Shellfish Immunology*, *95*, 574–583. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.10.072

Faggio, C., Pagano, M., Alampi, R., Vazzana, I., & Felice, M. R. (2016). Cytotoxicity, haemolymphatic parameters, and oxidative stress following exposure to sub-lethal

concentrations of quaternium-15 in Mytilus galloprovincialis. *Aquatic Toxicology*, *180*, 258–265. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.010

Fazey, F. M. C., & Ryan, P. G. (2016). Biofouling on buoyant marine plastics: An experimental study into the effect of size on surface longevity. *Environmental Pollution*, *210*, 354–360. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.026

Fendall, L. S., & Sewell, M. A. (2009). Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin*, *58*(8), 1225–1228. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.025

Franzellitti, S., Canesi, L., Auguste, M., Wathsala, R. H. G. R., & Fabbri, E. (2019). Microplastic exposure and effects in aquatic organisms: A physiological perspective. In *Environmental Toxicology and Pharmacology* (Vol. 68, pp. 37–51). Environ Toxicol Pharmacol. https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.009

Freitas, R., Silvestro, S., Coppola, F., Costa, S., Meucci, V., Battaglia, F., Intorre, L., Soares, A. M. V. M., Pretti, C., & Faggio, C. (2020). Toxic impacts induced by Sodium lauryl sulfate in Mytilus galloprovincialis. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, *242*. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110656

Freitas, R., Silvestro, S., Coppola, F., Meucci, V., Battaglia, F., Intorre, L., Soares, A. M. V. M., Pretti, C., & Faggio, C. (2019). Biochemical and physiological responses induced in Mytilus galloprovincialis after a chronic exposure to salicylic acid. *Aquatic Toxicology*, *214*. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105258

Frias, J. P. G. L., & Nash, R. (2019). Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin*, *138*, 145–147. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.022

Galgani, F., Hanke, G., & Maes, T. (2015). Global distribution, composition and abundance of marine litter. In *Marine Anthropogenic Litter* (pp. 29–56). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_2

Galloway, T. S. (2015). Micro- and nano-plastics and human health. In *Marine Anthropogenic Litter* (pp. 343–366). https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_13

Galloway, T. S., Cole, M., & Lewis, C. (2017). Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. In *Nature Ecology and Evolution* (Vol. 1, Issue 5). Nat Ecol Evol. https://doi.org/10.1038/s41559-017-0116

Gerigny, O., Brun, M., Fabri, M. C., Tomasino, C., Le Moigne, M., Jadaud, A., & Galgani, F. (2019). Seafloor litter from the continental shelf and canyons in French Mediterranean Water: Distribution, typologies and trends. *Marine Pollution Bulletin*, *146*, 653–666. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.07.030

GESAMP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. (2015). Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment". *Reports and Studies GESAMP*, *90*(93), 96. https://archimer.ifremer.fr/doc/00632/74391/

Gray, A. D., & Weinstein, J. E. (2017). Size- and shape-dependent effects of microplastic particles on adult daggerblade grass shrimp (Palaemonetes pugio). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *36*(11), 3074–3080. https://doi.org/10.1002/etc.3881

Gregory, M. R. (1996). Plastic scrubbers' in hand cleansers: A further (and minor) source for marine pollution identified. *Marine Pollution Bulletin*, *32*(12), 867–871. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(96)00047-1

Gregory, M. R. (2009). Environmental implications of plastic debris in marine settings-entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 364, Issue 1526, pp. 2013–2025). The Royal Society. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0265

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. https://doi.org/10.1002/etc.3501

Gündoğdu, S., Eroldoğan, O. T., Evliyaoğlu, E., Turchini, G. M., & Wu, X. G. (2021). Fish out, plastic in: Global pattern of plastics in commercial fishmeal. *Aquaculture*, *534*, 736316. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736316

