

*ALMA MATER STUDIORUM*  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di Laurea Specialistica in Biologia Marina

**Analisi di parametri di stress ossidativo nel mitilo  
mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*) esposto a  
nano e microplastiche**

Tesi di laurea in

Adattamenti degli animali all'ambiente marino

**Relatore:**

Prof.ssa Elena Fabbri

**Correlatore:**

Dott. Marco Capolupo

**Presentata da:**

Sara Albarello

**III** sessione

Anno Accademico 2016-2017



## ABSTRACT

Il lavoro di tesi si colloca all'interno di un progetto più vasto, JPI Ocean PLASTOX Project, volto ad indagare l'ingestione, il trasferimento lungo la catena trofica e l'impatto ecotossicologico delle microplastiche (MP) sulle principali specie ed ecosistemi marini europei. Lo scopo della presente ricerca è stato quello di valutare la potenziale tossicità delle microplastiche (3 µm) e delle nanoplastiche (50 nm) in *Mytilus galloprovincialis*, sottoposto ad un dosaggio basso pari a 1,54 ng/L, intermedio pari a 15,4 ng/L, e alto pari a 154 ng/L di polistirene, al fine di ottenere informazioni circa la eventuale dose-risposta, e di correlare eventuali effetti con le dimensioni delle plastiche. L'esperimento è stato condotto in ambiente controllato e protratto per 21 giorni. E' stata valutata la risposta immunitaria attraverso la misura dell'attività del lisozima e della fagocitosi negli emociti. E' stata inoltre analizzata una batteria di 6 biomarker, scelti come indicatori di stress ossidativo, in due tessuti: branchie e ghiandola digestiva. I dati ottenuti mostrano una riduzione dell'attività del lisozima, sia dopo esposizione a micro- che a nanoplastiche ed una riduzione della attività fagocitaria dopo esposizione alle sole microplastiche. L'effetto sull'attività dell'acetilcolinesterasi non appare di rilievo mentre l'attività della catalasi nelle branchie mostra una risposta a campana, con aumento alle basse concentrazioni di contaminanti e diminuzione alle concentrazioni più alte; non c'è effetto sull'enzima nelle ghiandole digestive. L'effetto sull'attività dell'enzima glutatione S-transferasi nelle branchie e nelle ghiandole digestive non è risultata significativa. Si osserva un aumento dell'accumulo della malondialdeide nei tessuti significativo alle dosi maggiori di micro e nanoplastiche. Nell'insieme 21 giorni di trattamento a micro e nanoplastiche inducono moderati effetti ossidanti e riducono la risposta immunitaria anche a concentrazioni ambientali.

**PAROLE CHIAVE:** microplastiche, nanoplastiche, biomarker, risposta immunitaria, mitilo mediterraneo, *Mytilus galloprovincialis*

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1. I Rifiuti Marini	1
1.2. Le Microplastiche	4
1.2.1. Definizione, origine e distribuzione	4
1.2.2. Impatti	6
1.3. Le Nanoplastiche	8
1.3.1. Definizione, origine e distribuzione	8
1.3.2. Impatti	10
1.4. Stato Dell'arte	11
1.4.1. Microplastiche	11
1.4.2. Nanoplastiche	12
1.4.3. Micro <i>versus</i> Nanoplastiche	14
1.5. Gaps And Needs	15
1.5.1. Microplastiche	15
1.5.2. Nanoplastiche	16
<b>2. IL MITILO MEDITERRANEO COME ORGANISMO MODELLO</b>	<b>17</b>
2.1. Criteri tassonomici e distribuzione	17
2.2. Caratteri distintivi e anatomia	17
2.3. Sistema immunitario	19
2.4. Specie biondicatrice	19
<b>3. STRESS OSSIDATIVO</b>	<b>21</b>
<b>4. BIOMARKER</b>	<b>23</b>
4.1. Biomarker immunologici	23
4.2. Biomarker di stress ossidativo e di neurotossicità	24
<b>5. SCOPO DELLA RICERCA</b>	<b>27</b>
<b>6. MATERIALI E METODI</b>	<b>28</b>
6.1. Esecuzione dell'esperimento	28
6.2. Prelievo dei tessuti	30

6.3. Biomarker immunologici	31
6.3.1. Analisi dell'attività del lisozima	31
6.3.2. Analisi dell'attività fagocitaria	31
6.4. Biomarker di neurotossicità e stress ossidativo	33
6.4.1. Analisi dell'attività dell'acetilcolinesterasi	33
6.4.2. Analisi dell'attività di glutatione S-transferasi e catalasi	33
6.4.3. Determinazione della malondialdeide	34
6.5. Analisi statistica	35
<b>7. RISULTATI</b>	<b>36</b>
7.1. Risposte immunologiche	36
7.1.1. Determinazione dell'attività del lisozima nel siero	36
7.1.2. Determinazione dell'attività fagocitaria in campioni di emolinfa	37
7.2. Determinazione dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi	38
7.3. Determinazione dell'attività enzima catalasi	39
7.3.1. Attività enzimatica della catalasi nelle branchie	39
7.3.2. Attività enzimatica della catalasi nella ghiandola digestiva	40
7.4. Determinazione dell'attività dell'enzima glutatione S-transferasi	41
7.4.1. Attività enzimatica della glutatione S-transferasi nelle branchie	41
7.4.2. Attività enzimatica della glutatione S-transferasi in ghiandole digestive	42
7.5. Determinazione della malondialdeide in ghiandole digestive	43
7.6. Correlazione tra biomarker	44
<b>8. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	<b>46</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>52</b>

# **1. INTRODUZIONE**

---

## 1.1. I RIFIUTI MARINI

Attualmente una delle problematiche emergenti a livello mondiale è quella della presenza di plastiche nell'ambiente marino (Dunlap & Scarce, 1991; Mato *et al.*, 2001; Gregory, 2009; Thompson *et al.*, 2009; Rochman *et al.*, 2013).

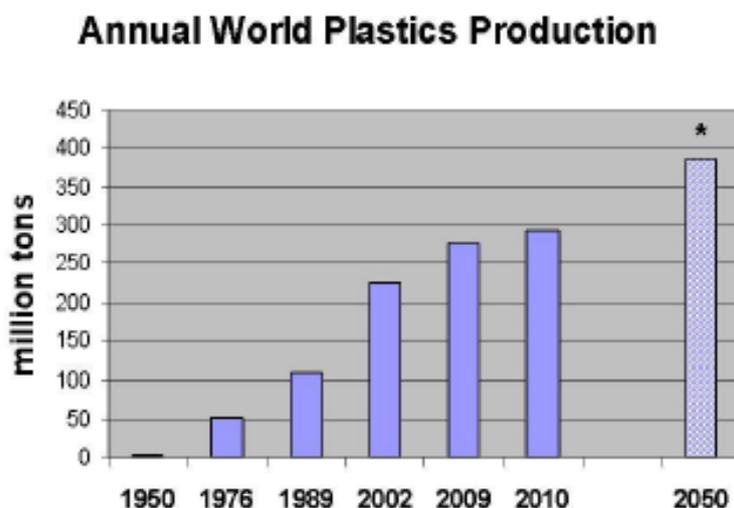
L'uso sempre più intenso della plastica nel mondo ha causato la formazione negli oceani di ampie aree di rifiuti galleggianti. Recentemente, durante una campagna oceanografica, Goletta Verde ha monitorato la presenza dei rifiuti galleggianti lungo le sue rotte: dei 1336 rifiuti antropogenici rilevati il 95,7% era costituito da plastica. Il monitoraggio di Goletta Verde ha evidenziato inoltre che il 90% dei rifiuti rinvenuti nell'Adriatico è di natura plastica, con una media di 27 pezzi di plastica per chilometro quadrato.

L'Unione Europea ha posto particolare attenzione al tema, con la Direttiva Quadro sulla Strategia Marina (2008/56/CE), recepita dall'Italia con il D.Lgs. 190/2010, la quale definisce l'ambiente marino come: «un patrimonio prezioso che deve essere protetto, salvaguardato e, ove possibile, ripristinato al fine ultimo di mantenere la biodiversità e preservare la vitalità di mari ed oceani che siano puliti, sani e produttivi» ed impone agli stati membri il raggiungimento, entro il 2020, del buono stato ecologico per le proprie acque marine.

Nei descrittori che determinano il “Good Environmental Status” oltre ai classici contaminanti ambientali particolare attenzione è stata posta sulle minacce emergenti, come la presenza di rifiuti plastici e dei loro effetti (Descrittore 10). Secondo il Programma globale per la protezione dell'ambiente marino da attività a terra i rifiuti marini sono stati definiti come “qualsiasi materiale solido persistente, fabbricato o trasformato e in seguito eliminato in ambiente marino costiero”, costituendo un problema complesso e articolato che sta assumendo proporzioni crescenti e che provoca danni irreversibili all'ecosistema marino e costiero, alla fauna, alla biodiversità e infine all'economia. Gli ecosistemi marini rappresentano i recettori finali in cui si concentrano la maggior parte delle sostanze inquinanti. Recentemente il Mar Mediterraneo è stato descritto come una delle aree nel mondo più colpite dai rifiuti marini, microplastiche comprese.

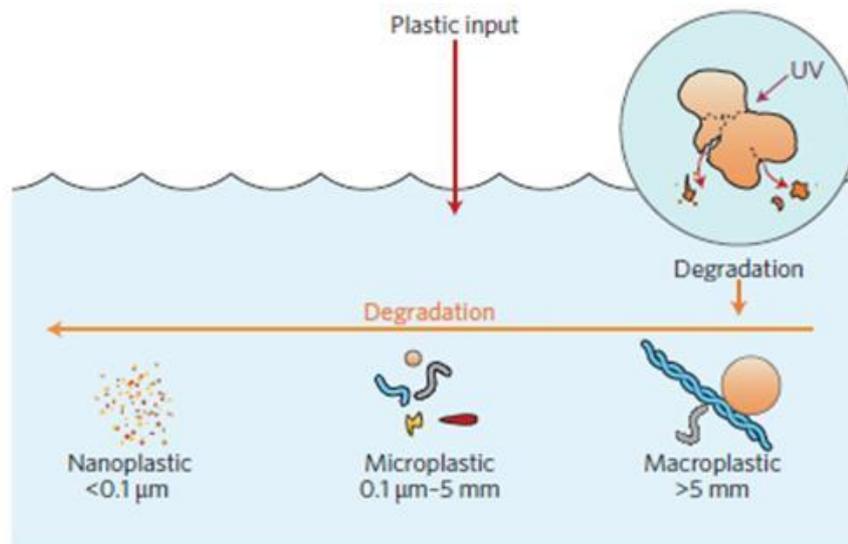
Molti di questi rifiuti, a livello locale, vengono trasportati dai fiumi o attraverso le reti idrauliche minori.

Le proprietà fisico-chimiche della plastica, l'uso estensivo nei prodotti e lo smaltimento indiscriminato sono i fattori chiave che contribuiscono alla presenza e all'abbondanza di materie plastiche negli ambienti marini. Si stima che entro il 2050 la produzione annua di plastiche a livello mondiale potrà essere di 400 milioni di tonnellate (Fig.1.1). Recentemente, uno studio dell'Università americana della Georgia, fa emergere un dato estremamente allarmante: ogni anno 13 milioni di tonnellate di rifiuti plastici finiscono nei mari con proiezioni preoccupanti anche per il futuro.



**FIGURA 1.1 - Produzione annuale mondiale di plastica dal 1950 al 2050**  
(<http://www.plasticsnews.com/article/20120830>)

Una volta nell'ambiente, la plastica permane per molti anni. Tuttavia, nel corso del tempo, la ripartizione delle materie plastiche nell'ambiente avviene attraverso una varietà di processi fisici e chimici, come ad esempio la biodegradazione e la fotodegradazione (Eriksen *et al.*, 2014; Andrady, 2011). Dato che le plastiche non sono biodegradabili, una volta riversate nell'ambiente acquatico, l'effetto combinato di esposizione a luce solare, acqua marina, stress micromeccanici ed altri fattori determina non solo la modifica chimica delle catene polimeriche, ma anche la progressiva scomposizione in frammenti sempre più piccoli fino a raggiungere dimensioni micro e nanometriche (Fig.1.2).



**FIGURA 1.2 - Illustrazione schematica della degradazione della plastica in mare ad opera di fattori abiotici in micro e nanoplastiche**

Convenzionalmente, i rifiuti plastici sono stati suddivisi in quattro classi dimensionali (Eriksen *et al.*, 2014):

- Le macroplastiche: rifiuti marini di plastica di dimensioni superiori a 200 mm
- Le mesoplastiche: rifiuti marini di plastica di dimensione inferiore i 200 mm
- Le microplastiche: rifiuti marini di plastica di dimensione inferiore i 5 mm

A queste classi è necessario aggiungere le nanoplastiche, le cui ridottissime dimensioni rendono tuttavia impossibile il loro campionamento tramite metodi tradizionali.

Le materie plastiche sono formate da lunghe catene di polimeri create da molecole di materie prime organiche ed inorganiche, come carbonio, silicio, idrogeno, ossigeno e cloruro; questi materiali sono solitamente ottenuti da petrolio, carbone e gas naturale (Shah *et al.*, 2008). Attualmente, le materie plastiche sintetiche più utilizzate sono polietilene a bassa e alta densità (PE), polipropilene (PP), cloruro di polivinile (PVC) e polistirene (PS). I polimeri sono usati raramente come sostanze pure, in genere le resine sono mescolate con additivi per migliorarne le prestazioni (Andrady & Neal, 2009; Teuten *et al.*, 2009). I detriti della plastica, oltre ad adsorbire sulla loro superficie molecole di composti inquinanti idrofobici (PCB, DDT e suoi metaboliti), nei processi di degradazione rilasciano delle sostanze (quali

ftalati, bisfenolo A, PBDE, alchilfenoli) che si ritrovano al loro interno essendo componenti della plastica aggiunti durante i processi di lavorazione.

