



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea
Scienze Biologiche**

Tesi di Laurea di:
Chiara Bacchiani

Docente Referente:
Prof.ssa Maura Benedetti

Ingestione, distribuzione tissutale ed effetti tossicologici delle microplastiche ambientali in organismi giovanili di *Dicentrarchus labrax*

Uptake, tissue distribution and toxicological effects of environmental microplastics in early juvenile fish *Dicentrarchus labrax*

Sessione: Dicembre 2021
Anno Accademico 2020-2021



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea

SCIENZE BIOLOGICHE

Ingestione, distribuzione tissutale ed effetti tossicologici delle
microplastiche ambientali in organismi giovanili di *Dicentrarchus*
labrax

Uptake, tissue distribution and toxicological effects of
environmental microplastics in early juvenile fish *Dicentrarchus*
labrax

Tesi di Laurea di:

Bacchiani Chiara

Docente referente

Prof.ssa Benedetti Maura

Sessione autunnale

A.A 2020/2021

Particelle plastiche

La presenza delle particelle plastiche negli ecosistemi rappresenta un importante problema sia dal punto di vista ecologico che sociale, con gravi ripercussioni per la salute degli organismi, principalmente marini.

Microplastiche < 5mm

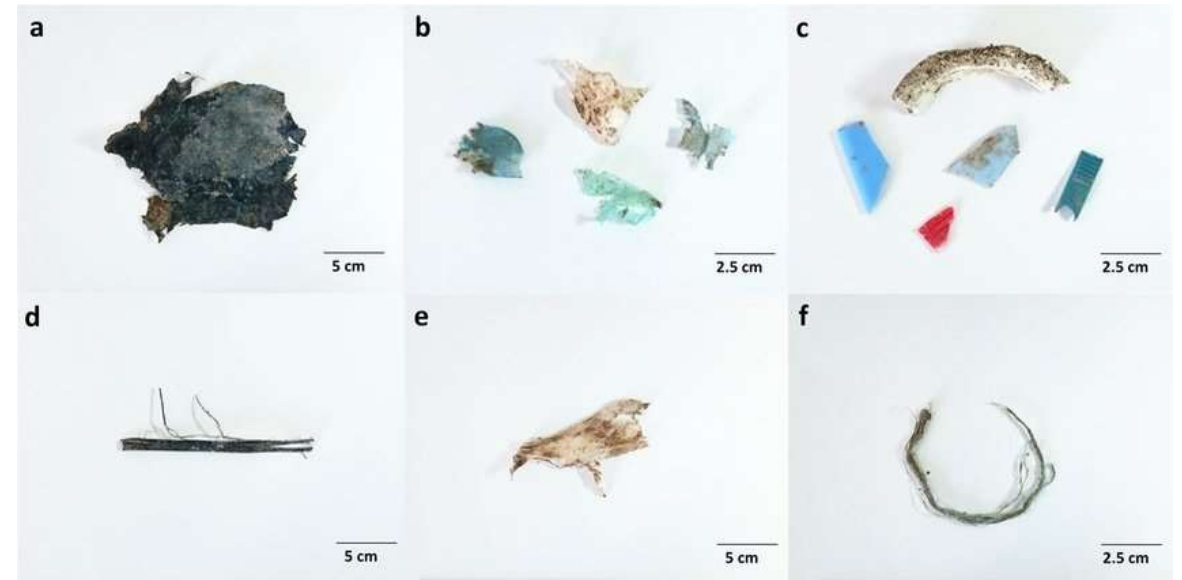


Fig.1

Nanoplastiche ≤ 100 nm

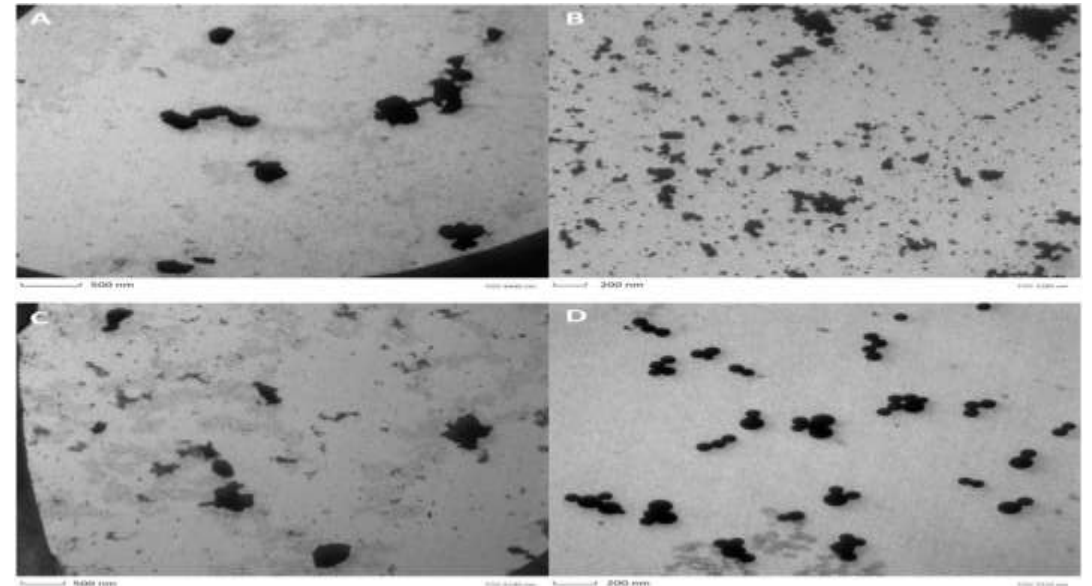


Fig.2

Le microplastiche ambientali (EMP)

Possono essere classificate per:

- Tipologia di materiale plastico (es. Polietilene o Polipropilene)
- Forma (frammento, fibra, foam, linee, film, pellet...)
- Colore
- Densità