Guzzetti, E., Sureda, A., Tejada, S., & Faggio, C. (2018). Microplastic in marine organism: Environmental and toxicological effects. In *Environmental Toxicology and Pharmacology* (Vol. 64, pp. 164–171). Environ Toxicol Pharmacol. https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.10.009

Hamm, T., & Lenz, M. (2021). Negative impacts of realistic doses of spherical and irregular microplastics emerged late during a 42 weeks-long exposure experiment with blue mussels. *Science of the Total Environment*, *778*, 146088. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146088

Hart, M. W. (1991). Particle captures and the method of suspension feeding by echinoderm larvae. *Biological Bulletin*, *180*(1), 12–27. https://doi.org/10.2307/1542425

Hodkovicova, N., Sehonova, P., Blahova, J., Faldyna, M., Marsalek, P., Mikula, P., Chloupek, P., Dobsikova, R., Vecerek, V., Vicenova, M., Vosmerova, P., & Svobodova, Z. (2020). The effect of the antidepressant venlafaxine on gene expression of biotransformation enzymes in zebrafish (Danio rerio) embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, *27*(2), 1686–1696. https://doi.org/10.1007/s11356-019-06726-2

Horton, A. A., Walton, A., Spurgeon, D. J., Lahive, E., & Svendsen, C. (2017). Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. In *Science of the Total Environment* (Vol. 586, pp. 127–141). Sci Total Environ. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.190

Jabeen, K., Li, B., Chen, Q., Su, L., Wu, C., Hollert, H., & Shi, H. (2018). Effects of virgin microplastics on goldfish (Carassius auratus). *Chemosphere*, *213*, 323–332. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.031

Jang, M., Shim, W. J., Han, G. M., Rani, M., Song, Y. K., & Hong, S. H. (2016). Styrofoam Debris as a Source of Hazardous Additives for Marine Organisms. *Environmental Science and Technology*, *50*(10), 4951–4960. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05485

Jin, Y., Xia, J., Pan, Z., Yang, J., Wang, W., & Fu, Z. (2018). Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. *Environmental Pollution*, *235*, 322–329. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.088

Jovanović, B., Gökdağ, K., Güven, O., Emre, Y., Whitley, E. M., & Kideys, A. E. (2018). Virgin microplastics are not causing imminent harm to fish after dietary exposure. *Marine Pollution Bulletin*, *130*, 123–131. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.03.016

Kane, I. A., & Clare, M. A. (2019). Dispersion, accumulation, and the ultimate fate of microplastics in deep-marine environments: A review and future directions. In *Frontiers in Earth Science* (Vol. 7, p. 80). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/feart.2019.00080

Karami, A., Golieskardi, A., Ho, Y. Bin, Larat, V., & Salamatinia, B. (2017). Microplastics in eviscerated flesh and excised organs of dried fish. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05828-6

Karbalaei, S., Golieskardi, A., Watt, D. U., Boiret, M., Hanachi, P., Walker, T. R., & Karami, A. (2020). Analysis and inorganic composition of microplastics in commercial Malaysian fish meals. *Marine Pollution Bulletin*, *150*. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110687

Kashiwada, S. (2006). Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (Oryzias latipes). *Environmental Health Perspectives*, *114*(11), 1697–1702. https://doi.org/10.1289/ehp.9209

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, *203*(3), 253–310. https://doi.org/10.1002/aja.1002030302

Koelmans, A. A., Bakir, A., Burton, G. A., & Janssen, C. R. (2016). Microplastic as a Vector for Chemicals in the Aquatic Environment: Critical Review and Model-Supported Reinterpretation of Empirical Studies. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 50, Issue 7, pp. 3315–3326). American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b06069

Kögel, T., Bjorøy, Ø., Toto, B., Bienfait, A. M., & Sanden, M. (2020). Micro- and nanoplastic toxicity on aquatic life: Determining factors. In *Science of the Total Environment* (Vol. 709, p. 136050). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136050

Kris-Etherton, P. M., Grieger, J. A., & Etherton, T. D. (2009). Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *81*(2–3), 99–104. https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.05.011