Gli impatti di questi detriti sul biota e l'ambiente marino sono in gran parte sconosciuti. Gli effetti collaterali della plastica sono ascrivibili a danni fisici e locomotori, respiratori o alle appendici digestive in mammiferi marini, tartarughe, uccelli marini e crostacei (Andrady, 2011). Tra le diverse vie di assunzione, attraverso cui i detriti di plastica possono penetrare all'interno di un organismo, la più comune è senz'altro l'ingestione: ciò è stato documentato in più di 180 specie animali. Inoltre poiché la plastica si degrada molto lentamente, i frammenti possono fungere da substrati galleggianti per diversi organismi per cui possono contribuire al trasporto di specie esotiche rappresentando un ulteriore rischio per la biodiversità locale (Andrady, 2011). Quella dei rifiuti plastici marini riguarda una problematica legata strettamente alla gestione dei rifiuti ed ad una insufficiente capacità di recupero e riciclaggio dei materiali nella maggior parte degli Stati. Lo dimostrano i dati riguardanti la presenza di microplastiche in mare. Dati che dettano l'urgenza di serie politiche di prevenzione che coinvolgano istituzioni, cittadini, aziende e associazioni di categoria, dal mondo della pesca a quello del turismo. Sebbene non ci sia una legislazione per le microplastiche e le nanoplastiche come contaminanti, esiste un'ampia gamma di strategie politiche e raccomandazioni a livello europeo in materia di rifiuti marini che copre le fonti e gli impatti. A livello nazionale il Ministero dell'Ambiente è fortemente impegnato sulla questione dei rifiuti in mare, attraverso un approccio sinergico che lega gli aspetti connessi alla prevenzione a quelli legati al loro controllo, monitoraggio e rimozione.

## 1.2. LE MICROPLASTICHE

### 1.2.1. Definizione, origine e distribuzione

Negli ultimi anni le microplastiche sono state identificate come una delle principali forme di inquinamento degli ecosistemi marini. L'EFSA definisce con il termine microplastica una particella di origine antropica di dimensione compresa tra 0,1 e 5.000 micrometri (EFSA, 2016; Lusher *et al.*, 2017).

Le microplastiche possono essere classificate in primarie e secondarie. La loro origine può essere classificata in primaria, se prodotta direttamente per una specifica applicazione, per esempio, l'industria cosmetica utilizza microplastiche non biodegradabili come agente esfoliante in prodotti di uso quotidiano che non vengono trattenute dai filtri e finiscono direttamente in mare. Oppure secondaria, se deriva dalla frammentazione di oggetti più grandi in seguito a fenomeni di frammentazione (Barnes *et al.*, 2009).

Recentemente anche il processo di lavaggio di tessuti sintetici è stato identificato come una fonte di inquinamento da microplastiche.

Le microplastiche sono state osservate sulla superficie acquatica in tutto il mondo a partire dagli anni '70, in particolare nelle zone subtropicali. Le ridotte dimensioni e la bassa densità delle microplastiche contribuiscono al loro trasporto su larga scala attraverso le correnti oceaniche (Cole *et al.*, 2011; Eriksen *et al.*, 2013). La loro presenza è stata documentata in ogni habitat dell'oceano aperto e dei mari chiusi, comprese spiagge, acque superficiali, la colonna d'acqua e il fondale marino (Lusher *et al.*, 2015). Le microplastiche sono state segnalate lungo le coste di tutti i continenti, in località remote come l'arcipelago Atlantico (Ivar do Sul *et al.*, 2013; Lima, Barletta & Costa, 2016) e zone artiche (Obbard *et al.*, 2014; Lusher *et al.*, 2015) ed antartiche (Waller *et al.*, 2017). In generale sono più abbondanti nelle spiagge e nei sedimenti infralitorali e vicino a zone altamente popolate mentre tra le zone costiere quelle industriali sono state identificate come hotspot di microplastiche. Studi quantitativi su micro detriti in oceano aperto e nelle zone intertidali in prossimità delle città industriali hanno confermato la natura onnipresente delle microplastiche (Eriksen *et al.*, 2014). Secondo questi autori, la plastica micrometrica rappresenta oltre il 92% dei detriti plastici totali galleggianti, stimati in 5,25 miliardi di particelle a livello globale. Le microplastiche si sono accumulate negli oceani e nei sedimenti di tutto il mondo negli ultimi anni raggiungendo la massima concentrazione ambientale pari a 100.000 particelle di plastica per m<sup>3</sup> di acqua (Noren & Naustvoll, 2010). Nonostante siano numericamente più abbondanti nell'ambiente marino (Andrady, 2011; Claessens *et al.*, 2011; Cozar *et al.*, 2014; Law & Thompson

2014) recenti indagini ancora in via di sviluppo mostrano la loro presenza anche in sistemi di acqua dolce (Faure *et al.*, 2012; Dubaish & Liebezeit, 2013; Eriksen *et al.*, 2013; Lechner *et al.*, 2014; Eerkes-Medrano *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2015).

Le microplastiche sono diventate un serio problema ambientale a causa della loro persistenza, ubiquità e potenziale tossico in tutti gli ambienti acquatici (Gusmao *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Anderson *et al.*, 2017).

### 1.2.2. Impatti

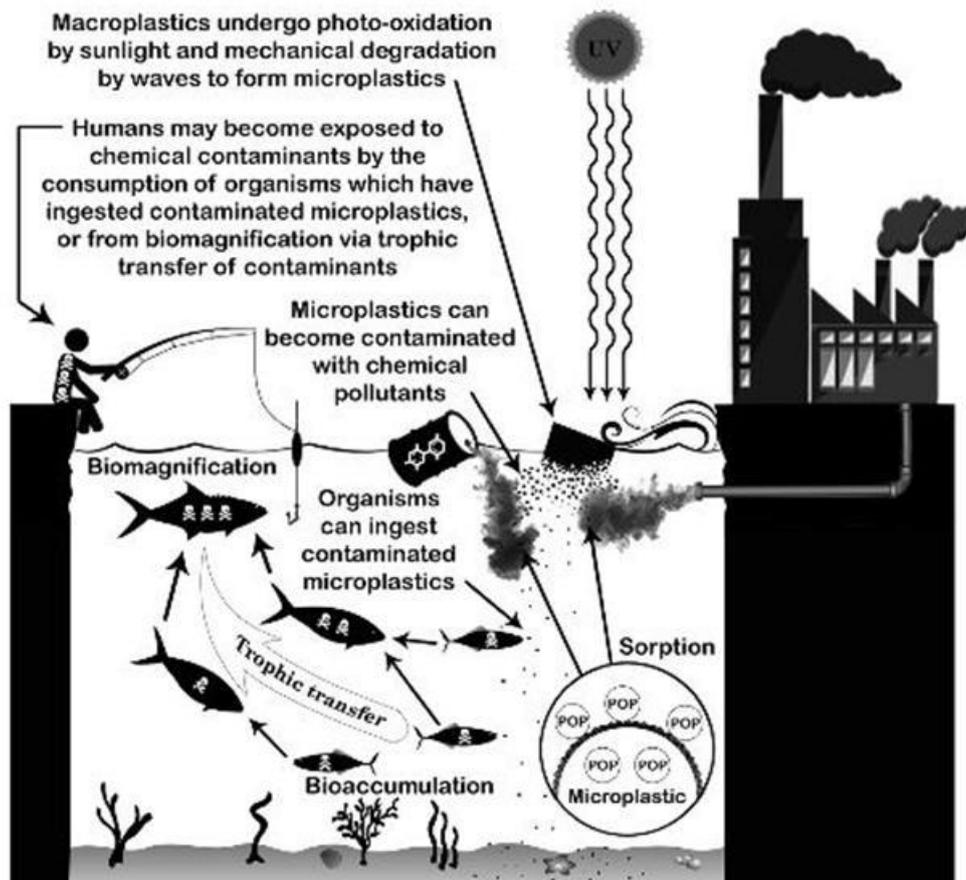
Le microplastiche sono state riconosciute come inquinanti marini emergenti di notevole preoccupazione (Engler, 2012; Rochman *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). Sono considerate tossiche per via dell'incremento dato dalle sostanze chimiche che vengono assorbite sulla loro superficie, come gli ftalati, i PCB, i composti organo clorurati e i metalli pesanti (Teuten *et al.*, 2007; Ashton *et al.*, 2010; Gauquie *et al.*, 2015; Seltenrich, 2015). È probabile infatti che l'ingestione di plastiche micrometriche porti, come conseguenza, al bioaccumulo di diverse sostanze tossiche, con effetti deleteri a lungo termine sullo stato di salute della specie esposta direttamente con effetti a cascata lungo tutta la catena trofica.

Uno dei principali rischi ambientali associati alle microplastiche è la loro biodisponibilità per gli organismi marini (Wright *et al.*, 2013; Desforges *et al.*, 2015). La loro captazione è stata osservata in specie pelagiche e bentoniche con diverse strategie di alimentazione (Tourinho *et al.*, 2010; Murray & Cowie, 2011; Cole *et al.*, 2013; Lusher *et al.*, 2013) con conseguenze fisiche, chimiche o biologiche sugli organismi marini con potenziale impatto sulla catena trofica e sulla salute umana (Gall *et al.*, 2015; Vandermeersch *et al.*, 2015). Una volta ingerite, queste particelle possono essere trattenute e ostruire il tratto digestivo (Derraik, 2002; Besseling *et al.*, 2013), essere assimilate e trasferite nei tessuti (Browne *et al.*, 2008; Von Moos *et al.*, 2012; Farrel & Nelson, 2013) e agire come vettore di altre sostanze tossiche nella catena alimentare (Mato *et al.*, 2001; Teuten *et al.*, 2009; Browne *et al.*, 2013; Farrel & Nelson, 2013). Come risultato di tali interazioni, possono verificarsi una serie di effetti sugli organismi, dal danno fisico (Besseling *et al.*, 2013) agli stress fisiologici, cellulari e molecolari (Von Moos *et al.*, 2012; Browne *et al.*, 2013; Cole *et*

*al.*, 2013; Avio *et al.*, 2015). Da questi impatti sui singoli livelli, possono verificarsi ulteriori cambiamenti ambientali. È stato osservato come il fattore di stress influenzi il tasso di crescita e la riproduzione di un organismo (Resgalla *et al.*, 2007). Questo può influenzare l'abbondanza e la distribuzione delle sue specie in un luogo specifico, che, a sua volta, può influenzare lo stato di questo ambiente.

Il trasferimento attraverso le catene alimentari è un altro rischio per gli ecosistemi marini derivanti dall'assunzione di microplastiche. Studi recenti indicano che gli organismi con microplastiche nell'intestino possono trasferire queste particelle al livello trofico successivo dopo essere state consumate al posto di una preda (Farrel & Nelson, 2013; Setälä *et al.*, 2014).

Da questa biotrasformazione, l'ingestione di microplastiche può raggiungere organismi che non ingeriscono la plastica direttamente dall'ambiente circostante (Fig.1.3). Inoltre, solleva l'ipotesi di bioaccumulo attraverso l'assunzione di cibo e la conseguente risalita lungo le reti alimentari, aumentando eventualmente il numero di specie colpite da impatti di microplastiche. Poiché gli studi sul campo hanno trovato organismi importanti dal punto di vista commerciale con microplastiche ingerite (Lusher *et al.*, 2013; Foekma *et al.*, 2013; Mathalon & Hill, 2014; Van Cauwenberghe & Jassen, 2014; Witte *et al.*, 2014; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015), anche l'uomo può risentire di questo inquinamento. Fondamentalmente, gli invertebrati acquatici tendono a trovarsi alla base della catena alimentare, pertanto, il consumo di microplastiche contaminate da parte degli invertebrati acquatici potrebbe funzionare, come conseguenza del bioaccumulo e della biomagnificazione, da contaminante in tutta la catena alimentare. In definitiva, sono necessari ulteriori studi scientifici per comprendere appieno i meccanismi coinvolti e per valutare i pericoli che ciò può rappresentare.



**Figura 1.3 - Meccanismo di biomagnificazione e bioaccumulo**

A causa delle loro piccole dimensioni, le microplastiche hanno un intervallo di dimensioni simili agli organismi planctonici e ad altre particelle sospese, rendendole disponibili per una serie di invertebrati marini (Wright *et al.*, 2013; Ory *et al.*, 2017). Studi a breve termine hanno mostrato infatti che molte specie di invertebrati marini con diverse strategie di alimentazione possono ingerire le microplastiche. Esempi di questi organismi sono i policheti, bivalvi, echinodermi e copepodi, i quali assumono detriti di plastica dall'ambiente (Thompson *et al.*, 2004). Restano però molto limitati i dati sull'esposizione cronica alle microplastiche e i relativi effetti.

### 1.3. LE NANOPLASTICHE

#### 1.3.1. Definizione, origine e distribuzione.

Una chiara definizione di cosa si intende per nanoplastica ancora non è disponibile (Koelmans *et al.*, 2015) e, di conseguenza, sulla base della definizione di nanaomateriale riconosciuta a livello internazionale si suppone che una particella di

plastica sia detta *nano* quando almeno una delle sue dimensioni è < 100 nm (Klaine *et al.*, 2012). La loro ampia distribuzione è preoccupante (Cole *et al.*, 2013; Klein *et al.*, 2015). Una delle principali fonti di materiali polimerici nanometrici nei sistemi acquatici risulta essere quella dei cosmetici scaricati nelle acque reflue (Zitko e Hanlon, 1991; Gregory, 1996; Fendall & Sewell, 2009; Carr *et al.*, 2016; Duis & Coors, 2016). Tuttavia questa non è l'unica fonte, ma va inclusa anche quella di origine industriale (Lechner *et al.*, 2014; Sadri & Thompson, 2014). La frammentazione di oggetti di plastica di maggiori dimensioni costituisce una terza fonte di nanoplastiche nell'ambiente acquatico (Eerkes-Medrano *et al.*, 2015). Un processo chiave per le nanoparticelle risulta essere l'etero-aggregazione con detriti galleggianti o alghe che ne determina il trasporto e la sedimentazione (Wang *et al.*, 2015). Una volta nell'ambiente, i polimeri sono suscettibili al degrado attraverso processi biotici e abiotici (Lambert *et al.*, 2014). In particolare fattori abiotici determinano la perdita delle proprietà strutturali aumentando la superficie disponibile per una possibile colonizzazione microbica (Eubeler *et al.*, 2010). Le nanoplastiche sono probabilmente la tipologia meno nota e conosciuta tra i rifiuti marini, ma potenzialmente risultano essere quelle maggiormente pericolose, poichè non solo risultano capaci di attraversare le barriere biologiche, ma a causa della loro elevata superficie possono avere implicazioni significative nel meccanismo di bioaccumulo e nella bioamplificazione di altri inquinanti. Le nanoplastiche sono costituite da polimeri composti da un insieme di catene polimeriche di varie lunghezze. Le catene sono chimicamente collegate da deboli legami secondari o mediante interazione fisica. Le interazioni deboli sono suscettibili alla rottura a basso livello di energia che porta alla disgregazione in particelle sempre più piccole. La letteratura limitata fornisce alcune prove degli effetti delle nanoplastiche sugli organismi marini e di acqua dolce ma a concentrazioni relativamente elevate, cioè superiori a circa 0,5 mg/L. Al momento non ci sono concentrazioni ambientali di nanoplastiche a cui questo valore può essere confrontato, ma la concentrazione più bassa di 0,54 mg/L (Casado *et al.*, 2013) è di circa 4 ordini di grandezza superiore a 0,4 ng/L, concentrazioni di microplastiche trovate in acque dolci degli Stati Uniti (Eriksen *et al.*, 2013), ma quasi simile alla concentrazione più elevata

stimata nell'acqua di mare. Vari tipi di additivi vengono aggiunti durante la produzione di materie plastiche per aumentarne la resistenza, inoltre i residui monomerici possono rimanere all'interno del materiale plastico. In particolare per le nanoplastiche, l'elevata area superficiale può causare affinità di assorbimento molto forte per i composti tossici esterni, il che implica che sono sempre caricati con sostanze tossiche idrofobiche o tracce di metalli (Rochman 2013,2014; Holmes *et al.*, 2014).