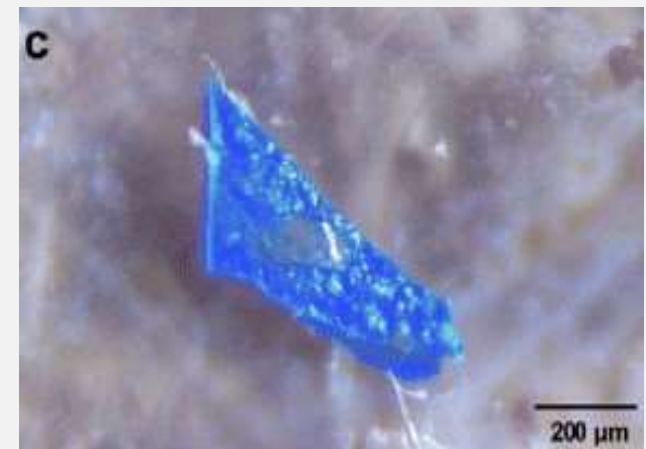
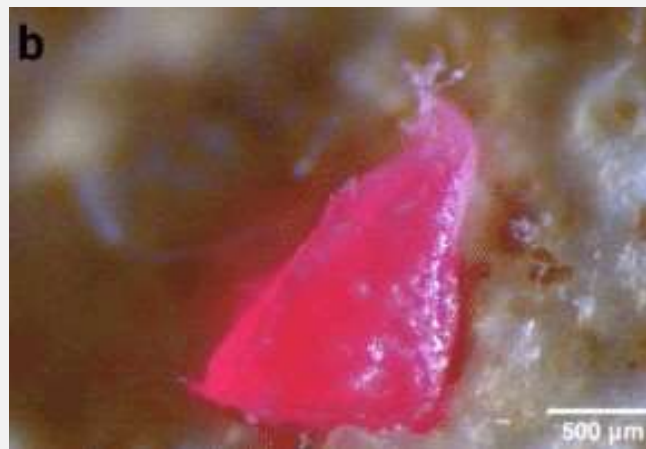
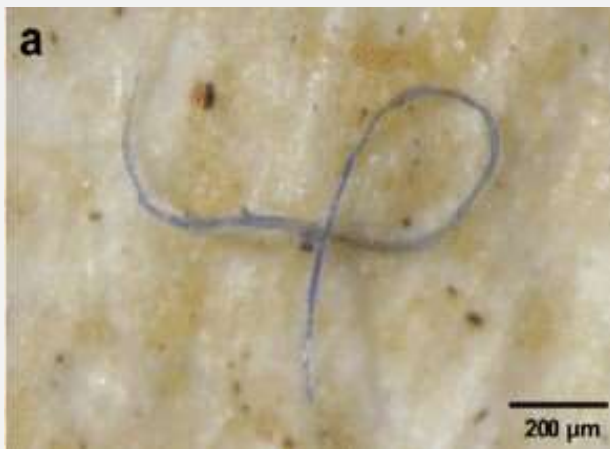
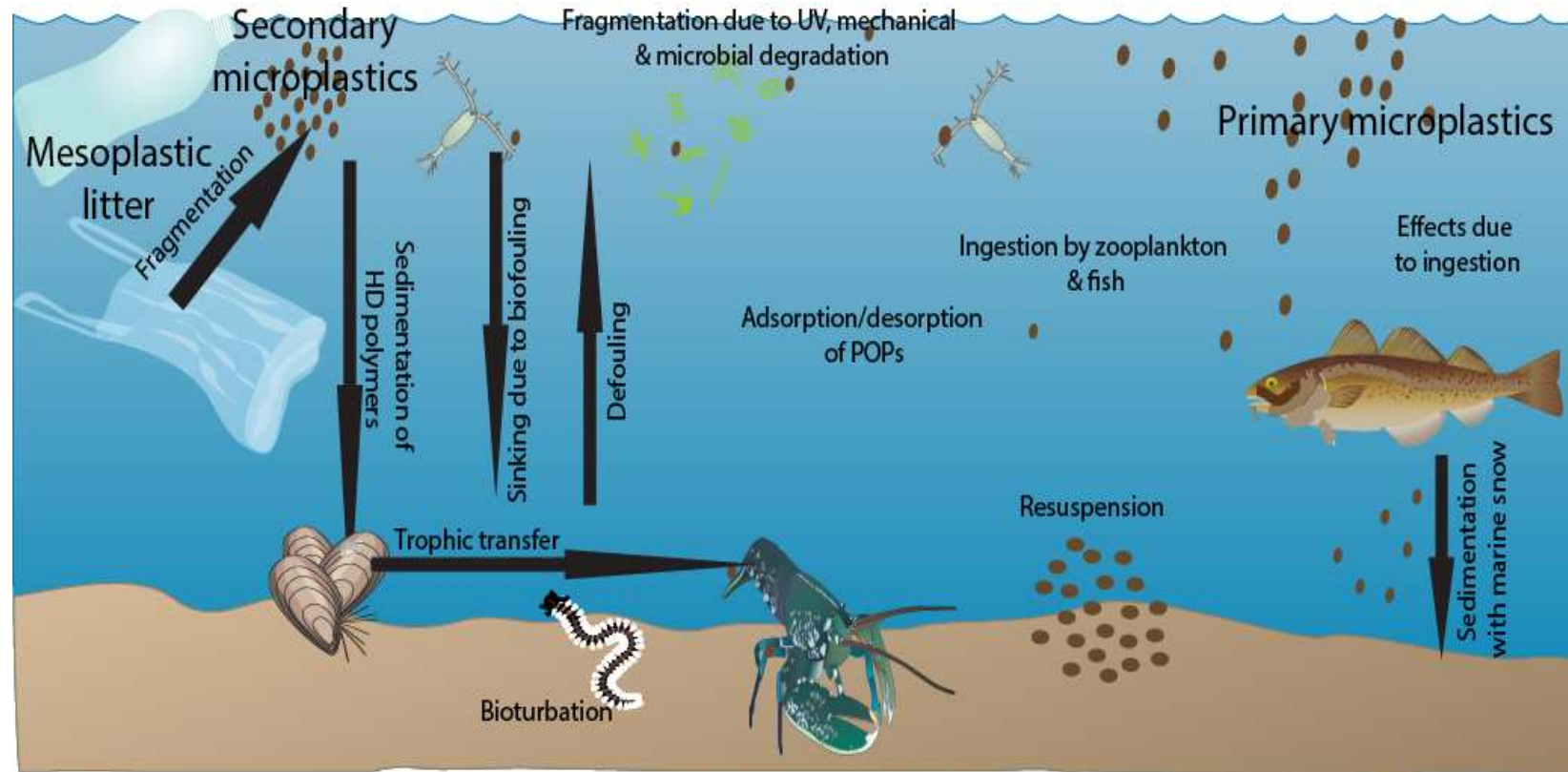


Fig.3

Impatto ambientale



Le EMP sono presenti in ambiente:

- microplastiche primarie (sottoforma di pellet di polimero vergine).
- microplastiche secondarie (si formano attraverso la degradazione di prodotti polimerici più grandi).