Kühn, S., Bravo Rebolledo, E. L., & Van Franeker, J. A. (2015). Deleterious effects of litter on marine life. In *Marine Anthropogenic Litter* (pp. 75–116). Springer International

Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_4

Kukulka, T., Proskurowski, G., Morét-Ferguson, S., Meyer, D. W., & Law, K. L. (2012). The effect of wind mixing on the vertical distribution of buoyant plastic debris. *Geophysical Research Letters*, *39*(7). https://doi.org/10.1029/2012GL051116

Laale, H. W. (1977). The biology and use of zebrafish, Brachydanio rerio in fisheries research. A literature review. *Journal of Fish Biology*, *10*(2), 121–173. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04049.x

Lebel, L., Lebel, P., & Chuah, C. J. (2019). Governance of aquaculture water use. *International Journal of Water Resources Development*, *35*(4), 659–681. https://doi.org/10.1080/07900627.2018.1457513

Lee, K. W., Webb, S. E., & Miller, A. L. (1999). A wave of free cytosolic calcium traverses zebrafish eggs on activation. *Developmental Biology*, *214*(1), 168–180. https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9396

Lei, L., Wu, S., Lu, 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*, *619–620*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.103

Lenaker, P. L., Baldwin, A. K., Corsi, S. R., Mason, S. A., Reneau, P. C., & Scott, J. W. (2019). Vertical Distribution of Microplastics in the Water Column and Surficial Sediment from the Milwaukee River Basin to Lake Michigan. *Environmental Science and Technology*, *53*(21), 12227–12237. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03850

Li, J., Zhang, K., & Zhang, H. (2018). Adsorption of antibiotics on microplastics. *Environmental Pollution*, *237*, 460–467. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.050

Li, W., Jian, M., Yu, H., Yang, W., Liu, S., Ni, C., & Jiang, Y. (2020). Bioaccumulation effects of microplastics and heavy metals pollutants in the dominant freshwater fish species in the Longkou entry of Raohe River, Lake Poyang Basin. *Hupo Kexue/Journal of Lake Sciences*, *32*(2), 357–369. https://doi.org/10.18307/2020.0206

Long, M., Moriceau, B., Gallinari, M., Lambert, C., Huvet, A., Raffray, J., & Soudant, P. (2015). Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: Impact on their respective fates. *Marine Chemistry*, *175*, 39–46. https://doi.org/10.1016/j.marchem.2015.04.003

Lu, K., Qiao, R., An, H., & Zhang, Y. (2018). Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (Danio rerio). *Chemosphere*, *202*, 514–520. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.145

Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., Ding, L., & Ren, H. (2016a). Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (Danio rerio) and Toxic Effects in Liver. *Environmental Science and Technology*, *50*(7), 4054–4060. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00183

Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., Ding, L., & Ren, H. (2016b). Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (Danio rerio) and

Toxic Effects in Liver. *Environmental Science and Technology*, *50*(7), 4054–4060. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00183

Lusher, A., Hollman, P. C. H., Mendoza-Hill, J., & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017). *Microplastics in fisheries and aquaculture: What do we know? Should we be worried?* http://www.fao.org/3/a-i7677e.pdf

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. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.028

Mak, C. W., Ching-Fong Yeung, K., & Chan, K. M. (2019). Acute toxic effects of polyethylene microplastic on adult zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *182*. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109442

Masiá, P., Mateo, J. L., Arias, A., Bartolomé, M., Blanco, C., Erzini, K., Le Loc'h, F., Mve Beh, J. H., Power, D., Rodriguez, N., Schaal, G., Machado-Schiaffino, G., & Garcia-Vazquez, E. (2022). Potential microplastics impacts on African fishing resources. In *Science of the Total Environment* (Vol. 806). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150671

Mathalon, A., & Hill, P. (2014). Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Marine Pollution Bulletin*, *81*(1), 69–79. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.02.018

Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., & Kaminuma, T. (2001). Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environmental Science and Technology*, *35*(2), 318–324. https://doi.org/10.1021/es0010498