### 1.3.2. Impatti

Le conseguenze delle nanoplastiche non sono solo di natura sanitaria, ambientale ed ecologica, ma anche economica. Dopo le preoccupazioni sollevate da molti autori in merito i pericoli posti dalle microplastiche negli ambienti acquatici (Browne *et al.*, 2007; Fendall & Sewell, 2009; Claessens *et al.*, 2011; Bergmann *et al.*, 2015; Katsnelson, 2015; Rocha-Santos & Duarte, 2015) studi recenti hanno dimostrato che esiste una nuova classe di detriti di plastica, ancora più preoccupante: i nanoplasticidi. La maggior parte degli additivi sono di piccole dimensioni e non sono legate chimicamente al polimero, di conseguenza sono in grado di lisciviare dalla plastica; tali composti possono penetrare nelle membrane cellulari ed essere coinvolti in reazioni biochimiche con conseguenti effetti tossici (Hammer *et al.*, 2012). Nonostante la loro ubiquità, l'impatto delle nanoparticelle di plastica è per la maggior parte dei casi sconosciuto, eccetto che per l'ingestione che causa sia un danno meccanico come la perforazione del tubo digerente che un danno fisico come il trasporto nella catena alimentare (Acampora, 2014). Inoltre la maggior parte degli studi si sono concentrati sui potenziali effetti bioaccumulativi delle nanoplastiche dimostrando la capacità di permeare nelle membrane lipidiche, indurre cambiamenti nella sua struttura e in tal modo influenzarne le funzioni cellulari (Rossi *et al.*, 2014). In precedenza, uno studio di Xia *et al.*, ha dimostrato che nanoplastiche di polistirene di 60 nm erano altamente tossiche nei confronti dei macrofagi e delle cellule epiteliali (Xia *et al.*, 2008). Questi rischi sono ulteriormente esacerbati dal potenziale assorbimento di sostanze chimiche, in particolare, di inquinanti organici persistenti (POP) (Andrady, 2011). Questo aspetto risulta di particolare importanza per materiali di dimensioni nanometriche, in quanto la loro

superficie è caratterizzata da un elevato rapporto area-volume (Fulekar, 2010). Pertanto questi materiali possono diventare una nuova fonte di esposizione di sostanze chimiche tossiche da parte di chi le ingerisce (Lambert *et al.*, 2014). Un rischio meno studiato nelle particelle più grandi, ma noto nelle nanoplastiche è quello di fornire una nuova via per le specie invasive. Ad esempio è stata segnalata la presenza di un patogeno responsabile dell'erosione scheletrica di coralli caraibici ed hawaiani (Goldstein *et al.*, 2014) arrivato attraverso l'associazione con plastica di dimensione nanometrica. Esistono rischi e minacce derivanti dalla presenza di nanoplastiche nell'ambiente, tuttavia a causa della difficoltà nel quantificarle, la valutazione del loro impatto economico non è di facile comprensione.

## 1.4. STATO DELL'ARTE

### 1.4.1. Microplastiche

I molluschi bivalvi sono spesso utilizzati per indagare l'ingestione, il trasferimento lungo la catena trofica, e l'impatto ecotossicologico delle microplastiche (Von Moos *et al.*, 2012; De Witte *et al.*, 2014; Avio *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015,2016) poiché ritenuti buoni modelli biologici sia in studi sul campo che in condizioni di laboratorio. Evidenze sperimentali infatti mostrano la loro suscettibilità ad ingerire, trattenere ed assimilare le microplastiche dopo esposizioni acute in condizioni controllate (Browne *et al.*, 2008; Von Moos *et al.*, 2012; Avio *et al.*, 2015). Nello specifico sono state mostrate tre specie di mitili capaci di ingerire microplastiche quali *Mytilus edulis* (Browne *et al.*, 2008; Santana, 2012) e *Mytilus galloprovincialis* (Avio *et al.*, 2015) e di come in seguito, questo provocasse una serie di effetti biologici, dal danno fisico (Besseling *et al.*, 2013) agli stress fisiologici, cellulari e molecolari (Von Moos *et al.*, 2012; Browne *et al.*, 2013; Cole *et al.*, 2013; Avio *et al.*, 2015).

Le maggiori preoccupazioni che riguardano questo contaminante sono legate alle sue dimensioni (Moore *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2013). Essendo piccole, le microplastiche presentano una superficie idrofobica relativamente grande, facilitando l'assorbimento e l'aderenza di sostanze tossiche che possono lisciviare agli organismi dopo l'assorbimento (Mato *et al.*, 2001; Browne *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2013; Zettler *et al.*, 2013; McCormick *et al.*, 2014). Una serie di recenti studi

ha mostrato esempi di assunzione di microplastiche con dimensioni diverse ed impatti biologici: Browne *et al.* (2008) hanno analizzato gli effetti delle microplastiche di due dimensioni (3  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ ) sull'assorbimento, la traslocazione e la vitalità cellulare in *M. edulis*, dimostrando che le particelle più piccole possono accumularsi più facilmente negli organismi e che l'esposizione a breve termine non causa effetti biologici significativi; tuttavia un altro caso studio ha messo in luce come l'ingestione di microplastiche di polistirene della dimensione di 2 e 6  $\mu\text{m}$  causi effetti tossici in *Mytilus spp.* (Paul-Pont *et al.*, 2016). Processi infiammatori e stress ossidativo risultano presenti in esemplari adulti di *M. edulis* e *M. galloprovincialis* dopo essere stati esposti a microparticelle di polietilene (PE) e polipropilene (PP) (Von Moos *et al.*, 2012; Avio *et al.*, 2015). La maggior parte dei dati pubblicati mostrano per lo più risposte in seguito ad esposizioni acute, mentre le informazioni sulla contaminazione cronica sono ancora limitate (Van Cauwenberghe *et al.*, 2013) come resta in gran parte sconosciuto se questi effetti si verificano anche a concentrazioni realistiche di microplastiche.

Tra gli organismi che possibilmente ingeriscono le microplastiche, ci sono specie di bivalvi commercialmente importanti come dimostrato in studi in campo (Foekma *et al.*, 2013; Lusher *et al.*, 2013; Mathalon e Hill, 2014; Van Cauwenberghe & Jassen, 2014; Witte *et al.*, 2014; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015). Soggetti di *M. edulis* contaminati da microplastiche sono stati segnalati in regioni costiere (Mathalon e Hill, 2014; Van Cauwenberghe & Jassen, 2014; Van Cauwenberghe *et al.*, 2015) sia in animali selvatici che in animali di allevamento (Mathalon e Hill, 2014; Van Cauwenberghe & Jassen, 2014) suggerendo i rischi significativi di tale interazione.

#### 1.4.2. Nanoplastiche

In merito alle nanoplastiche la maggior parte degli studi sembra concentrarsi sull'uso di nanoparticelle di polistirene (PS), al contrario di altri polimeri frequentemente riscontrati come ad esempio, il polietilene (PE) o polipropilene (PP) (Rocha-Santos & Duarte, 2015). Le nanoparticelle di polistirene (NP PS) possono essere considerate come un modello per studiare gli effetti delle nanoplastiche negli organismi marini: dati recenti sulla tossicità delle nanoplastiche di polistirene

in embrioni di riccio di mare hanno sottolineato che gli invertebrati marini possono essere dei bersagli biologici per le nanoplastiche. Gli studi di ecotossicità che utilizzano materie plastiche di dimensioni nanometriche negli ecosistemi marini e di acqua dolce sono recenti. In uno studio di ecotossicità, Ward & Kach (2009) hanno analizzato la tossicità delle nanoplastiche PS (100 nm) su *M. edulis* e *Crassostrea virginica* dopo un'esposizione di 45 minuti, registrando sia l'ingestione che l'egezione in entrambe le specie, concludendo che le nanoplastiche rimangono nel corpo più a lungo delle microplastiche e che possono traslocare nella ghiandola digestiva. Wegner *et al.* (2012) hanno esposto a nanoplastiche di PS (20 nm) adulti di *M. edulis* dimostrando una leggera diminuzione dell'attività di filtraggio. Canesi *et al.* (2015, 2016) hanno studiato gli effetti di nanoparticelle di polistirene di 50 nm negli emociti del bivalve *M. galloprovincialis* esposti a diverse concentrazioni (1, 5, 50 mg / ml) ed hanno osservato una diminuzione dose-dipendente nell'attività fagocitaria e un aumento dell'attività del lisozima (Fig.1.4). Nanoparticelle di polistirene hanno anche stimolato l'aumento di specie reattive dell'ossigeno (ROS) extracellulare con effetti massimali a concentrazioni basse. Inoltre chiari segni di tossicità sono risultati più evidenti solo alle concentrazioni più alte (50 mg/ml). I risultati dimostrano che negli invertebrati marini i meccanismi delle difese immunitarie possono rappresentare un significativo target per nanoparticelle di polistirene. La maggior parte degli studi elencati hanno usato il peso su volume come unità di nanoplastica a causa delle difficoltà nel calcolare il numero di particelle

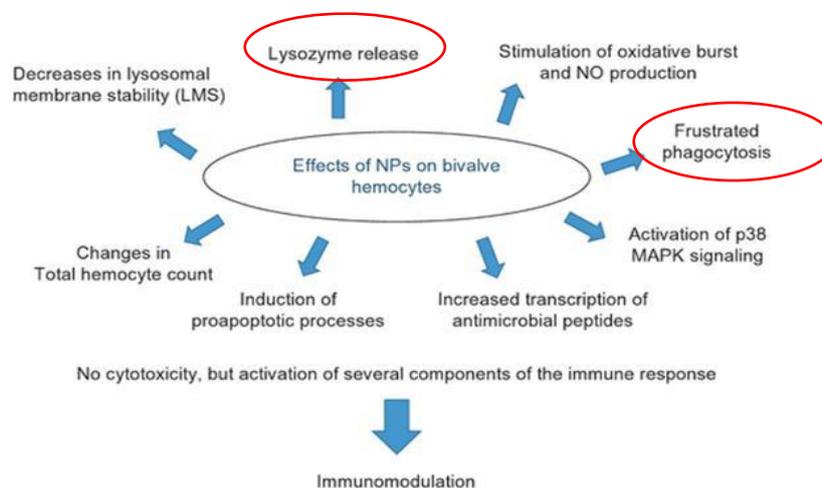


FIGURA 1.4 - Rappresentazione degli effetti in vivo e in vitro di nanoplastiche di polistirene su emociti di bivalvi (Canesi *et al.*, 2015,2016)

### 1.3.3. Micro versus nanoplastiche

Diversi studi hanno confrontato le tossicità e gli effetti delle microplastiche rispetto alle nanoplastiche. Lee *et al.* (2013) ha condotto studi di tossicità usando micro e nanoplastiche semplici e fluorescenti (50 nm, 500 nm e 6 µm) indagando il tasso di mortalità, l'ingestione, e l'output riproduttivo nella specie *Tigriopus japonicus* dimostrando che la dimensione di 50 nm non aveva influenzato la fecondità mentre tutte le altre dimensioni avevano fisicamente inibito la fertilizzazione. In un altro studio, Jeong *et al.* (2016) utilizzando le medesime dimensioni di nano e microplastiche hanno registrato un maggior stress ossidativo in *Brachionus koreanus* esposti a 50 nm. In conclusione la tossicità delle micro e nanoplastiche dipende dalla dimensione, e plastiche più piccole sembrano essere più tossiche di quelle più grandi.

Riassumendo, negli invertebrati acquatici gli effetti osservati in seguito l'assunzione di microplastiche sono ascrivibili a stress ossidativo, reazioni infiammatorie, disturbi endocrini, disturbi della fitness e trasferimento di altre sostanze tossiche (Von Moos *et al.*, 2012; Besseling *et al.*, 2013; Browne *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2013; Rochman *et al.*, 2014). Sebbene questi processi siano meglio studiati per i composti micrometrici, è stato osservato bioaccumulo negli organismi marini anche per le nanoparticelle (Hanna *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2012), il che potrebbe far supporre che tali rischi esistono anche per plastiche nanometriche in molluschi bivalvi.

## 1.5. GAPS AND NEEDS

### 1.5.1. Microplastiche

La presenza di micro e nanoplastiche nell'ambiente è stata dimostrata in maniera inequivocabile, così come i numerosi effetti ecotossicologici su più organismi. Tuttavia, va notato che questi esperimenti in laboratorio ricorrono a quantità di particelle che superano di gran lunga quelle riscontrate nell'ambiente (Costa *et al.*, 2017) oltretutto vi sono ancora alcune incertezze riguardo alla loro prevalenza realistica e alle loro azioni biologiche nonostante i loro effetti siano riportati, sia quando si verificano in modo isolato o come veicolo di altri inquinanti. Le lacune

negli studi tossicologici su organismi acquatici per le microplastiche sono ascrivibili alla mancanza di un test biologico standardizzato per valutarne la tossicità. In aggiunta i metodi attuali per il campionamento e la segnalazione di dati non sono standardizzati e spesso vi è una mancanza di repliche, che limita la validità dei dati e la loro significatività statistica. Attualmente non sono stati condotti studi a livello di popolazione e non c'è evidenza scientifica di effetti negativi da ingestione di microplastiche in ambiente acquatico selvatico e di allevamento. Gli studi a livello di popolazione risultano essere ostacolati non solo dal problema dei costi, ma anche dai molteplici fattori ambientali a cui sono sottoposti animali allevati e selvatici che possono velare il possibile ruolo svolto dalle microplastiche in questo contesto multifattoriale. Solo avendo una conoscenza più definitiva delle loro fonti, il destino e gli effetti sarà possibile creare regolamenti adeguati ed efficienti che mirino a ridurre la loro presenza. Alla luce di quanto sopra riportato, risulta necessario:

- ✓ Valutare la relazione dose-risposta di microplastiche ingerite da specie modello basato su un approccio biomarcatore integrato
- ✓ Valutare gli effetti fisico-chimici di microplastiche commerciali e microplastiche separate da materie plastiche raccolte nell'ambiente
- ✓ Utilizzare microplastiche con diverse proprietà chimiche e fisiche
- ✓ Utilizzare livelli di microplastiche rispettosi delle effettive concentrazioni in ambiente
- ✓ Valutare i danni agli organismi con un'ottica di studio sulla salute umana
- ✓ Selezionare i migliori biomarcatori per il monitoraggio
- ✓ Sulla base di comportamenti noti, identificare le specie marine o gli stati di vita che risultano più vulnerabili all'esposizione delle microplastiche

Infine sono necessari protocolli per condurre esperimenti di esposizione realistica di microplastiche in studi di tossicità in laboratorio (UNEP, 2016).