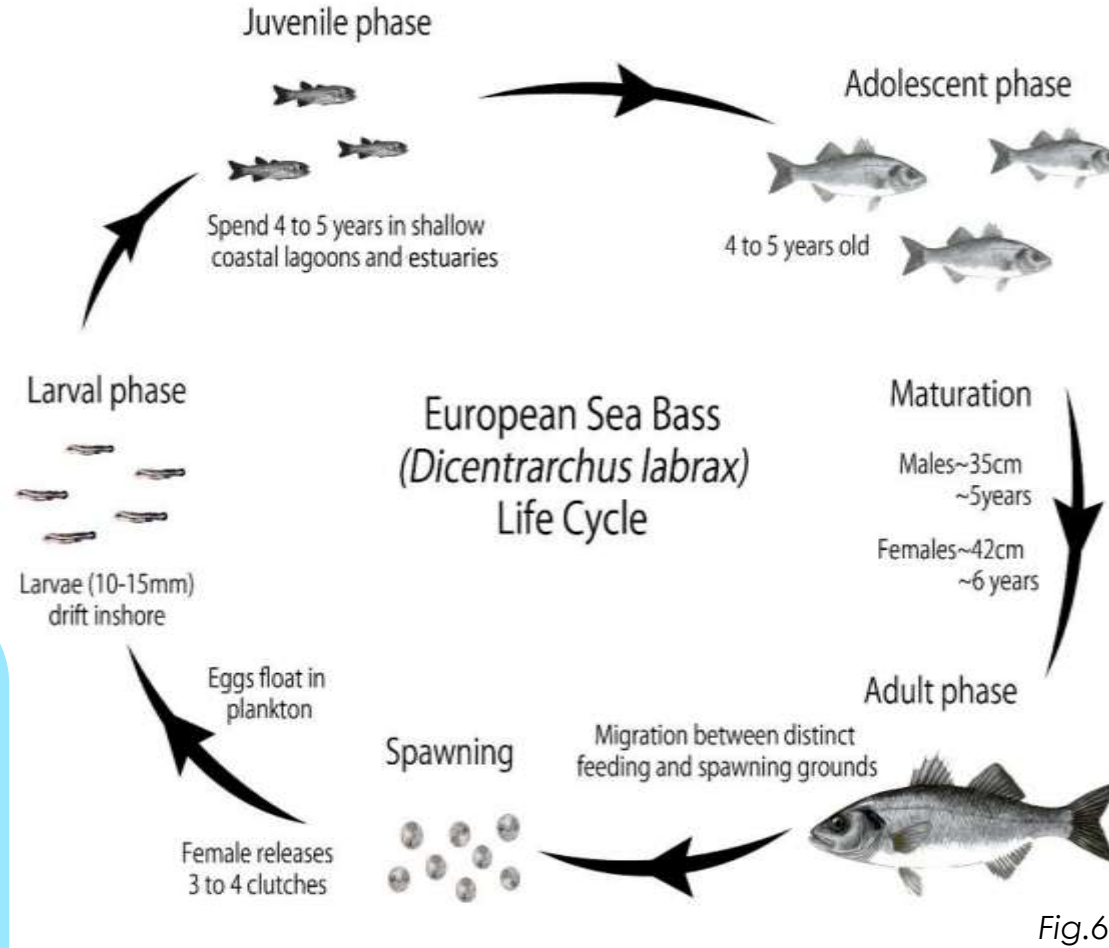
Fig.4

Dicentrarchus labrax



Fig.5

Periodo larvale pelagico planctotrofico, maggior probabilità di ingerire nella dieta microplastiche compromettendone la sopravvivenza



Distribuzione geografica
Fig.7

Materiali e metodi

Le EMP sono state raccolte nel giugno 2017 sulla spiaggia di Bizerte (Tunisia settentrionale). Le particelle sono state prelevate da aliquote di sabbia raccolte casualmente ad una profondità di 10 cm (5 repliche in 100 m) e dalla superficie dell'acqua.



Fig.8

Raccolta di campioni

Particelle di dimensioni maggiori (sabbia) → usati due setacci (5mm e 1mm).

Particelle galleggianti → setaccio da 300 μm

Processo di degradazione

Le particelle sono state mescolate e macinate ed infine setacciate ottenendo la frazione di EMPs < 100 μm utilizzata per l'esperimento

Preparazione dietetica

5 mg di EMP in polvere sospesi in acqua Mili-Q filtrata (0,22 μm) e mescolati con 150 g di cibo commerciale (TetraMin flakes pellets)

Piano sperimentale

Fase 1

Individui giovanili di *Dicentrarchus labrax* (50 giorni dalla schiusa) prelevati dall'acquacoltura marina (Aqua-Fish, Sousse, Tunisia).

400 giovanili sono stati misurati in lunghezza (media di 5,11 cm \pm 0,1) e in peso (1,14 g \pm 0,1) e divisi in due acquari da 1200 litri (200 individui ciascuno).



Fig.9

Fase 2



Fig.10

Fase 3

Dopo 3 e 5 giorni di esposizione, 100 pesci per gruppo sono stati sacrificati casualmente; da questi sono stati prelevati branchie, intestino e fegato.



Fig.11

Gruppo controllo:
dieta TetraMin

Gruppo esposto:
30 g di mangime
(5 mg di EMPs/150 g)
per 5 giorni

1) Digestione dei tessuti estrazione ed identificazione dell'EMP

- Fase di digestione: i tessuti sono stati digeriti con soluzione di idrossido di potassio a 60°C e sotto agitazione continua per almeno 24 h.
- Fase di sedimentazione: con ioduro di potassio per separare le MP dense dalle particelle minerali.
- Le soluzioni ottenute sono state successivamente filtrate attraverso filtri di nitrato di cellulosa.
- Identificazione dei polimeri plastici attraverso la tecnica FTIR e Raman.
- Conferma dei risultati confrontando gli spettri ottenuti con quelli della banca dati.