Mattsson, K., Ekvall, M. T., Hansson, L. A., Linse, S., Malmendal, A., & Cedervall, T. (2015). Altered behavior, physiology, and metabolism in fish exposed to polystyrene nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, *49*(1), 553–561. https://doi.org/10.1021/es5053655

Maynard, A. D. (2006). Nanotechnology: A research strategy for addressing risk. *Woodrow Wilson International Center for Scholars*, *July*, 43. https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/reports/2006/07/19/nanotechnology-a-research-strategy-for-addressing-risk

McClure, M. M., McIntyre, P. B., & McCune, A. R. (2006). Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish Danio rerio. *Journal of Fish Biology*, *69*(2), 553–570. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01125.x

McGoran, A. R., Clark, P. F., & Morritt, D. (2017). Presence of microplastic in the digestive tracts of European flounder, Platichthys flesus, and European smelt, Osmerus eperlanus, from the River Thames. *Environmental Pollution*, *220*(Pt A), 744–751. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.078

Medkova, D., Lakdawala, P., Hodkovicova, N., Blahova, J., Faldyna, M., Mares, J., Vaclavik, J., Doubkova, V., Hollerova, A., & Svobodova, Z. (2022). Effects of different pharmaceutical residues on embryos of fish species native to Central Europe.

Chemosphere, *291*(Pt 2). https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132915

Murphy, C. L. (2018). *A Comparison of Microplastics in Farmed and Wild Shellfish near Vancouver Island and Potential Implications for Contaminant Transfer to Humans*. 75. https://doi.org/10.25316/IR-484

Murray, F., & Cowie, P. R. (2011). Plastic contamination in the decapod crustacean Nephrops norvegicus (Linnaeus, 1758). *Marine Pollution Bulletin*, *62*(6), 1207–1217. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.03.032

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K. O., Wollenberger, L., Santos, E. M., Paull, G. C., VanLook, K. J. W., & Tyler, C. R. (2009). A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 364, Issue 1526, pp. 2047–2062). Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0242

Pagano, M., Capillo, G., Sanfilippo, M., Palato, S., Trischitta, F., Manganaro, A., & Faggio, C. (2016). Evaluation of functionality and biological responses of mytilus galloprovincialis after exposure to quaternium-15 (Methenamine 3-Chloroallylochloride). *Molecules*, *21*(2). https://doi.org/10.3390/molecules21020144

Pagano, M., Porcino, C., Briglia, M., Fiorino, E., Vazzana, M., Silvestro, S., & Faggio, C. (2017). The Influence of Exposure of Cadmium Chloride and Zinc Chloride on Haemolymph and Digestive Gland Cells from Mytilus galloprovincialis. *International Journal of Environmental Research*, *11*(2), 207–216. https://doi.org/10.1007/s41742-017-0020-8

Panno, S. V., Kelly, W. R., Scott, J., Zheng, W., McNeish, R. E., Holm, N., Hoellein, T. J., & Baranski, E. L. (2019). Microplastic Contamination in Karst Groundwater Systems. *Groundwater*, *57*(2), 189–196. https://doi.org/10.1111/gwat.12862

Paul-Pont, I., Lacroix, C., González Fernández, C., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Frère, L., Cassone, A. L., Sussarellu, R., Fabioux, C., Guyomarch, J., Albentosa, M., Huvet, A., & Soudant, P. (2016). Exposure of marine mussels Mytilus spp. to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. *Environmental Pollution*, *216*, 724–737. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.039

Pedà, C., Caccamo, L., Fossi, M. C., Gai, F., Andaloro, F., Genovese, L., Perdichizzi, A., Romeo, T., & Maricchiolo, G. (2016). Intestinal alterations in European sea bass Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. *Environmental Pollution*, *212*, 251–256. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.083