### 1.5.2. Nanoplastiche

La natura recalcitrante della plastica e il conseguente accumulo con conseguenze ecotossicologiche deleterie sono state al centro di numerosi studi (Eerkes-Medrano *et al.*, 2015; Fisher *et al.*, 2015; Katsnelson, 2015; Rocha-Santos & Duarte, 2015;

Duis & Coor, 2016), tuttavia questi si sono concentrati esclusivamente sulle plastiche di dimensione micrometrica. Poca attenzione è stata dedicata alle nanoplastiche (Koelmans *et al.*, 2015), che sono di particolare interesse, poiché è stato dimostrato essere più facilitate nel passare le membrane biologiche (Bergmann *et al.*, 2015) e nell'assorbire sostanze tossiche (Velzeboer *et al.*, 2014). Sono necessarie ulteriori ricerche sui specifici meccanismi di tossicità e assorbimento cellulare di nanoplastiche per valutarne l'impatto sul biota marino. Attualmente non esistono metodi analitici per l'identificazione e la quantificazione delle nanoplastiche nei prodotti alimentari, quindi mancano del tutto dati sull'eventuale presenza negli alimenti e le possibili implicazioni sulla salute umana. Pertanto studi futuri sulle nanoplastiche dovrebbero concentrarsi su argomenti più urgenti quali, per esempio, le interazioni con il biota marino, il trasferimento trofico e gli effetti generazionali come anche gli effetti a lungo termine in seguito esposizioni croniche. Infine incrementare i dati di tossicità sulle nanoplastiche per la valutazione del rischio sulla salute umana attraverso lo sviluppo e la standardizzazione di metodiche analitiche in grado di valutarne la presenza, l'identità e la quantità nei prodotti destinati al consumo umano.

## 2. IL MITILO MEDITERRANEO COME ORGANISMO MODELLO

---

### 2.1. Criteri tassonomici e distribuzione

*Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), originario del Mar Mediterraneo, appartiene alla famiglia *Mytilidae*, ordine *Mytiloidea*, classe *Bivalvia*, phylum *Mollusca*.

### 2.2. Caratteri disitintivi e anatomia

*M. galloprovincialis* (Fig.2.1) è un mollusco bivalve dotato di una conchiglia di carbonato di calcio costituita da due valve uguali che presenta dei sottili cerchi concentrici rappresentanti le fasi di crescita. Il colore della superficie è nero-violacea mentre l'interno presenta un aspetto madreperlaceo. Le due valve convesse sono articolate fra loro tramite una cerniera mobile ed internamente dai muscoli adduttori posteriore ed anteriore. Adeso alla superficie interna delle valve vi è il mantello, una lamina di tessuto connettivo, che racchiude tutta la massa viscerale e produce all'esterno la conchiglia, inoltre è sede della gametogenesi. I bordi del mantello si prolungano formando dei sifoni per l'entrata e l'uscita dell'acqua: si possono distinguere un sifone inalante superiore ed un sifone esalante inferiore con funzione escretoria. La respirazione avviene attraverso le branchie, responsabili sia dello scambio gassoso che della captazione delle particelle alimentari. Risultano situate tra la massa viscerale ed il mantello, e sono composte da due emibranchie, ognuna delle quali presenta a sua volta due lamelle, una ascendente e una discendente, tenute assieme da giunzioni connettivali. Tra i lobi del mantello e lateralmente in mezzo alle branchie vi è situato il piede, costituito dalla ghiandola bissogena, la quale produce dei filamenti che costituiscono il bisso che permette la fissazione al substrato. Il sistema muscolare è composto da due muscoli adduttori anteriori, un muscolo adduttore posteriore e dai muscoli retrattori del piede e riveste un importante ruolo per la sopravvivenza di questa specie, infatti a valve chiuse può resistere fuori dall'acqua anche per diversi giorni. Le particelle alimentari parzialmente digerite vengono convogliate alla ghiandola digestiva, che consiste in una serie di diverticoli comunicanti con lo stomaco. Lo stomaco è dotato di sacco dello stilo e, al suo interno, vi è un

bastoncello trasparente e compatto detto stilo cristallino. In esso sono racchiusi enzimi digestivi come amilasi, lipasi e cellulasi. La ghiandola digestiva dei molluschi è il centro principale per la regolazione del metabolismo poiché partecipa ai meccanismi di difesa immunitaria e di regolazione omeostatica del mezzo interno, così come ai processi di disintossicazione e eliminazione degli xenobiotici (Moore & Allen, 2002). Infine, il materiale digerito viene convogliato nell'intestino fino a raggiungere l'apparato escretore collocato sotto la cavità pericardica. L'apparato circolatorio è costituito da una circolazione aperta. Posto dorsalmente, il cuore è composto da un ventricolo, il principale propulsore dell'emolinfa, e da due atri. I caratteri esterni non permettono la distinzione tra i due sessi, che invece si riconoscono dalla colorazione del mantello: giallo crema nei maschi e rosso arancio nelle femmine. Gli esemplari di questa specie presentano generalmente sessi separati e una fecondazione esterna. Le gonadi sono costituite da tessuto ghiandolare che si insinua tra gli organi digestivi e nel mantello. L'alimentazione dei molluschi bivalvi è microfaga, ossia a base di plancton e di piccole particelle organiche mantenute in sospensione nell'acqua (Mengoli, 1998). I mitili sono organismi sessili filtratori con ampia distribuzione geografica, che vivono in colonie adese a substrati rocciosi. I molluschi bivalvi, in particolare i mitili della specie *M. galloprovincialis* rivestono una risorsa economica importante in quanto specie edibile di interesse zootecnico.

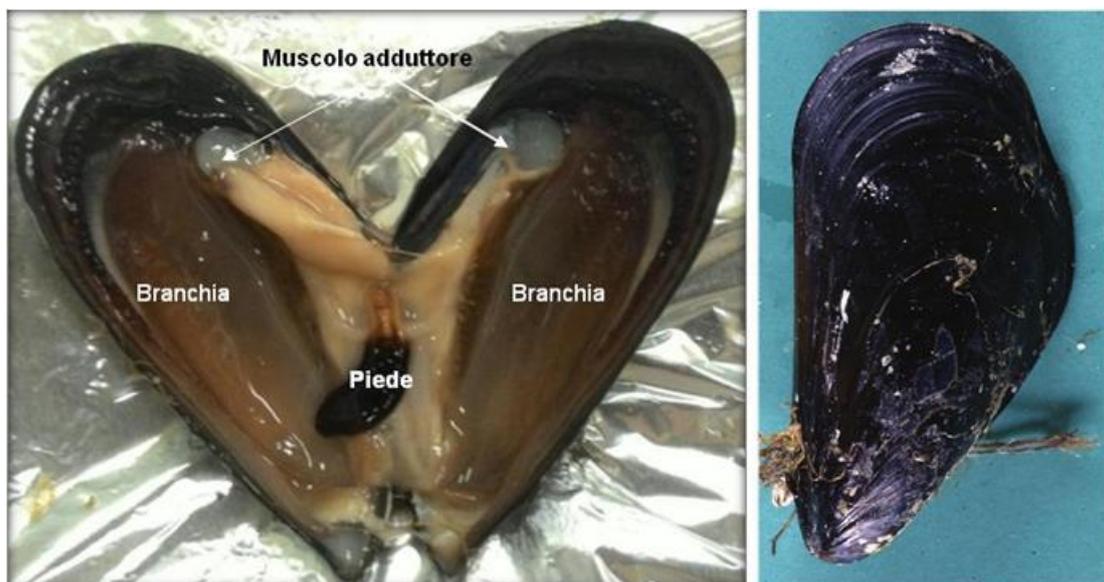


Figura 2.1 - Anatomia di un esemplare adulto di mitile mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*)

### 2.3. Sistema immunitario

La relativa semplicità del sistema immunitario degli invertebrati fa di questi organismi dei sistemi viventi potenzialmente sensibili nel monitoraggio dell'inquinamento ambientale. I mitili presentano un sistema vascolare aperto ed il fluido circolante è l'emolinfa che pervade la maggior parte degli organi. Tra gli invertebrati marini, i mitili, sono provvisti di un sistema immunitario non specifico che coinvolge componenti cellulari e umorali. La risposta immunitaria si espleta soprattutto attraverso la fagocitosi del materiale estraneo mediata dagli emociti, la produzione di enzimi idrolitici (lisozima), di intermedi reattivi dell'ossigeno (ROS) e di fattori umorali (opsonine e agglutinine) (Canesi *et al.*, 2002). Gli emociti (cellule dell'emolinfa) svolgono diverse funzioni, in particolare costituiscono il sistema immunitario e sono importanti per l'accumulo di sostanze nutritive, di prodotti del metabolismo e dei pigmenti respiratori. Il lisozima fa parte delle difese cellulari e umorali degli invertebrati, ed agisce contro una vasta gamma di agenti estranei. È stato identificato e caratterizzato in una varietà di invertebrati, ed infezioni e lesioni ne inducono la sintesi (Malham *et al.*, 1998). Quando le cellule presentano un sovraccarico di prodotti di degradazione, possono verificarsi profonde alterazioni strutturali della membrana lisosomiale che determinano a loro volta la perturbazione dei naturali processi di degradazione e digestione intracellulare. Se protratta nel tempo questa condizione può avere come peggiore conseguenza la comparsa di fenomeni più o meno generalizzati di necrosi cellulare dovuta alla diffusione degli enzimi idrolitici (lisozima) nel citoplasma con importanti ripercussioni sullo stato nutrizionale degli individui esposti alle fonti inquinanti (UNEP/RAMOGGE, 1999). La risposta cellulare negli invertebrati è basata su reazioni di difesa, tra cui la fagocitosi (Wright, 1981). Tale attività è svolta da vari tipi emocitari che sono in grado di fagocitare i microbi e secernere nell'emolinfa sostanze solubili citotossiche (Mitta *et al.*, 2000). L'esposizione agli inquinanti può compromettere la risposta immunitaria dell'organismo.

### 2.4. Specie bioindicatrice

Molti composti xenobiotici e contaminanti dell'ambiente acquatico possono venire accumulati nei tessuti degli organismi in concentrazioni superiori a quelle

ambientali; alcuni di questi, accumulandosi, possono risultare tossici e produrre gravi danni biologici (Kadhim *et al*, 1990; Mailman *et al*, 2006).

Con il termine di “bioindicatore” o organismo “sentinella” si intende un organismo che, mediante risposte identificabili a condizioni di stress, fornisce informazioni sulla qualità dell’ambiente (Bargagli *et al.*, 1998). Requisiti fondamentali affinché una specie possa essere utilizzata come bioindicatore sono: la sensibilità all’ambiente contaminato, ma al contempo resistente in ambienti di scarsa qualità, l’ampia diffusione geografica (Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2006), una relativa semplicità nella manipolazione (Nasci *et al.*, 2002) e la capacità di sviluppare risposte sufficientemente rapide e ripetibili (Bargagli *et al.*, 1998). Difatti, lo stato sedentario o sessile, le abitudini alimentari preferibilmente di tipo filtratorio e la discreta conoscenza della fisiologia e delle risposte adattative hanno confermato in *M. galloprovincialis* un’elevata capacità di bioaccumulo e limitata capacità di metabolizzare gli xenobiotici, aumentando l’uso di questo organismo come indicatore della presenza di inquinanti nelle acque costiere (Geyer *et al*, 1982). I mitili sono inoltre facilmente allevabili in condizioni di laboratorio e per tale motivo vengono spesso impiegati in test ecotossicologici volti a determinare eventuali correlazioni tra la presenza di specifici inquinanti nelle acque e l’alterazione dei processi biologici che definiscono il ruolo ecologico della specie negli ecosistemi marino costieri.

### 3. LO STRESS OSSIDATIVO

---

Lo stress ossidativo (Fig.3.1) è l'espressione biologica di un danno che si verifica quando i fattori pro-ossidanti superano le difese antiossidanti. L'equilibrio esistente in condizioni fisiologiche può essere turbato sia da fattori che potenziano la produzione di specie reattive dell'ossigeno, sia da fattori che riducono l'attività dei sistemi di difesa antiossidanti dell'organismo. Molti xenobiotici o i loro metaboliti possono provocare stress ossidativo. I mitili, in quanto organismi filtratori, accumulano una gran varietà di sostanze presenti nell'ambiente, alcune delle quali (composti organici e metalli pesanti) inducono un aumento della produzione di radicali nell'organismo (Winston & Di Giulio, 1991). La tossicità dell'ossigeno è definita come la causa degli effetti citotossici delle Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), noti anche come intermedi reattivi dell'ossigeno, radicali liberi dell'ossigeno o ossidoradicali (Di Giulio *et al.*, 1989; Halliwell & Gutteridge, 1999; Winzer, 2001). L'esposizione ad elevate concentrazioni di queste sostanze può quindi alterare l'equilibrio tra pressione pro-ossidante e difese antiossidanti inducendo una condizione di stress ossidativo nei mitili.



**FIGURA 3.1 - Rappresentazione schematica dello stress ossidativo in una cellula attaccata da radicali liberi dell'ossigeno (ROS)**

I sistemi di difesa degli organismi che si oppongono all'azione dei ROS includono enzimi antiossidanti. Generalmente la condizione redox del sistema antiossidante viene valutata attraverso l'analisi dei suoi principali componenti cioè specifici enzimi antiossidanti e scavengers a basso peso molecolare (Regoli & Principato, 1995).

Inoltre le cellule emocitiche producono ROS durante la fagocitosi e contengono vari enzimi antiossidanti per proteggersi (Pipe *et al.*,1993). I livelli intracellulari di questi antio-ossidanti però sono facilmente sopraffatti da un maggiore formazione di ossido radicali (Winston *et al.*,1996) ed effetti deleteri possono determinarsi sull'integrità della membrana lisosomiale. Invertebrati marini, in particolare molluschi bivalvi come mitili e ostriche sono stati ampiamente utilizzati negli ultimi anni come bioindicatori sensibili agli inquinanti nell'ambiente acquatico associati alla generazione di ROS (Viarengo & Canesi, 1991; Livingstone & Pipe, 1992). La rilevanza di questo fenomeno ha fatto sì che venissero studiate e messe a punto tutta una serie di analisi su campioni biologici in grado di dimostrare la presenza di un danno ossidativo ed eventualmente di definirne l'entità.