2) Valutazione dell'assorbimento di EMP

- I tessuti molli dissezionati sono stati fissati in formalina al 10% e inseriti in cera di paraffina.
- Sezioni di 2 µm di spessore sono state tagliate e colorate con ematossilina ed eosina (H&E) per l'osservazione al microscopio.
- L'accumulo di microplastiche è stato osservato al microscopio a luce polarizzata (PLM) a 400x ingrandimento.

3) Risposte biologiche: biomarker analizzati

- Lo studio di biomarker è stato utilizzato per valutare gli effetti tossici dell'esposizione all'EMP sui tessuti dei pesci; queste risposte biologiche includono:
 - alcuni enzimi antiossidanti (SOD, CAT, GST);
 - formazione di prodotti di perossidazione lipidica (TBARS);
 - induzione di metallotioneine (MTs).

Risultati

Identificazione dei polimeri prelevati in ambiente

-EMP ≥ 1 mm identificate utilizzando FTIR: tre polimeri polietilene (PE; 50%), polipropilene (PP; 18,75%) e polietilene ad alta densità (HDPE; 31,25%).

-EMP < 1 mm tramite RMS hanno rivelato una maggiore variabilità della composizione del polimero; includono: il polietilene vinil acetato (PEVA; 35,29%), HDPE (5,88%), PE (17,65%), polietilene a bassa densità (LDPE; 11,76%), PA (23,53%) e PP (5,88%).

Le EMP > 1 mm sono costituite da diversi colori (rosso, blu, verde, nero) e da diverse forme (frammenti e fibre); il "frammento" è la forma irregolare predominante.

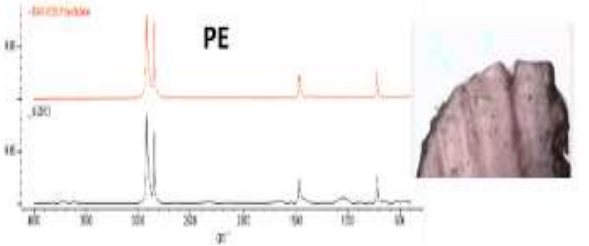
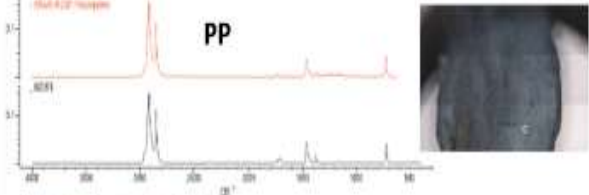
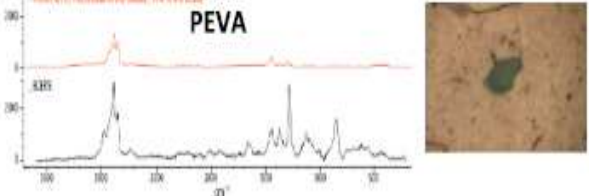

Polymer characterization	Method	Polymer composition	Image and spectrum of some identified MPs
<i>Size Distribution before degradation process</i>			
5 mm < EMPs < 1 mm	FTIR	50% PE; 18.75% PP; 31.25% HDPE	   
1 mm < EMPs < 300 μ m	RMS	35.29% PEVA, 5.88% HDPE, 17.65% PE, 11.76% LDPE, 23.53% PA, 5.88% PP	
Concentration (μ g/g w.w)		25	
After degradation process: Zeta (C') potential distribution (mV)	DLS	Milli-Q water: -59.9 ± 13.8	

Fig.12

Valutazione dell'assorbimento di EMP

La quantità di EMP per g di tessuto aumenta con l'aumentare del tempo di esposizione.

3 Giorni: *Branchie* ($3,51 \pm 0,63$)/g – *Intestino* ($2,9 \pm 0,46$) /g
– *Fegato* ($6,92 \pm 0,88$) /g

5 Giorni: *Branchie* ($8,06 \pm 1,19$)/g – *Intestino* ($6,33 \pm 0,62$) /g
– *Fegato* ($21,61 \pm 1,48$) /g

Distribuzione delle dimensioni:

- Particelle $> 3 \mu\text{m}$ nelle branchie ($3,96 \pm 0,94$ particelle g^{-1}) dopo 5 giorni esposizione;
- Particelle nei due range $3-1.2 \mu\text{m}$ e $1.2-0.45 \mu\text{m}$ nell'intestino (3.19 ± 0.93 particelle g^{-1}) e fegato (12.83 ± 1.81 particelle g^{-1}), dopo 5 giorni di esposizione.