Pitt, J. A., Kozal, J. S., Jayasundara, N., Massarsky, A., Trevisan, R., Geitner, N., Wiesner, M., Levin, E. D., & Di Giulio, R. T. (2018). Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (Danio rerio). *Aquatic Toxicology*, *194*, 185–194. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.017

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*(APR), 103. https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00103

Plastics Europe. (2021). An analysis of European plastics production, demand and waste data WEB. In *Plastics - the Facts 2021*. https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/10/2015-Plastics-the-facts.pdf

Qiang, L., & Cheng, J. (2019). Exposure to microplastics decreases swimming competence in larval zebrafish (Danio rerio). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *176*, 226–233. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.088

Qiao, R., Deng, Y., Zhang, S., Wolosker, M. B., Zhu, Q., Ren, H., & Zhang, Y. (2019). Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. *Chemosphere*, *236*. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.065

Qiao, R., Lu, K., Deng, Y., Ren, H., & Zhang, Y. (2019). Combined effects of polystyrene microplastics and natural organic matter on the accumulation and toxicity of copper in zebrafish. *Science of the Total Environment*, *682*, 128–137. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.163

Qiao, R., Sheng, C., Lu, Y., Zhang, Y., Ren, H., & Lemos, B. (2019). Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish. *Science of the Total Environment*, *662*, 246–253. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.245

Rahman Khan, F., & Sulaiman Alhewairini, S. (2019). Zebrafish (Danio rerio) as a Model Organism. In *Current Trends in Cancer Management*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.81517

Rasmussen, S. C. (2021). From Parkesine to Celluloid: The Birth of Organic Plastics. In *Angewandte Chemie - International Edition* (Vol. 60, Issue 15, pp. 8012–8016). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/anie.202015095

Reed, B., & Jennings, M. (2011). Guidance on the housing and care of Zebrafish Danio rerio. *Research Animals Department, Science Group, RSPCA*, 1–27. www.rspca.org.uk/xenopus

Ribas, L., & Piferrer, F. (2014). The zebrafish (Danio rerio) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 6, Issue 4, pp. 209–240). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1111/raq.12041

Rocha-Santos, T., & Duarte, A. C. (2017). *Characterization and Analysis of Microplastics* (p. i). https://doi.org/10.1016/s0166-526x(17)30014-4

Rochman, C. M. (2015). The complex mixture, fate and toxicity of chemicals associated with plastic debris in the marine environment. In *Marine Anthropogenic Litter* (pp. 117–140). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_5

Rodríguez-Torres, R., Almeda, R., Kristiansen, M., Rist, S., Winding, M. S., & Nielsen, T.

G. (2020). Ingestion and impact of microplastics on arctic Calanus copepods. *Aquatic Toxicology*, *228*, 105631. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105631

Romeo, T., Pietro, B., Pedà, C., Consoli, P., Andaloro, F., & Fossi, M. C. (2015). First evidence of presence of plastic debris in stomach of large pelagic fish in the Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, *95*(1), 358–361. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.048

Sehonova, P., Hodkovicova, N., Urbanova, M., Örn, S., Blahova, J., Svobodova, Z., Faldyna, M., Chloupek, P., Briedikova, K., & Carlsson, G. (2019). Effects of antidepressants with different modes of action on early life stages of fish and amphibians. *Environmental Pollution*, *254*(Pt A), 112999–112999. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112999

Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., & Lehtiniemi, M. (2014). Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environmental Pollution*, *185*, 77–83. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.013

Setälä, O., Norkko, J., & Lehtiniemi, M. (2016). Feeding type affects microplastic ingestion in a coastal invertebrate community. *Marine Pollution Bulletin*, *102*(1), 95–101. https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2015.11.053

shan, J., Zhao, J., Liu, L., Zhang, Y., Wang, X., & Wu, F. (2018). A novel way to rapidly monitor microplastics in soil by hyperspectral imaging technology and chemometrics. *Environmental Pollution*, *238*, 121–129. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.026