## 4. I BIOMARKER

---

Rispetto ai test di tossicità tradizionali, i biomarker hanno dimostrato essere indicatori più sensibili per valutare le alterazioni nella fisiologia degli organismi esposti a micro e nanoparticelle (Klaper *et al.*, 2008). L'idea di utilizzare i biomarkers nel settore delle indagini ecotossicologiche si è manifestata per la prima volta con le ricerche pionieristiche degli anni '70 di Bayne *et al.* (1976) e Payne (1977). Si definisce come biomarker quella risposta e o quelle risposte che un organismo bioindicatore può generare nei confronti di uno o più agenti stressanti (chimici o fisici). Pertanto risulta prioritaria, per un'indagine basata sull'utilizzo di biomarker, la scelta a monte di un valido organismo bioindicatore. I molluschi bivalvi sono comunemente usati come bioindicatori per le misurazioni di biomarker (Cossu *et al.*, 1997; Dellali *et al.* 2001; Regoli *et al.* 2004; Lehtonen *et al.*,2006; Gagné *et al.* 2008; Martin-Diaz *et al.* 2008). Inoltre i biomarker possono fornire un'indicazione degli impatti sub-letali dei fattori di stress, così come i meccanismi biochimici sottostanti, ed indire un "preallarme" di possibili impatti a livello di popolazione. È stato sottolineato che analisi più specifiche come l'immunotossicità, la genotossicità, lo stress ossidativo possono aiutare a capire maggiore meccanismi tossici e modalità di azione che potrebbero essere rilevanti per diversi tipi di micro e nanoparticelle negli organismi acquatici (Crane *et al.*, 2008).

### 4.1. Biomarker immunologici

In studi pregressi è stato segnalato che contaminanti xenobiotici possono influenzare negativamente il sistema immunitario in organismi marini (Harvell *et al.*,1999) aumentando la suscettibilità agli agenti patogeni (Pipe & Coles, 1995). L'impiego di biomarker immunologici negli studi di biomonitoraggio sull'inquinamento nei bivalvi non è così comune come i biomarker biochimici. La maggior parte degli studi si sono limitati nel valutare l'attività lisozimatica e fagocitaria (Pipe *et al.*, 1995; Fournier *et al.*, 2002; Auffret *et al.*, 2006; Luna-Acosta *et al.*, 2010) in poche specie resilienti ottenendo dei risultati molto variabili (Oliver & Fisher 1999; Wootton *et al.*,2003a), tuttavia recentemente si è dimostrato che i meccanismi dell'immunità innata negli invertebrati marini sono una base utile per la

valutazione di impatti ambientale da nanoparticelle (Canesi & Procházová, 2013). Pertanto sono necessarie ulteriori ricerche a riguardo. In quest'ottica, al fine di valutare i possibili effetti dose-risposta in seguito all'esposizione di micro e nanoplastiche nel mitilo mediterraneo, si sono scelti come biomarcatori immunologici l'attività lisozimatica e la fagocitosi.

- Attività lisozimatica: è noto che i bivalvi, come invertebrati, mancano di una risposta immunitaria adattativa ma possiedono un sistema immunitario innato abbastanza efficace per combattere e controllare molte particelle estranee (compresi gli xenobiotici). I meccanismi immunitari degli emociti nei bivalvi includono diversi enzimi (Hansen *et al.*, 1991; Pipe, 1992) tra i quali il lisozima riveste il ruolo più importante (McDade & Tripp, 1967; Cheng & Rodrick, 1974; Hardy *et al.*, 1976). Il lisozima è una proteina in grado di tagliare alcune molecole che si trovano sulla parete dei batteri. Sfruttando la capacità batteriolitica di questo enzima si può determinare la sua attività nei campioni di emolinfa sia trattati che di controllo. Una riduzione dell'attività lisozimatica suggerisce l'immunosoppressione.

- La fagocitosi costituisce il principale evento immunitario nei molluschi bivalvi marini e gli emociti rappresentano le cellule deputate ai processi di riconoscimento, adesione, inglobamento e degradazione del non-self (Bachère *et al.*, 1995) oltre che un'efficace sistema difensivo ossidante osservato in esemplari di mitili (Roch, 1999; Anderson, 2001). Il test di fagocitosi quantifica la capacità degli emociti di inglobare particelle di lievito Zymosan (*Saccharomyces cerevisiae*, Zymosan A, Sigma).

#### 4.2. Biomarker di stress ossidativo e neurotossicità

Il meccanismo alla base della maggior parte dei saggi che impiegano biomarcatori di stress ossidativo è legato al cambiamento nella attività del sistema di difesa dei ROS. Tra i numerosi biomarker modificati in risposta allo stress ossidativo possiamo citare: l'attività dell'enzima Glutathione S-transferasi e l'attività della Catalasi (Viarengo *et al.*, 1988; Orbea *et al.*, 2002; Regoli *et al.*, 2002; Geret *et al.*, 2003; Orbea & Cajaraville, 2006). Questi test enzimatici si sono dimostrati adatti per monitorare gli effetti degli inquinanti sugli organismi sentinella.

La risposta enzimatica alle sostanze chimiche tossiche mostra una forma a campana con un aumento iniziale dovuto all'attivazione disintesi enzimatica seguita da una diminuzione dell'attività enzimatica.

- Attività dell'enzima Glutathione S- transferasi (GST): coinvolto nei processi di detossificazione l'attività di questo enzima è stata proposta come biomarker di difesa per diverse specie acquatiche compresi i molluschi (Lafontaine *et al.*, 2000). I livelli di GST possono essere modificati da una vasta gamma di xenobiotici e anche da fattori abiotici: l'induzione è indice di un'attivazione delle difese cellulari (Rocher *et al.*, 2006), mentre l'inibizione GST è stata indicata come una risposta più aspecifica (Regoli *et al.*, 2003).

- Attività della Catalasi (CAT): la catalasi è un enzima antiossidante appartenente alla classe delle ossidoreduttasi; considerato di difesa poiché è coinvolto nei processi di detossificazione. La misura dell'attività di questo enzima permette di individuare un eventuale stress ossidativo causato da agenti xenobiotici (Viarengo *et al.*, 2007). Nei bivalvi un aumento dell'attività catalitica è stata segnalata in un certo numero di studi quando un eccesso di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) era presente (Pellerin-Massicotte 1997; Cheung *et al.*, 2004). Precedentemente alcuni studi hanno indicato un'induzione dell'attività della CAT in *M.galloprovincialis* in seguito all'esposizione di metalli pesanti (Vlahogianni *et al.*, 2007).

- Attività dell'Acetilcolinesterasi (AChE): l'acetilcolinesterasi è un enzima appartenente alla classe delle idrolasi coinvolto nella trasmissione dell'impulso nervoso che catalizza l'idrolisi del neurotrasmettitore acetilcolina, utilizzato come un biomarcatore di neurotossicità. La sua inibizione è causata principalmente dall'esposizione agli organofosfati e pesticidi (Fulton & Key, 2001). È stato dimostrato che anche altre sostanze chimiche come i metalli pesanti e gli IPA possono inibire l'attività di AChE (Guilhermino *et al.*, 1998; Akcha *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2004) negli invertebrati. E' stato caratterizzato anche nei mollusci, ad es in *Ostrea edulis* (Valbonesi *et al.*, 2003). Alcune specie di bivalvi hanno un'attività AChE minima, come nel caso di *Tapes philippinarum* (Valbonesi *et al.*, 2003). Senza ulteriori prove, AChE dev'essere considerato, per ora, un biomarcatore a

bassa sensibilità di stress nei molluschi bivalvi, la cui variazione nell'attività deve essere correlato agli effetti neurotossici a livello di organismo (Viarengo *et al.*, 2007).

- Concentrazione della Malondialdeide

La malondialdeide (MDA) è il principale prodotto terminale della perossidazione lipidica a carico delle membrane biologiche. Questa molecola viene spesso utilizzata come indicatore della presenza di un danno ossidativo (Fig.4.1). Il livello di MDA, è stato misurato nei molluschi bivalvi, specialmente in mitili, per studiare la risposta del biomarker in presenza di radicali liberi sotto diverse esposizioni di metalli (Romeo & Gnassia-Barelli, 1997; Geret *et al.*, 2002a,b).

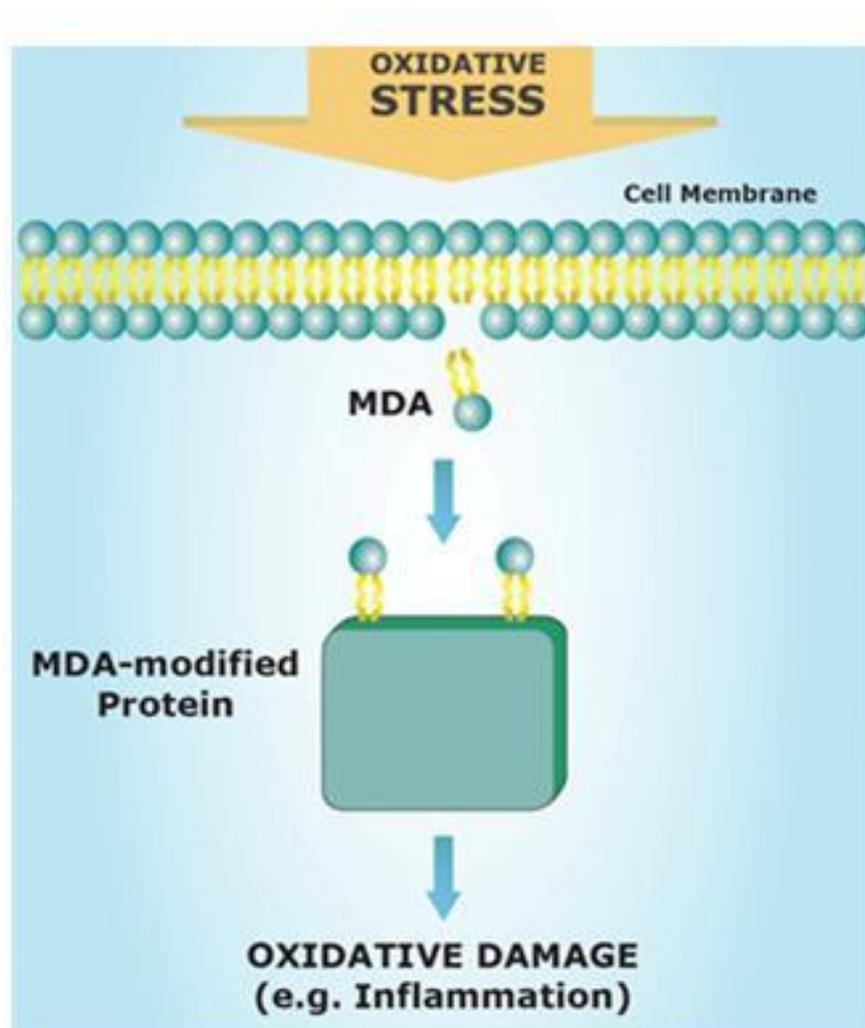


Figura 4.1 - La malondialdeide (MDA) come biomarker di stress ossidativo

## **5. SCOPO DELLA RICERCA**

---

La contaminazione dell'ambiente marino da parte delle micro- e delle nanoplastiche è oggi una realtà su scala mondiale. Il presente lavoro di tesi si colloca all'interno di un progetto più vasto, JPI Ocean PLASTOX Project, volto ad indagare l'ingestione, il trasferimento lungo la catena trofica, e l'impatto ecotossicologico delle microplastiche (MP) sulle principali specie ed ecosistemi marini europei. In particolare, lo scopo della presente ricerca è stato di valutare la potenziale tossicità di microplastiche (3 µm) e nanoplastiche (50 nm) in mitili, *Mytilus galloprovincialis*, sottoposti ad un dosaggio basso (LOW) pari a 1,54 ng/L, intermedio (MEDIUM) pari a 15,4 ng/L di polistirene, e alto (HIGH) pari a 154 ng/L di polistirene, al fine di ottenere informazioni circa la eventuale dose-risposta. Gli studi sulla interazione del biota marino con le nanoplastiche sono pochissimi, per cui un obiettivo era anche di correlare gli eventuali effetti con le dimensioni delle plastiche. Il minor dosaggio somministrato corrisponde al valore più alto misurato in ambiente acquatico (Norèn e Naustvoll, 2010). L'esperimento è stato condotto in ambiente controllato e protratto per 21 giorni per valutare le possibili alterazioni cellulari e fisiologiche a lungo termine. E' stata misurata la capacità di risposta da parte del sistema immunitario dei mitili, analizzando gli emociti. Possibili effetti subletali delle plastiche sono stati valutati in tessuti di ghiandola digestiva e branchie utilizzando una batteria di 6 biomarker, selezionati come indicatori di stress ossidativo.

## **6. MATERIALI E METODI**

---

### 6.1 Esecuzione dell'esperimento

La parte sperimentale di questo lavoro di tesi è stata effettuata presso il laboratorio di Fisiologia e Biochimica ambientale del CIRSA dell'Università di Bologna con sede a Ravenna. Per la prova sono stati utilizzati mitili di taglia commerciale ottenuti dal Centro di Raccolta Molluschi di Cesenatico (Fig. 6.1). Inizialmente sono stati scelti circa 500 individui adulti e posizionati in vasche areate con diffusori a pietra porosa in ambiente termostato alla temperatura di 16 °C. In queste condizioni i mitili sono stati mantenuti per 3 giorni per favorirne l'acclimatazione e consentire di individuare ed eliminare eventuali esemplari in stato di salute non idoneo.