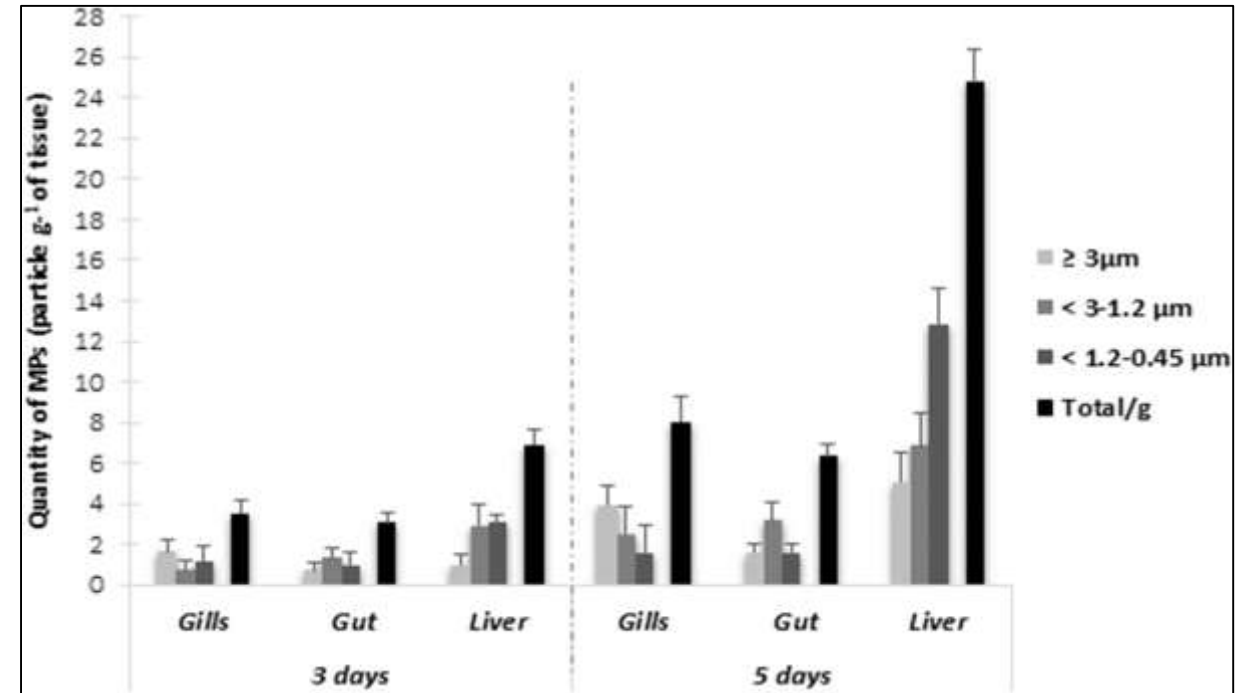


Fig.13

Valutazione dell'assorbimento di EMP

Le EMP sono presenti in tutti i tessuti investigati

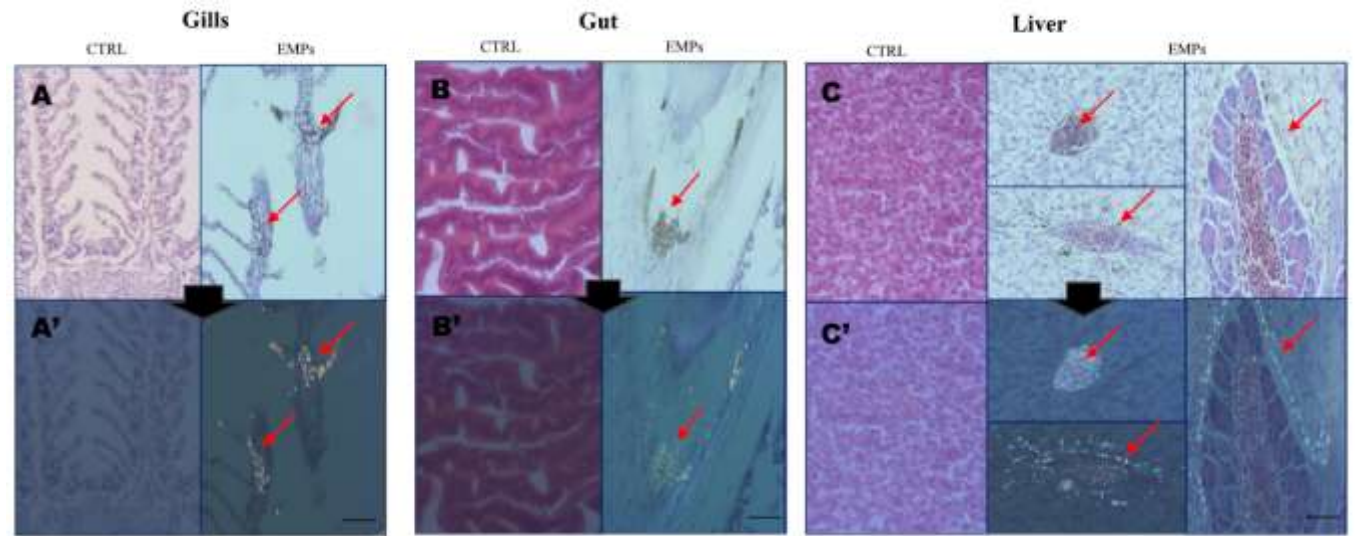


Fig.14

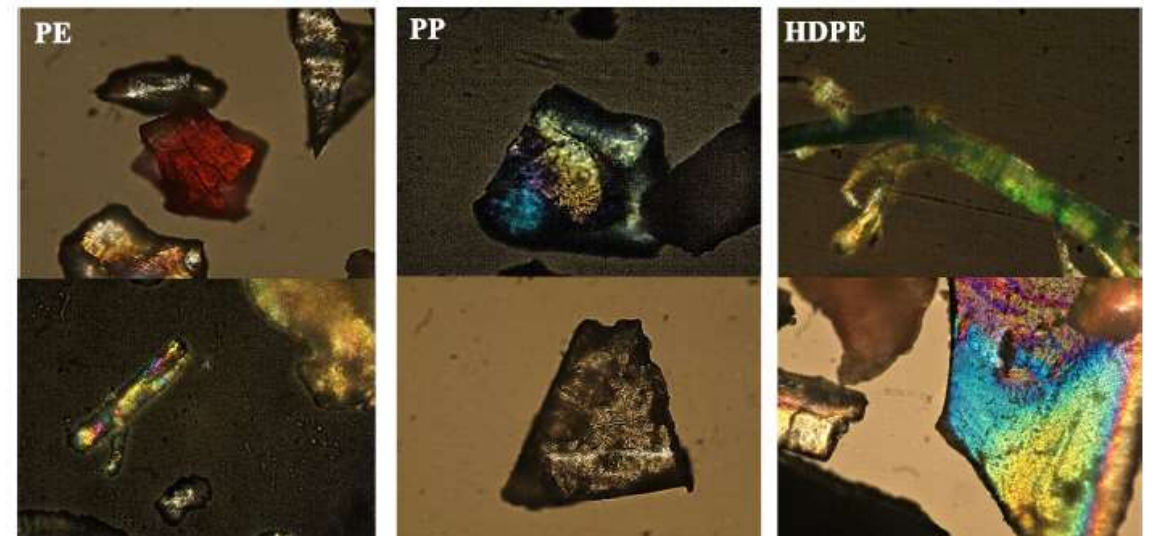


Fig.15

Identificazione dei polimeri estratti dagli organismi

Tra i 4 polimeri identificati, PEVA è il polimero predominante nei tessuti, seguito da PA.