Sökmen, T. Ö., Sulukan, E., Türkoğlu, M., Baran, A., Özkaraca, M., & Ceyhun, S. B. (2020). Polystyrene nanoplastics (20 nm) are able to bioaccumulate and cause oxidative DNA damages in the brain tissue of zebrafish embryo (Danio rerio). *NeuroToxicology*, *77*, 51–59. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.12.010

Solomando, A., Capó, X., Alomar, C., Álvarez, E., Compa, M., Valencia, J. M., Pinya, S., Deudero, S., & Sureda, A. (2020). Long-term exposure to microplastics induces oxidative stress and a pro-inflammatory response in the gut of Sparus aurata Linnaeus, 1758. *Environmental Pollution*, *266*(Pt 1). https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115295

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio. In *Biological Reviews* (Vol. 83, Issue 1, pp. 13–34). Biol Rev Camb Philos Soc. https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x

Spence, R., Jordan, W. C., & Smith, C. (2006). Genetic analysis of male reproductive success in relation to density in the zebrafish, Danio rerio. *Frontiers in Zoology*, *3*(1), 1–6. https://doi.org/10.1186/1742-9994-3-5

Stara, A., Pagano, M., Capillo, G., Fabrello, J., Sandova, M., Vazzana, I., Zuskova, E., Velisek, J., Matozzo, V., & Faggio, C. (2020). Assessing the effects of neonicotinoid insecticide on the bivalve mollusc Mytilus galloprovincialis. *Science of the Total Environment*, *700*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134914

Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M. E. J., Goïc, N. Le, Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, 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 of the United States of America*, *113*(9), 2430–2435. https://doi.org/10.1073/pnas.1519019113

Suzuki, N., & Mittler, R. (2012). Reactive oxygen species-dependent wound responses in animals and plants. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 53, Issue 12, pp. 2269–2276). Free Radic Biol Med. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.538

Talvitie, J., Mikola, A., Koistinen, A., & Setälä, O. (2017). Solutions to microplastic pollution – Removal of microplastics from wastewater effluent with advanced wastewater treatment technologies. *Water Research*, *123*, 401–407. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.005

Tarasco, M., Gavaia, P. J., Bensimon-Brito, A., Cordelières, F. P., Santos, T., Martins, G., de Castro, D. T., Silva, N., Cabrita, E., Bebianno, M. J., Stainier, D. Y. R., Cancela, M. L., & Laizé, V. (2022). Effects of pristine or contaminated polyethylene microplastics on zebrafish development. *Chemosphere*, *303*, 135198. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135198

Thompson, R. C., Olson, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W. G., McGonigle, D., & Russell, A. E. (2004). Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science*, *304*(5672), 838. https://doi.org/10.1126/science.1094559

Trevisan, R., Voy, C., Chen, S., & Di Giulio, R. T. (2019). Nanoplastics decrease the toxicity of a complex PAH mixture but impair mitochondrial energy production in developing Zebrafish. *Environmental Science and Technology*, *53*(14), 8405–8415. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02003

Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M. B., & Janssen, C. R. (2015). Microplastics are taken up by mussels (Mytilus edulis) and lugworms (Arenicola marina) living in natural habitats. *Environmental Pollution*, *199*, 10–17. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.008

van der Hal, N., Ariel, A., & Angel, D. L. (2017). Exceptionally high abundances of microplastics in the oligotrophic Israeli Mediterranean coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, *116*(1–2), 151–155. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.052

van Pomeren, M., Brun, N. R., Peijnenburg, W. J. G. M., & Vijver, M. G. (2017). Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages. *Aquatic Toxicology*, *190*, 40–45. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.017

Vandermeersch, G., Van Cauwenberghe, L., Janssen, C. R., Marques, A., Granby, K., Fait, G., Kotterman, M. J. J., Diogène, J., Bekaert, K., Robbens, J., & Devriese, L. (2015). A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environmental Research*, *143*(Pt B), 46–55. https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.07.016

Vázquez-Rowe, I., Ita-Nagy, D., & Kahhat, R. (2021). Microplastics in fisheries and aquaculture: implications to food sustainability and safety. In *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* (Vol. 29). Elsevier B.V.