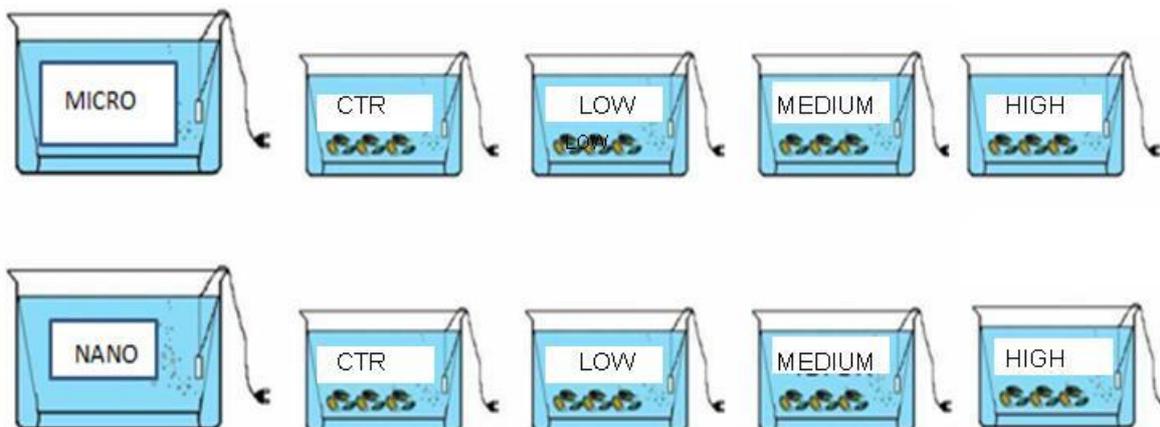
**Figura 6.1 - Mitili provenienti da Cesenatico**

Successivamente, i mitili sono stati esposti a trattamenti a concentrazioni crescenti di microplastiche di 3  $\mu\text{m}$  e nanoplastiche da 50 nm (Polyscience inc., Fluoresbrite Plain YG, 441/486 nm eccitazione/emissione; densità 1.05 g/cm<sup>3</sup>). Per ciascuna delle 2 tipologie di particelle, i mitili sono stati sottoposti ad un dosaggio basso (LOW) da 1,54 ng/L di polistirene, ad un dosaggio intermedio (MEDIUM) da 15,4 ng/L di polistirene, e ad un dosaggio alto (HIGH) da 154 ng/L di polistirene.

**Tabella 6.1 – Trattamenti effettuati**

Trattamenti	N° di repliche	N° di mitili per vasca	Concentrazione di microplastiche (particelle/L)	Concentrazione di nanoplastiche (particelle/L)
Controllo	3	20	/	/
<b>Microplastiche</b>				
High	3	20	10.000	
Medium	3	20	1.000	
Low	3	20	100	
<b>Nanoplastiche</b>				
High	3	20		$2,17 \times 10^7$
Medium	3	20		$2,17 \times 10^6$
Low	3	20		$2,17 \times 10^5$

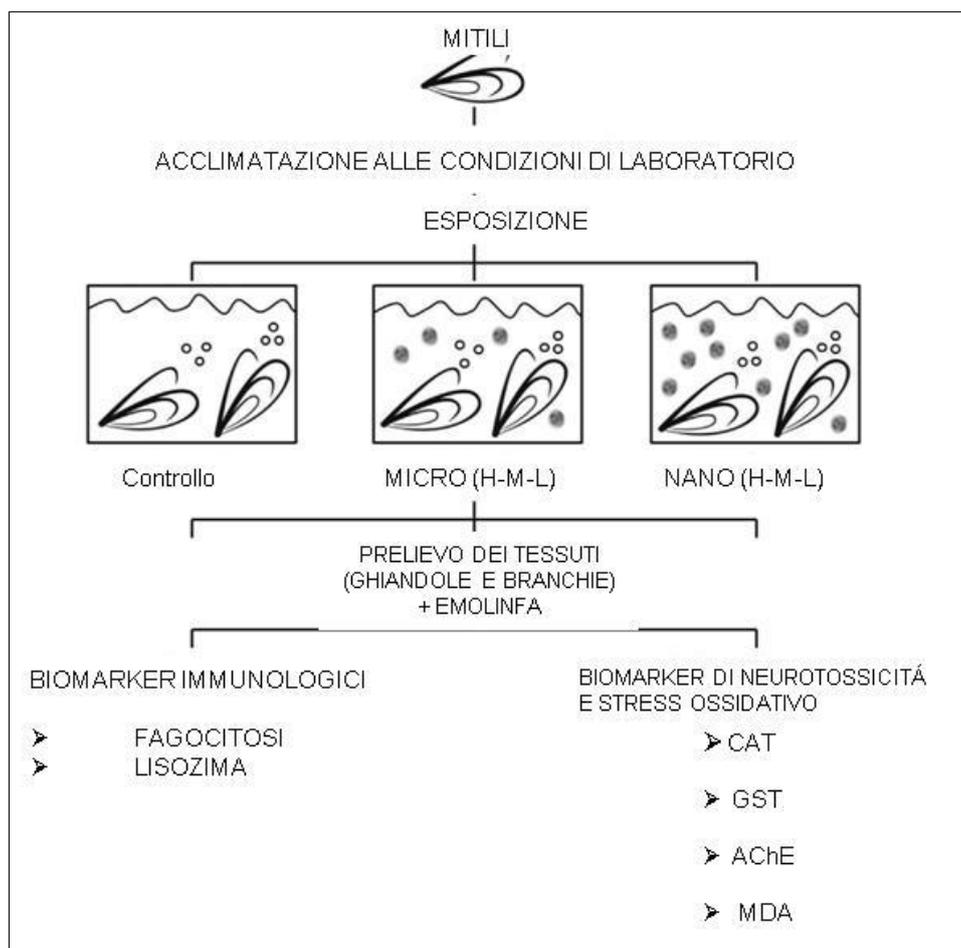
Tenuto conto delle diverse dimensioni tra le particelle utilizzate, i trattamenti effettuati sono stati caratterizzati da un diverso numero di particelle per litro tra microplastiche e nanoplastiche, come mostrato in tabella 6.1. La concentrazione di microplastiche più bassa (100 particelle / L) è equivalente al livello più alto misurato in ambiente marino-costiero (Norèn e Naustvoll, 2010). Ogni trattamento è stato effettuato in triplicato (N = 3) all'interno di vasche contenenti 20 mitili in 10 L di acqua di mare (Figura 6.2). Microplastiche e nanoplastiche sono state somministrate giornalmente per la durata complessiva di 21 giorni insieme al cibo (microalghe delle specie *Nannochloropsis oculata*, 1000 cell / mL), dopo il cambio dell'acqua. Un trattamento contenente solo acqua di mare (controllo) è stato effettuato in parallelo.



**Figura 6.2- Illustrazione dei trattamenti effettuati nelle vasche in ambiente controllato. Ogni trattamento è stato effettuato in triplicato.**

## 6.2 Prelievo dei tessuti

Terminata la fase di esposizione, si è proceduto al campionamento dei tessuti (Fig.6.3). Per le analisi immunologiche di fagocitosi e lisozima un pool di emolinfa da 4 animali per vasca è stato prelevato dal muscolo adduttore utilizzando una siringa ipodermica da 2.5 mL, contenente una piccola quantità (100 µL) di soluzione fisiologica per mitilo. L'analisi di catalasi e glutatione S- transferasi è stata effettuata sia nella ghiandola digestiva che nelle branchie appartenenti a 4 mitili per replica (vasca). La determinazione della malondialdeide è stata effettuata su ghiandole digestive estratte da 4 animali per replica. Infine l'attività dell'acetilcolinesterasi è stata valutata nelle branchie di 4 organismi per replica. Tutti i campioni di ghiandola digestiva ed emibranchie sono stati congelati in azoto liquido e conservati a – 80°C sino al momento del loro successivo utilizzo.



**Figura 6.3 - Schema del campionamento dei tessuti**

## 6.3 Biomarker immunologici

### 6.3.1. Analisi dell'attività del lisozima

L'attività del lisozima è stata analizzata spettrofotometricamente secondo il metodo di Chu & La Peyre (1989), utilizzando una sospensione di batteri *Micrococcus lysodeikticus*. Il metodo si basa sul calo graduale di assorbanza a 450 nm proporzionato all'attività litica del lisozima contenuto nel siero di emolinfa di mitilo nei confronti del batterio sopracitato.

L' emolinfa prelevata dai mitili è stata centrifugata a 400 xg per 10 minuti a 4°C al fine di separare gli emociti dal siero. A parte, cellule batteriche di *M. lysodeikticus* sono state risospese in tampone fosfato (0,066 M, pH 6.24) fino ad ottenere una soluzione contenente 9 mg di batteri liofilizzati / 100 mL di tampone. Il siero prelevato da ogni campione è stato quindi aggiunto alla soluzione contenente *M. lysodeikticus* (rapporto siero: batteri 1:10) e sottoposto a lettura spettrofotometrica a 450 nm ad intervalli di un minuto (per 10 min totali). L'attività è stata espressa in Unità (U) su g di proteine secondo il protocollo ufficiale Sigma (Milano, Italia), in cui 1 U viene considerata l'attività di enzima in grado di determinare una diminuzione di assorbanza pari allo 0,001. I dati sono espressi come unità di lisozima per g di proteine di emolinfa. La concentrazione totale di proteine nell'emolinfa è stata misurata con il metodo Lowry *et al.* (1951).

### 6.3.2 Analisi dell'attività fagocitaria

L'attività fagocitaria degli emociti di mitilo è stata analizzata come riportato da Canesi *et al.* (2005). Il metodo è basato sulla quantificazione della capacità degli emociti di inglobare particelle di lievito Zymosan (*Saccharomyces cerevisiae*, Zymosan A, Sigma Aldrich, Milano, Italia)(Fig. 6.4). Aliquote (20 µl) di emolinfa sono state poste su vetrini da microscopia e mantenute per 30 min. al buio a 16°C per permettere l'adesione degli emociti. Dopo aver scolato il liquido in eccesso gli emociti sono stati esposti ad una sospensione di particelle di Zymosan allo 0,05% precedentemente colorato con Neutral Red in tampone Tris-HCl (TBS) 0.05 M.

## Assay Principle

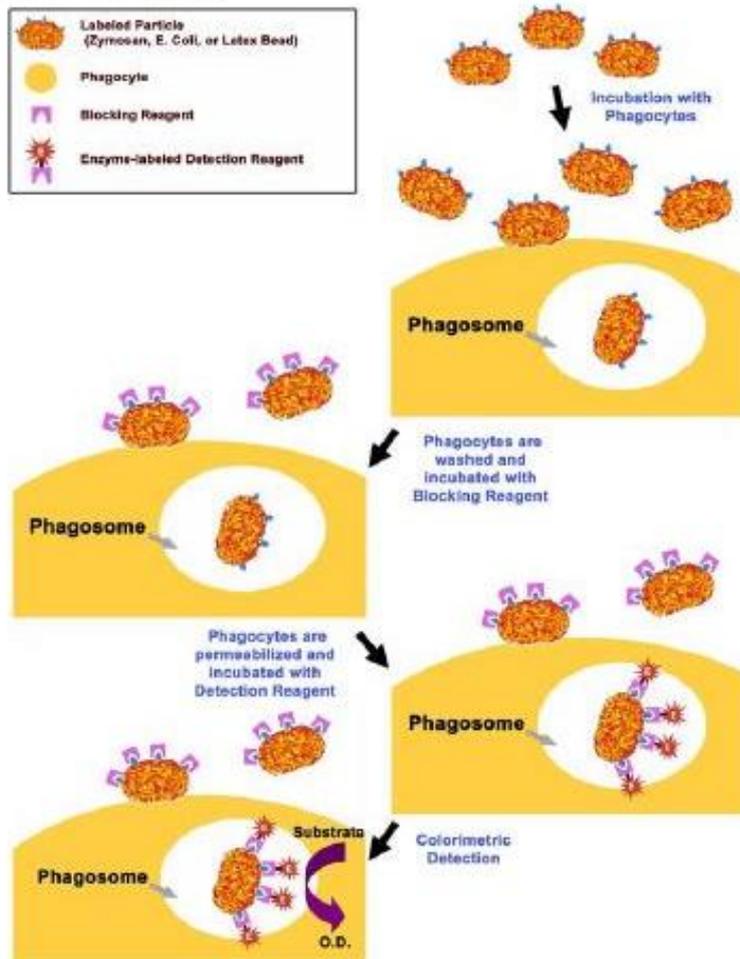


Figura 6.4 – Illustrazione del metodo utilizzato per la valutazione dell'attività fagocitaria

Dopo 1h di incubazione, i vetrini sono stati esposti ad una soluzione contenente formalina al 4% (Baker's formol solution) e dunque fissati con gel di glicerina. L'analisi è stata effettuato in quadruplicato per ogni campione sperimentale su campi visivi di 50-100 cellule ciascuno.

L'attività fagocitaria è stata espressa a seguito dell'osservazione dei campioni al microscopio ottico (Zeiss Axioskop 40, ingrandimento 40X) come percentuale di cellule fagocitanti lo Zymosan rispetto al totale delle cellule osservate (Fig. 6.5).

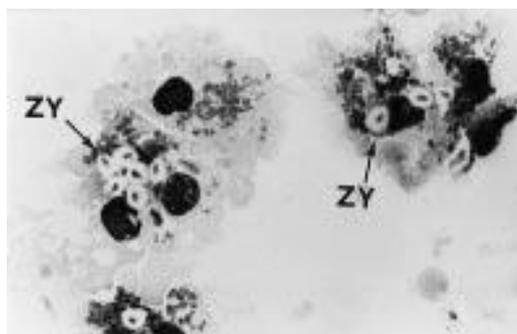


Figura 6.5 - Emocita di *M. galloprovincialis* fagocitante particelle di Zymosan (ZY); (Carballal et al., 1997)

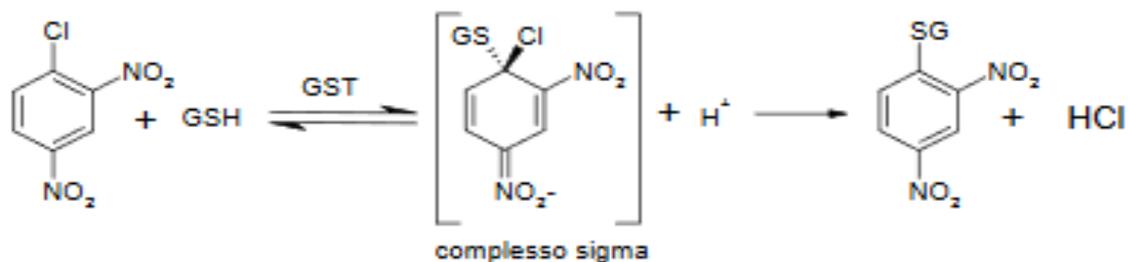
## 6.4. Biomarker di neurotossicità e stress ossidativo

### 6.4.1. Attività dell'acetilcolinesterasi

Il metodo impiegato per la valutazione dell'attività dell'acetilcolinesterasi è quello descritto da Ellman *et al.* (1961) e consiste nella misurazione spettrofotometrica del prodotto della reazione tra l'enzima presente nelle branchie di mitilo e il substrato acetiltiocolina, in presenza del reagente di Ellman (DTNB: acido 5,5 ditiobis 2 nitrobenzoico). Il tessuto branchiale appartenente a 4 mitili per vasca è stato omogenato attraverso un potter in 4 volumi di tampone fosfato 100 mM a pH 7.4. L'omogenato è stato dunque centrifugato a 8.000 xg a 4°C per 30 minuti. Aliquote di sovrantante sono state dunque incubate a 25°C in tampone fosfato contenente acetiltiocolina 0.5 M e 5.5' - acido dinotrobenzoico dithiobis (DTNB) 0.33 M. La reazione è stata analizzata spettrofotometricamente a 450 nm per 10 minuti. I dati sono espressi in nmol/min\*mg di proteina. Il contenuto proteico è stato analizzato secondo Lowry *et al.* (1951).