Numerosi stabilizzanti, plastificanti e lubrificanti sono stati identificati nelle EMP accumulate dai branzini.

68 additivi sono stati individuati attraverso la tecnica Raman, il predominante è lo stabilizzatore organico del PVC (polivinilcloruro).

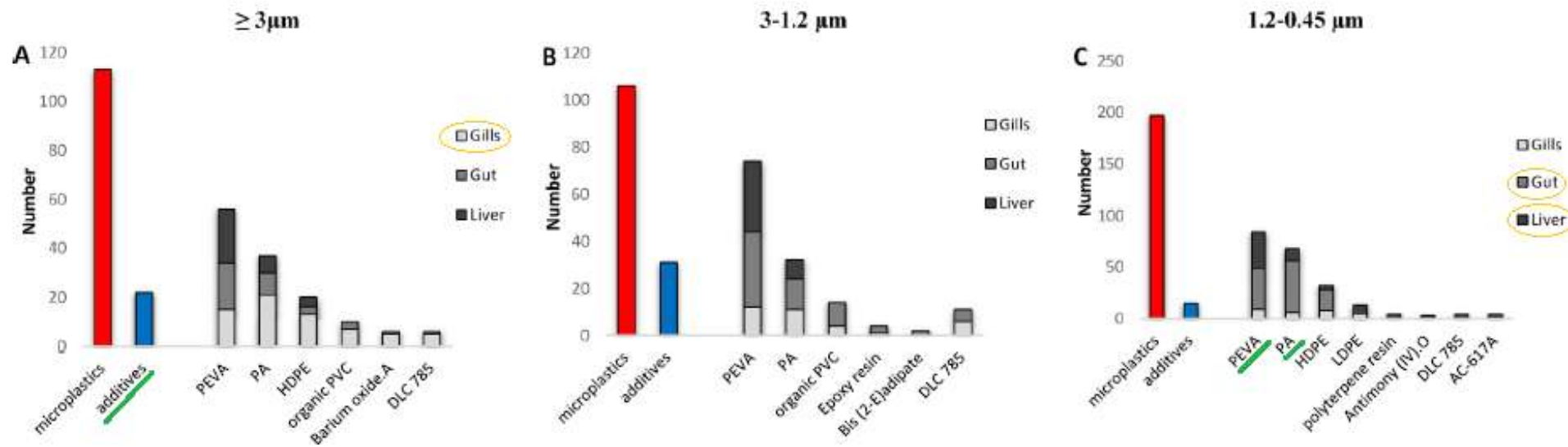
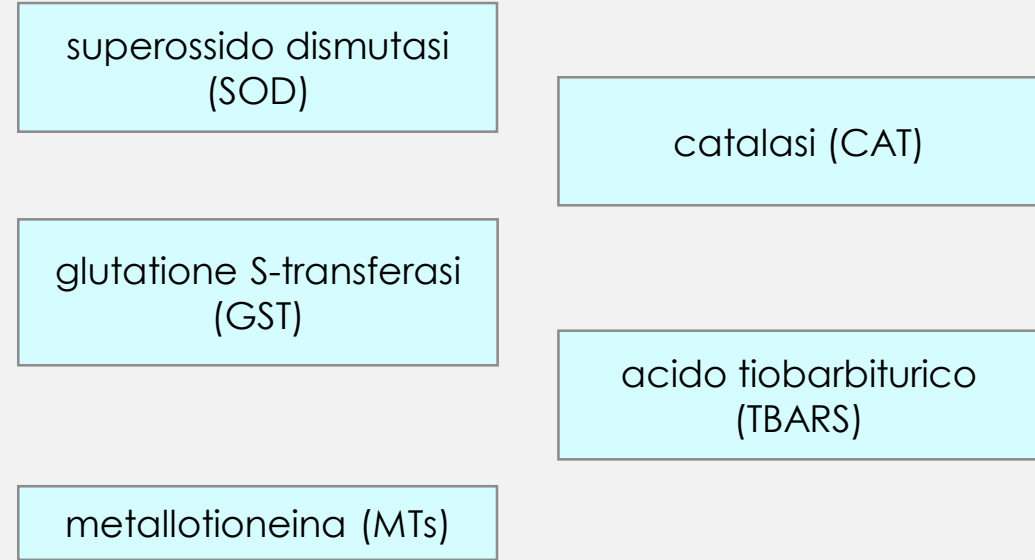


Fig.16

La dimensione più frequente delle EMP presente nei tessuti è di 1.2-0.45 μm (comprendente 197 particelle), principalmente accumulate nell'intestino e nel fegato, mentre il maggior numero di additivi (presenti in 31 particelle) è stato misurato nelle branchie su particelle ≥ 3 μm.

Risposte biologiche: Biomarker analizzati

- Dopo 3 giorni di esposizione le risposte biologiche mostrano un aumento generalizzato per tutti i parametri investigati ad eccezione dei TBARS nel fegato ed intestino negli organismi esposti rispetto al gruppo di controllo
- Dopo 5 giorni di esposizione gli organismi mostrano una significativa induzione delle risposte biologiche analizzate rispetto sia al gruppo di controllo che agli organismi esposti per 3 giorni.