https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100464

Vethaak, A. D., & Leslie, H. A. (2016). Plastic Debris is a Human Health Issue. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 50, Issue 13, pp. 6825–6826). American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02569

Viršek, M. K., Lovšin, M. N., Koren, Š., Kržan, A., & Peterlin, M. (2017). Microplastics as a vector for the transport of the bacterial fish pathogen species Aeromonas salmonicida. *Marine Pollution Bulletin*, *125*(1–2), 301–309. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.024

Wagner, T. P. (2017). Reducing single-use plastic shopping bags in the USA. *Waste Management*, *70*, 3–12. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.09.003

Wang, M. H., He, Y., & Sen, B. (2019). Research and management of plastic pollution in coastal environments of China. In *Environmental Pollution* (Vol. 248, pp. 898–905). Environ Pollut. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.098

White, M., Bashmachnikov, I., Arístegui, J., & Martins, A. (2008). Physical Processes and Seamount Productivity. In *Seamounts: Ecology, Fisheries & Conservation* (pp. 62–84). wiley. https://doi.org/10.1002/9780470691953.ch4

Wright, S. L., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. In *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* (Vol. 178, pp. 483–492). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031

Yin, L., Chen, B., Xia, B., Shi, X., & Qu, K. (2018). Polystyrene microplastics alter the behavior, energy reserve and nutritional composition of marine jacopever (Sebastes schlegelii). *Journal of Hazardous Materials*, *360*, 97–105. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.110

Yu, F., Yang, C., Huang, G., Zhou, T., Zhao, Y., & Ma, J. (2020). Interfacial interaction between diverse microplastics and tetracycline by adsorption in an aqueous solution. *Science of the Total Environment*, *721*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137729

Zalasiewicz, J., Waters, C. N., Ivar do Sul, J. A., Corcoran, P. L., Barnosky, A. D., Cearreta, A., Edgeworth, M., Gałuszka, A., Jeandel, C., Leinfelder, R., McNeill, J. R., Steffen, W., Summerhayes, C., Wagreich, M., Williams, M., Wolfe, A. P., & Yonan, Y. (2016). The geological cycle of plastics and their use as a stratigraphic indicator of the Anthropocene. In *Anthropocene* (Vol. 13, pp. 4–17). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.ancene.2016.01.002

Zeng, E. Y. (2018). Microplastic contamination in aquatic environments: An emerging matter of environmental urgency. In *Microplastic Contamination in Aquatic Environments: An Emerging Matter of Environmental Urgency*. https://doi.org/10.1016/C2016-0-04784-8

Zeytin, S., Wagner, G., Mackay-Roberts, N., Gerdts, G., Schuirmann, E., Klockmann, S., & Slater, M. (2020). Quantifying microplastic translocation from feed to the fillet in European sea bass Dicentrarchus labrax. *Marine Pollution Bulletin*, *156*. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111210

WEB REFERENCE

FAO Fishstat: http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en

https://www.fao.org/news/story/fr/item/1372971/icode/

RINGRAZIAMENTI

Vorrei dedicare questo spazio a chi, con dedizione e pazienza, ha contribuito alla realizzazione di questo elaborato.

Ringrazio Il professor Ike Olivotto per avermi ospitato nel suo team di ricerca e supportato ogni volta che ne avessi bisogno; il professor Andrea Frontini per le analisi alla microscopia confocale; la professoressa Giorgia Gioacchini e Giulia Chemello per la strumentazione per digestione KOH mediata e la quantificazione delle MPs; la professoressa Gloriana Cardinaletti per la formulazione delle diete sperimentali; Matteo Zarantoniello e Nico Cattaneo per la loro disponibilità; la mia famiglia che mi hanno supportato e, soprattutto, sopportato in tutti questi anni di studi; ai compagni di corso ed agli amici di sempre per i bei ricordi che resteranno per sempre impressi nella mia mente.