### 6.4.2. Analisi dell'attività di glutatione S- transferasi e catalasi

Per ogni vasca un pool di tessuti congelati di 3 emibranchie (~ 600 mg/mitilo) e di 3 ghiandole digestive (~ 1,5 g/replica) sono stati omogenati in 5 volumi di tampone di fosfato di potassio 50 mM (KPB) a pH 7 contenente acido etilendiamminotetraacetico 0,5 mM (Na<sub>2</sub>EDTA), 1 µL di cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma) ogni 100 mg totali. L'omogenato è stato centrifugato a 15.000 xg a 4°C per 15 minuti. Il surnatante è stato raccolto e utilizzato in parte per determinare la concentrazione di proteine totali e in parte congelato a -80°C, alla diluizione appropriata, da utilizzare in seguito per le analisi dell'attività degli enzimi catalasi e glutatione S-transferasi. L'attività enzimatica della GST è stata analizzata previa esposizione dei campioni a glutatione ridotto (GSH) in presenza di 1-Cl-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (0,8M). La reazione è stata monitorata per 10 minuti durante i quali è stata misurata ad intervalli regolari l'attività enzimatica (formazione del coniugato GSH-CDNB, come in figura 6.6) attraverso lettura spettrofotometrica a 340 nm effettuata utilizzando un lettore per micropiastre Biotek EL 808. L'attività finale è stata espressa come µmol/min/mg di proteine totali. Il contenuto proteico è stato analizzato secondo Lowry *et al.* (1951).



**Figura 6.6 - Schema rappresentante la reazione tra il GSH e il CDNB catalizzata dalle GST**

L'attività della CAT è stata determinata invece misurando la decrescita dell'assorbanza dei campioni a 240 nm (25°C) in seguito all'aggiunta di perossido di idrogeno (55 mM di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50 mM di KPB pH 7.0) utilizzando uno spettrofotometro modello DU 800 (Beckman). La reazione è stata osservata e misurata per 2 minuti e l'attività è stata espressa in nmol/min/mg di proteine totali. Il contenuto proteico è stato analizzato secondo Lowry *et al.* (1951).

#### 6.4.3. Determinazione del contenuto di malondialdeide

Il contenuto di malondialdeide nella ghiandola digestiva di mitilo è stato analizzato secondo il metodo di Banni *et al.* (2007). Per questa analisi, pool composti di ghiandole digestive appartenenti a 4 mitili per vasca (circa 1 g di tessuto complessivo) sono stati omogenati in 2 volumi di tampone Tris-HCL (20 mM, pH 7,4) contenente 0,1% di β-mercaptoetanololo. L'omogenato è stato poi centrifugato a 10.000 xg per 20 minuti a 4°C. Il surnatante ottenuto è stato in parte usato per la determinazione del contenuto proteico (Lowry *et al.*, 1951) e in parte usato per la determinazione del contenuto di MDA. Il principio del metodo si basa sulla reazione di coniugazione della malondialdeide con 1-metil 2 fenilindolo che dà luogo alla formazione di un composto con assorbanza rilevabile a lunghezze d'onda λ=586 nm. La reazione di coniugazione è stata condotta per 40 minuti a 45°C in bagnetto termostato a lenta agitazione. Dopo centrifugazione a 15.000 xg per 10 minuti a temperatura ambiente, il surnatante è stato misurato spettrofotometricamente in un lettore modello DU 800 (Beckman). Il saggio si è avvalso dell'utilizzo dello standard 1,1,3,3, tetrametossipropano (TMOP), trattato in maniera analoga. I risultati finali sono stati espressi come nmol MDA/ mg di proteine. Il contenuto proteico è stato analizzato secondo Lowry *et al.* (1951).

## 6.5. Analisi Statistica

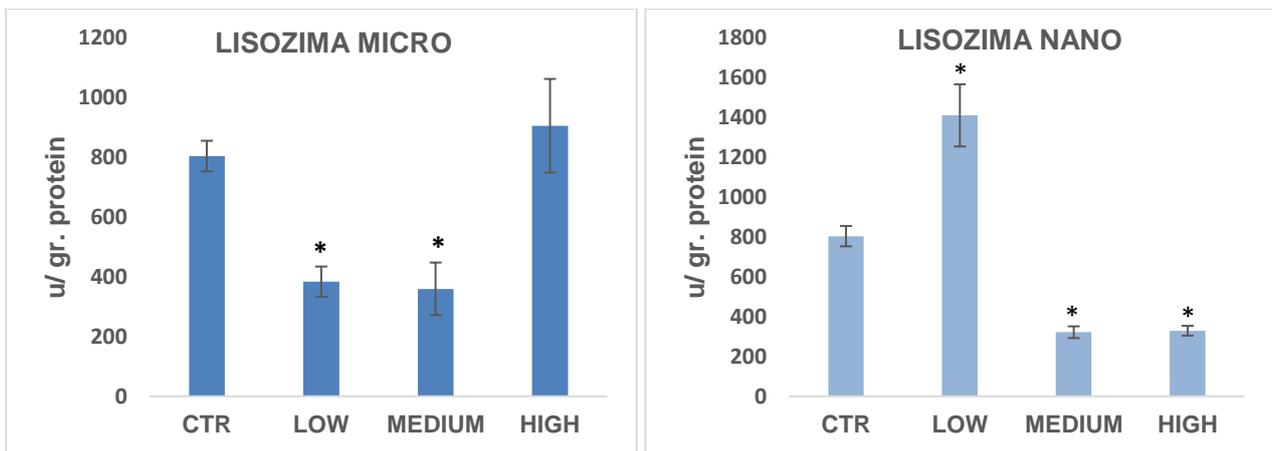
L'analisi statistica dei dati è stata effettuata attraverso il software SigmaPlot 13.0. mediante analisi della varianza ad una via (ANOVA), con confronto a coppie a posteriori con il metodo Bonferroni. La normalità nella distribuzione del campione è stata testata con il metodo di Shapiro-Wilk. La correlazione tra coppie di parametri è stata valutata attraverso il coefficiente di Pearson. Per tutte le analisi effettuate, le differenze sono state considerate statisticamente significative per valori di  $p < 0,05$ .

## 7. RISULTATI

### 7.1. Risposte immunologiche

#### 7.1.1. Determinazione dell'attività del lisozima nel siero

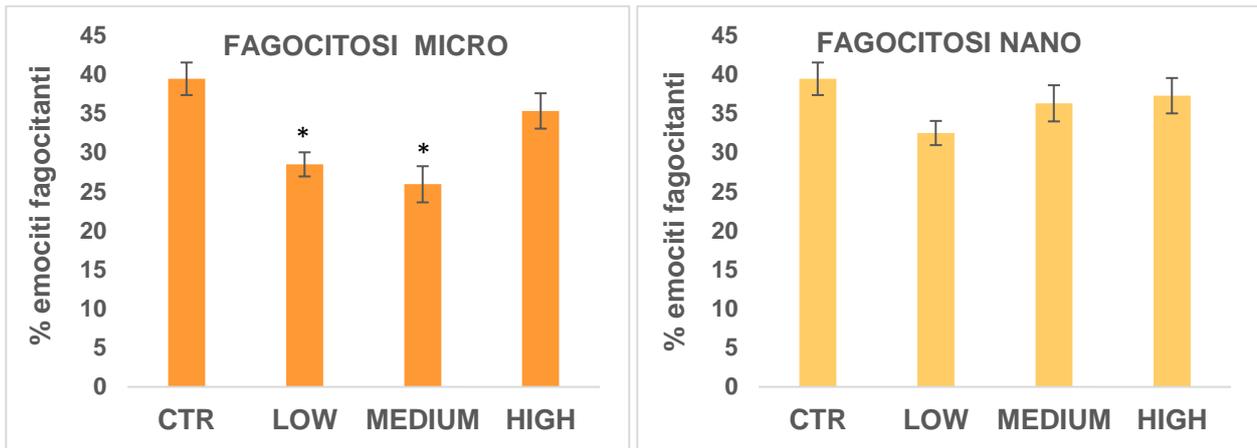
I valori dell'attività enzimatica del lisozima riscontrati nel siero di emolinfa dei mitili esposti ai trattamenti sono riportati in figura 7.1. A seguito del trattamento con le microplastiche si è registrata una diminuzione significativa dell'attività del lisozima a seguito dei trattamenti LOW e MEDIUM. Nei mitili esposti alle nanoplastiche, si osservano differenze statisticamente significative tra tutti i trattamenti effettuati ed il controllo. In particolare si osserva un aumento dell'attività enzimatica nei mitili esposti al trattamento LOW seguito da una riduzione a seguito dei trattamenti MEDIUM e HIGH.



**Figura 7.1** - Attività del lisozima misurata nell'emolinfa dei mitili esposti a concentrazioni crescenti di microplastiche e nanoplastiche. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES ( $n=3$ ) dell'attività specifica. \*,  $p < 0,05$  rispetto al controllo (ANOVA ad una via, test di Bonferroni)

### 7.1.2. Determinazione dell'attività fagocitaria in campioni di emolinfa

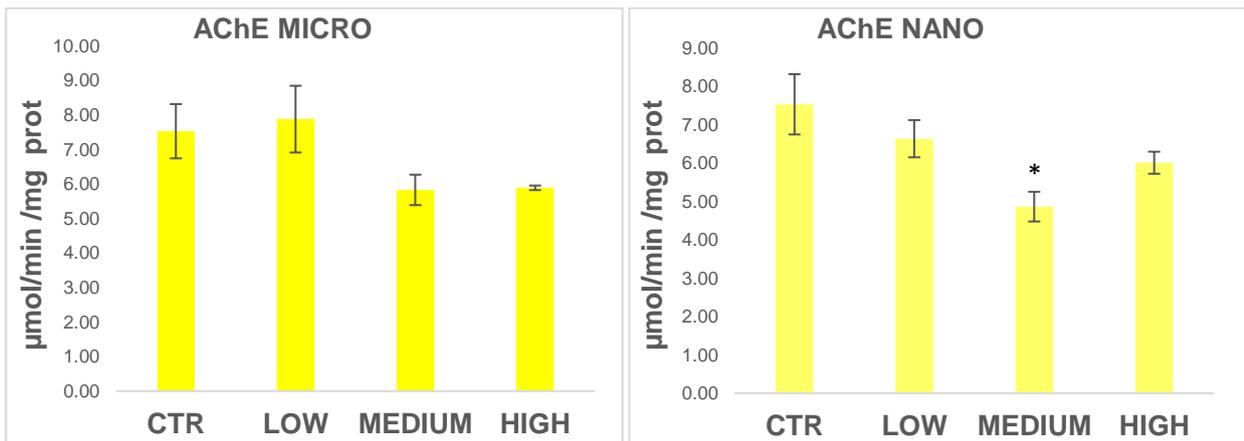
I valori dell'attività fagocitaria riscontrati nel siero di emolinfa sono riportati in figura 7.2. Nei mitili esposti alle microplastiche si osserva una riduzione significativa dell'attività fagocitaria a seguito dei trattamenti MEDIUM e LOW. Nessuna variazione significativa è stata invece osservata nei mitili esposti alle nanoplastiche rispetto ai controlli.



**Figura 7.2** – Attività fagocitaria misurata negli emociti di mitilo a seguito dell'esposizione a concentrazioni crescenti di microplastiche e nanoplastiche. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES ( $n = 3$ ) delle percentuali di emociti fagocitanti. \*,  $P < 0,05$  rispetto al controllo (ANOVA ad una via, test di Bonferroni)

## 7.2. Determinazione dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi

I valori dell'attività enzimatica dell'acetilcolinesterasi sono mostrati in figura 7.3. L'ANOVA, seguita da test di Bonferroni, non ha riscontrato significatività tra i valori relativi alle tre diverse concentrazioni di microplastiche e il controllo. Al contrario, i mitili esposti alle nanoplastiche mostrano una riduzione statisticamente significativa dell'attività dell'enzima a seguito del trattamento medium.

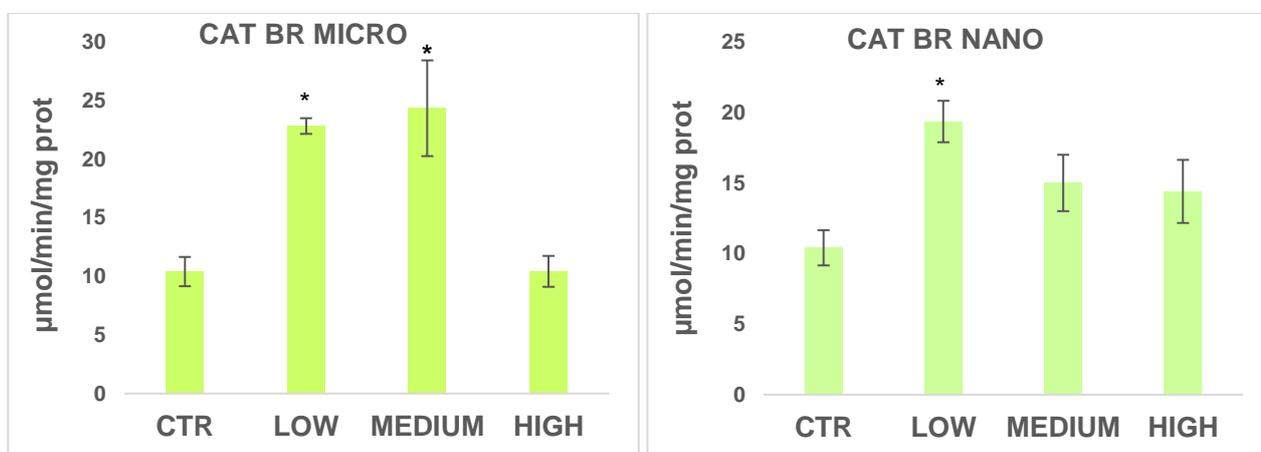


**Figura 7.3** - Attività dell'enzima acetilcolinesterasi misurata nelle branchie dei mitili esposti a concentrazioni crescenti di microplastiche e nanoplastiche. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES ( $n=3$ ) dell'attività specifica per ogni singolo trattamento. \*,  $p < 0,05$  rispetto al controllo (ANOVA ad una via, test di Bonferroni)