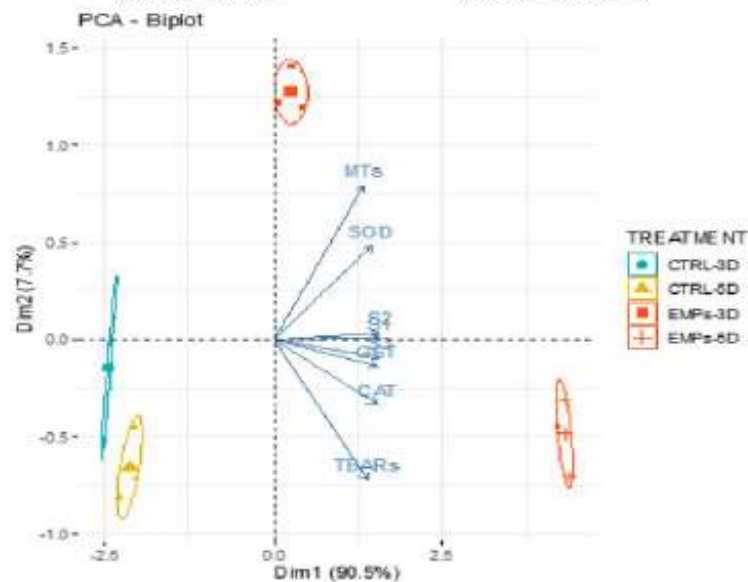
	Gills		Gut		Liver	
	CTRL	EMPs	CTRL	EMPs	CTRL	EMPs
<i>After 3 days</i>						
CAT activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$)	5.39 ± 0.08	31.07 ± 3.32 *	13.45 ± 3.04	28.73 ± 3.95 *	9.11 ± 4.82	91.87 ± 6.04 *
GST activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$)	33.52 ± 8.25	101.49 ± 11.07*	27.47 ± 7.70	75.00 ± 12.71 *	36.64 ± 1.90	119.02 ± 11.75 *
TBARS ($\mu\text{mol g prot}^{-1}$)	1.10 ± 0.06	2.74 ± 0.22 *	0.97 ± 0.11	1.06 ± 0.19	1.74 ± 0.06	2.42 ± 0.14
SOD activity (U mg prot ⁻¹)	27.99 ± 3.94	43.72 ± 1.00 *	42.46 ± 0.83	61.05 ± 2.99 *	46.78 ± 3.71	65.96 ± 2.25 *
MTs content ($\mu\text{g MTx mg prot}^{-1}$)	2.50 ± 0.59	14.11 ± 2.33 *	4.22 ± 1.04	8.47 ± 0.33 *	4.26 ± 0.15	10.43 ± 1.64 *
<i>After 5 days</i>						
CAT activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$)	6.35 ± 1.88	28.88 ± 3.77 *	18.81 ± 1.58	76.65 ± 8.62 ^{*,a}	7.75 ± 3.29	72.66 ± 1.60 *
GST activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$)	35.99 ± 11.07	180.88 ± 6.28 ^{*,a}	42.74 ± 8.69	161.47 ± 14.52 ^{*,a}	29.62 ± 7.30	148.61 ± 14.40 *
TBARS ($\mu\text{mol g prot}^{-1}$)	1.70 ± 0.19	4.16 ± 0.23 ^{*,a}	1.54 ± 0.19	3.70 ± 0.21 ^{*,a}	1.54 ± 0.15	1.62 ± 0.25 *
SOD activity (U mg prot ⁻¹)	34.97 ± 1.81	59.67 ± 1.30 ^{*,a}	45.58 ± 2.82	67.09 ± 2.36 ^{*,a}	46.36 ± 4.93	68.67 ± 0.64 ^{*,a}
MTs content ($\mu\text{g MTx mg prot}^{-1}$)	3.67 ± 0.54	12.71 ± 1.59 *	3.21 ± 0.64	9.04 ± 0.62 *	4.47 ± 1.31	15.91 ± 1.40 *

Fig. 17

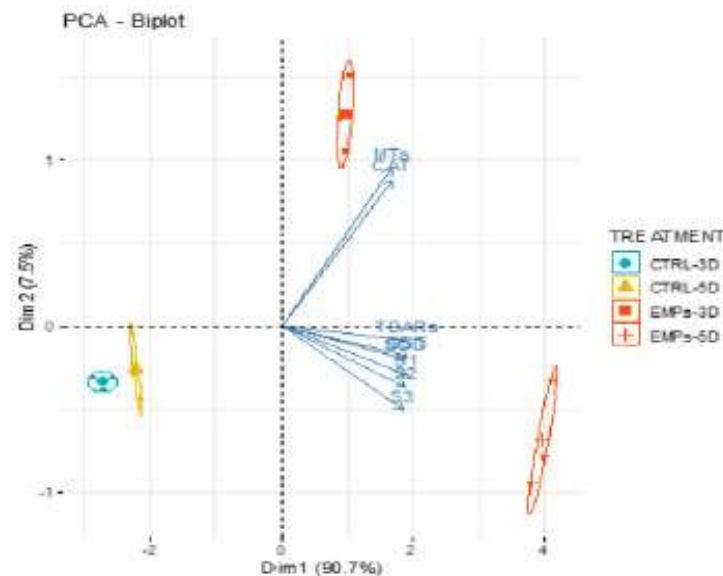
Analisi delle componenti principali (PCA) biplot

Sulla base del biplot PCA, si evince che i pesci esposti a EMP si separano dal gruppo di controllo, in entrambi i periodi di esposizione (3 e 5 giorni) con differenze nelle branchie (A-1), nell'intestino (B-1) e nel fegato (C-1).

A-1



B-1



C-1

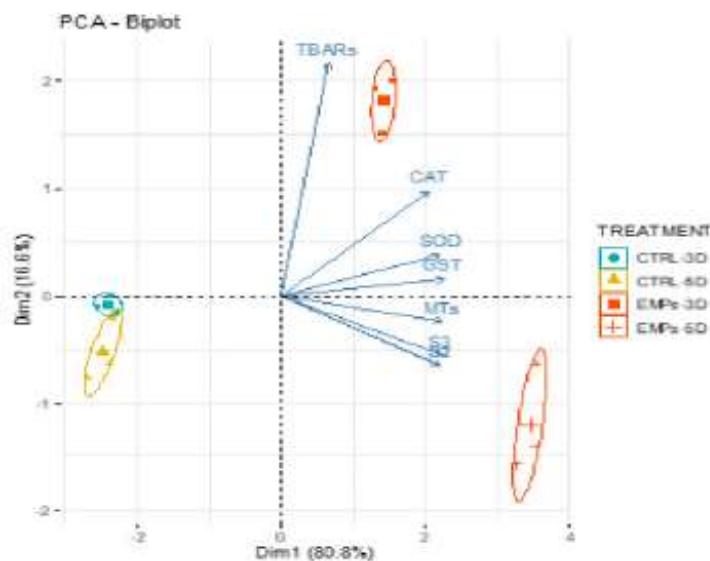


Fig.18

Nell'intestino, l'attività CAT e il contenuto di MTs sono le risposte biologiche che variano maggiormente negli organismi esposti dopo 3 giorni; i valori di TBARS e le attività di GST e SOD sono le risposte che aumentano significativamente nei pesci esposti per 5 giorni.

Nelle branchie, la separazione tra i gruppi è causata principalmente dalla variazione dell'attività SOD e dal contenuto di MTs, nei pesci esposti per 3 giorni, e dall'attività GST, della CAT e dai livelli di TBARS in quelli esposti per 5 giorni.

Nel fegato, la separazione tra i gruppi è causata principalmente dalla variazione dell'attività CAT, GST e SOD e dai livelli di TBARS. Al contrario la separazione lungo il secondo asse dipende dai livelli di MTs.

Conclusioni

Dal seguente studio è emerso che:

- 1) Dopo l'esposizione per 3 e 5 giorni a EMP di piccole dimensioni, il loro accumulo e distribuzione negli organismi giovanili di *D. labrax* sono diversi tra le branchie, l'intestino e il fegato e strettamente correlati alle dimensioni delle particelle.
- 2) La presenza di additivi plastici potrebbe essere causata da processi di degradazione fisico chimici ambientali e digestivi delle EMP.
- 3) Sulla base delle risposte biochimiche (biomarker), l'esposizione a EMP ha portato all'induzione di meccanismi di difesa contro l'insorgenza di stress ossidativo, e ha fornito prove della tossicità delle EMP che può variare a seconda della durata dell'esposizione, della composizione e della dimensione delle microparticelle.



Fig.19

Abstract

Le microplastiche ambientali, anche su scala nanometrica, sono sempre più presenti nell'ambiente soprattutto negli ecosistemi marini, rappresentando una minaccia per la rete trofica. Spesso a causa delle ridotte dimensioni vengono assorbite dalle branchie di pesci per endocitosi o per assunzione orale passiva durante il filtraggio, giungono poi all'intestino, attraversano le barriere biologiche per essere successivamente assunte per endocitosi all'interno delle cellule epiteliali o trasferite ai tessuti interni come il fegato attraverso il sistema circolatorio. Pur rappresentando un problema a livello ecologico e sociale, gli effetti fisici e chimici che le particelle plastiche hanno sugli organismi marini risultano ancora poco documentati. Nel presente studio, tramite tecniche di microscopia a luce polarizzata e microscopia FTIR e Raman si è studiato come le microplastiche si accumulino nei tessuti branchiali, dell'intestino e del fegato di esemplari giovanili di *Dicentrarchus labrax* e come la loro concentrazione sia diversa in base alle dimensioni, forma e composizione chimica. Inoltre sempre a livello tissutale sono stati trovati additivi plastici derivanti dalla degradazione artificiale degli EMP. Grazie all'utilizzo di biomarker di citotossicità sono emersi anche i loro potenziali effetti dannosi sugli organismi.

Bibliografia e Riferimenti fotografici:

- N. Zitouni, N. Bousserhine , O. Missawi, I. Boughattas, N. Ch`evre, R. Santos, S. Belbekhouche, V. Alphonse, F. Tisserand, L. Balmassiere, S. Pereira Dos Santos, M. Mokni, H. Guerbej, M. Banni. 2021. Uptake, tissue distribution and toxicological effects of environmental microplastics in early juvenile fish *Dicentrarchus labrax*. Journal of hazardous material, 403; 124055.
- Fig. Copertina → <https://images.app.goo.gl/VJSFfBzUA8n5TKmw7>
- Fig.1 → <https://images.app.goo.gl/QMUzvXwSxZbJU2nS8>
- Fig.2 → <https://images.app.goo.gl/yJEM9rT2jzNFdtuh6>
- Fig.3 → https://www.researchgate.net/figure/Examples-of-microplastics-recovered-from-Dicentrarchus-labrax-Trachurus-trachurus-and_fig4_337249378
- Fig.4 → Microplastics in marine environments: Occurrence, distribution and effects
- Fig.5 → <https://www.fishbase.se/photos/PicturesSummary.php?ID=63&what=larvegg>
- Fig.6 → <https://www.nw-ifca.gov.uk/managing-sustainable-fisheries/european-seabass/>
- Fig.7 → https://www.google.it/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Ffish-commercial-names.ec.europa.eu%2Ffish-names%2Fproxy-aquamaps%3F_queryString%3Dimagethumb%2Ffile_destination%2Fpic_Fis-22755.jpg&imgrefurl=https%3A%2F%2Ffish-commercial-names.ec.europa.eu%2Ffish-names%2Fspecies_it%3Fsn%3D14427&tbnid=jsCApzvC2DLsIM&vet=1&docid=0sl4QUtPEs7yCM&w=675&h=450&itg=1&hl=it&source=sh%2F%2Fim
- Fig.8 → <https://images.app.goo.gl/X7o3CznevWY5UGpq5>
- Fig.9 → <https://images.app.goo.gl/QhEte5TSCHXiYuiK7>
- Fig.10 → https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ab/Dicentrarchus_labrax_Minorca.jpg
- Fig.11 → <https://images.app.goo.gl/KRX29PmoTYoaW1ds8>
- Fig.12 → Uptake, tissue distribution and toxicological effects of environmental microplastics in early juvenile fish *Dicentrarchus labrax*
- Fig.13 → Uptake, tissue distribution and toxicological effects of environmental microplastics in early juvenile fish *Dicentrarchus labrax*
- Fig.14 → Uptake, tissue distribution and toxicological effects of environmental microplastics in early juvenile fish *Dicentrarchus labrax*
- Fig.15 → Uptake, tissue distribution and toxicological effects of environmental microplastics in early juvenile fish *Dicentrarchus labrax*
- Fig.16 → Uptake, tissue distribution and toxicological effects of environmental microplastics in early juvenile fish *Dicentrarchus labrax*
- Fig.17 → Uptake, tissue distribution and toxicological effects of environmental microplastics in early juvenile fish *Dicentrarchus labrax*
- Fig.18 → Uptake, tissue distribution and toxicological effects of environmental microplastics in early juvenile fish *Dicentrarchus labrax*
- Fig.19 → <https://journals.openedition.org/factsreports/docannexe/image/5290/img-2-small580.jpg>



Ringrazio per l'attenzione