### 7.3. Determinazione dell'attività della catalasi

#### 7.3.1 Attività della catalasi nelle branchie

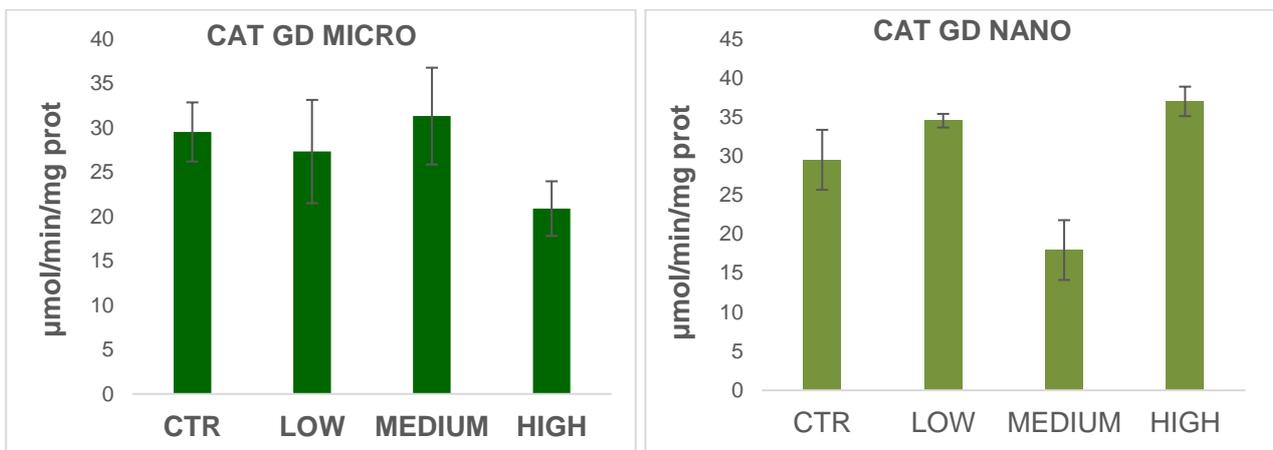
I valori dell'attività enzimatica della catalasi riscontrati nelle branchie sono espressi riportati in figura 7.4. Nel complesso sia nei mitili esposti alle microplastiche che in quelli esposti alle nanoplastiche l'attività della catalasi mostra un profilo a campana a seguito dei trattamenti effettuati. In particolare, i mitili esposti alle microplastiche mostrano un aumento significativo dell'attività enzimatica a seguito dei trattamenti LOW e MEDIUM. L'esposizione a nanoplastiche è invece risultata in un aumento significativo dell'attività solo a seguito del trattamento LOW.



**Figura. 7.4** - Attività dell'enzima catalasi misurata nelle branchie di mitilo a seguito dell'esposizione a concentrazioni crescenti di microplastiche e nanoplastiche. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES ( $n=3$ ) dell'attività specifica per ogni singolo trattamento. \*  $p < 0,05$  rispetto al controllo (ANOVA ad una via, test di Bonferroni)

### 7.3.2 Attività della catalasi nella ghiandola digestiva

I dati relativi all'attività della catalasi nella ghiandola digestiva dei mitili esposti a microplastiche e nanoplastiche sono mostrati in figura 7.5. Rispetto agli animali di controllo non si osservano variazioni statisticamente significative in nessuno dei trattamenti effettuati. Un lieve incremento dell'attività enzimatica si osserva nei mitili esposti al trattamento MEDIUM. Al contrario una lieve diminuzione rispetto al controllo si osserva nei mitili esposti al trattamento MEDIUM di nanoplastiche.

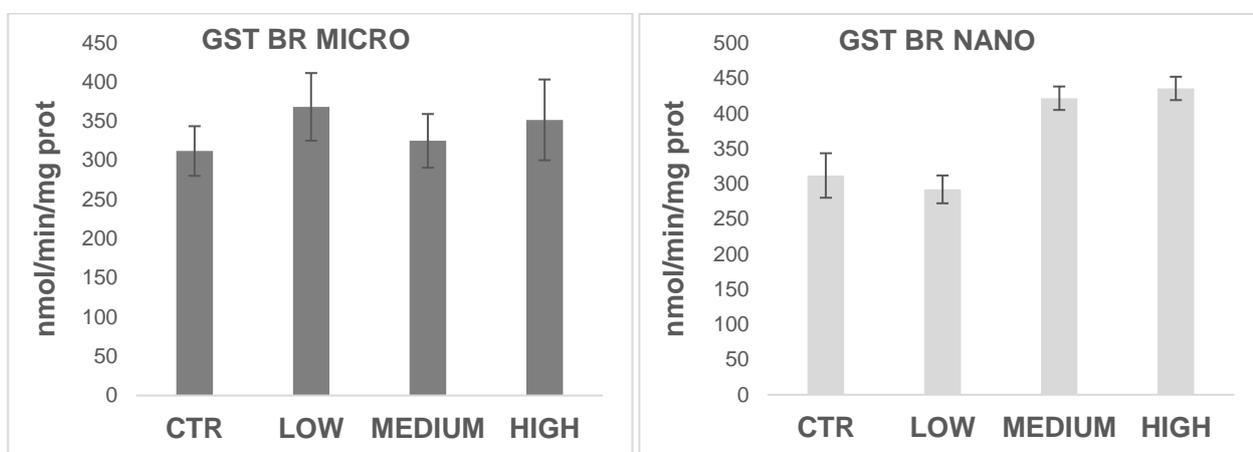


**Figura 7.5** - Attività dell'enzima catalasi misurata nella ghiandola digestiva dei mitili esposti a concentrazioni crescenti di microplastiche e nanoplastiche. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES (n=3) delle attività specifiche. L'ANOVA non ha mostrato effetti significativi dei trattamenti effettuati rispetto al controllo.

## 7.4. Determinazione dell'attività dell'enzima glutatione S-transferasi

### 7.4.1. Attività della glutatione S-transferasi nelle branchie

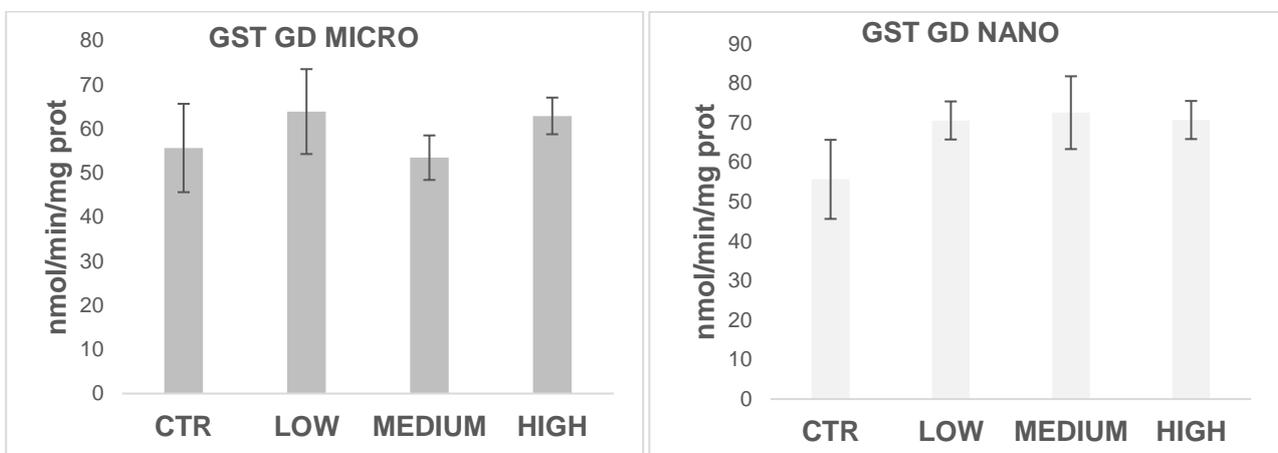
L'attività specifica dell'enzima glutatione S-transferasi non è risultata significativamente diversa tra i mitili di controllo e quelli esposti a microplastiche o nanoplastiche (FIG. 7.6). Nel primo caso si nota un lieve incremento dell'attività enzimatica nei mitili esposti alle tre concentrazioni testate rispetto al controllo; nei mitili esposti alle nanoplastiche si osserva invece un lieve ma non significativo aumento a seguito dei trattamenti MEDIUM e HIGH.



**Figura 7.6** - Attività dell'enzima glutatione S-transferasi misurata nelle branchie di mitilo a seguito dell'esposizione a concentrazioni crescenti di microplastiche e nanoplastiche. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES (n=3) dell'attività specifica. L'ANOVA non ha mostrato effetti significativi dei trattamenti effettuati su questo parametro.

#### 7.4.2. Attività enzimatica della glutazione S-transferasi nella ghiandola digestiva

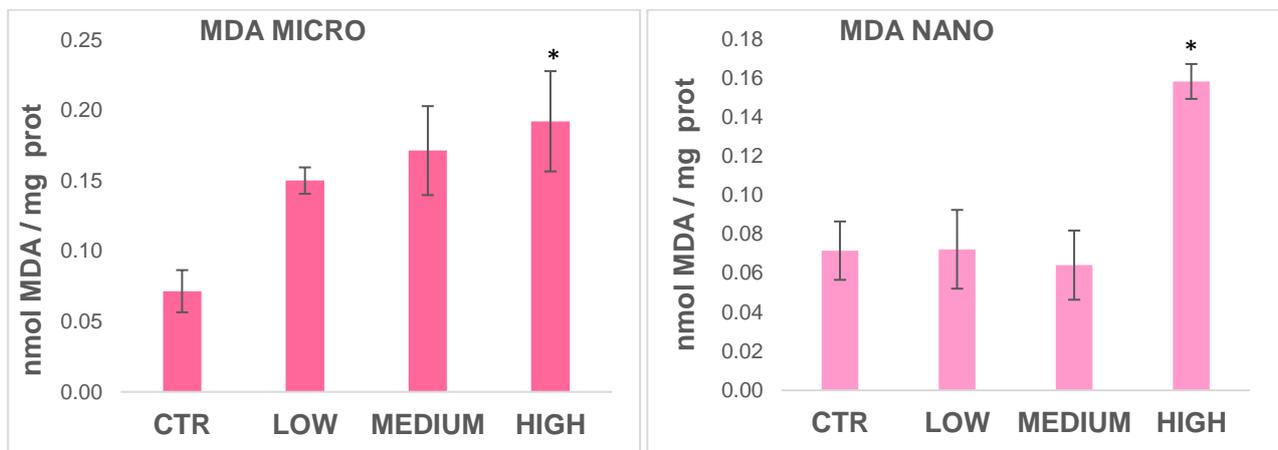
I risultati dell'analisi dell'attività dell'enzima glutazione S-transferasi misurata nella ghiandola digestiva dei mitili esposti a microplastiche e nanoplastiche sono mostrati in figura 7.7. In nessun caso, si osservano variazioni statisticamente significative tra i mitili esposti ai trattamenti e quelli di controllo. Nei mitili esposti alle microplastiche si osserva un lieve incremento dell'attività enzimatica nei trattamenti LOW e HIGH. Un incremento lieve e non significativo è anche osservato nei mitili esposti a tutti i trattamenti con nanoplastiche.



**Figura 7.7** - Attività dell'enzima glutazione S-transferasi misurata nelle branchie di mitilo a seguito dell'esposizione a concentrazioni crescenti di microplastiche e nanoplastiche. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES (n=3) dell'attività specifica. L'ANOVA non ha mostrato effetti significativi dei trattamenti effettuati su questo parametro.

### 7.5. Determinazione della malondialdeide in ghiandole digestive

I risultati relativi al contenuto di malondialdeide nella ghiandola digestiva dei mitili sono riportati in figura 7.8. Per entrambe le tipologie di particelle analizzate, il contenuto di malondialdeide risulta significativamente superiore rispetto al controllo a seguito del trattamento HIGH. Si nota un progressivo aumento della malondialdeide nei mitili esposti a microplastiche LOW e MEDIUM, per quanto non statisticamente significativo.



**Figura 7.8** - Contenuto di malondialdeide misurato nella ghiandola digestiva dei mitili esposti a concentrazioni crescenti di microplastiche e nanoplastiche. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES (n=3) del contenuto misurato per ogni singolo trattamento. \*,  $p < 0,05$  rispetto al controllo (ANOVA ad una via, test di Bonferroni)

## 7.6. Correlazione tra i diversi Biomarker

I risultati relativi all'analisi del coefficiente di correlazione di Pearson tra i dati di Biomarker analizzati a seguito dell'esposizione dei mitili a concentrazioni crescenti di microplastiche e nanoplastiche sono riportati nelle tabelle 7.1 e 7.2, rispettivamente. Nei mitili esposti alle microplastiche si osserva una correlazione negativa e significativa tra i parametri immunologici lisozima e fagocitosi e l'attività dell'enzima catalasi nelle branchie. Anche nei mitili esposti alle nanoplastiche si osserva un'anticorrelazione significativa tra la catalasi misurata nelle branchie e la fagocitosi. In più le concentrazioni di nanoplastiche utilizzate risultano correlate positivamente con il contenuto di malondialdeide.

**Tabella 7.1** – Coefficiente di correlazione di Pearson tra i parametri misurati nei mitili esposti a tre diverse concentrazioni di microplastiche. Le concentrazioni testate sono incluse nell'analisi. Tra parentesi sono riportati i p-value di ogni singolo coefficiente. I valori significativi ( $p < 0,05$ ) sono riportati con asterisco.

MPs	fago	GST gd	GST br	CAT gd	CAT br	MDA	AChE	[MPs]
lisoz	0,903 (0,097)	0,178 (0,822)	-0,213 (0,787)	-0,641 (0,359)	* -0,988 (0,012)	-0,181 (0,819)	-0,141 (0,859)	0,646 (0,354)
fago		0,046 (0,954)	-0,373 (0,627)	-0,344 (0,656)	* -0,959 (0,041)	-0,581 (0,419)	0,226 (0,744)	0,262 (0,738)
GST gd			0,909 (0,090)	-0,770 (0,230)	-0,132 (0,868)	0,376 (0,624)	0,278 (0,722)	0,454 (0,546)
GST br				-0,567 (0,433)	0,278 (0,722)	0,586 (0,414)	0,171 (0,829)	0,306 (0,694)
CAT gd					0,548 (0,452)	-0,500 (0,500)	0,244 (0,756)	-0,853 (0,126)
CAT br						0,329 (0,671)	0,014 (0,986)	-0,522 (0,478)
MDA							-0,686 (0,314)	0,633 (0,367)
AChE								-0,626 (0,374)

[MPs/NPs] = concentrazioni micro/nanoplastiche; **Lisoz** = lisozima; **Fago** = fagocitosi; **GST** = glutazione S-transferasi; **CAT** = catalasi; **AChE** = acetilcolinesterasi; **MDA** = malondialdeide; **gd** = ghiandola digestiva; **br** = branchie.

**Tabella 7.2** – Coefficiente di correlazione di Pearson tra i parametri di misurati nei mitili esposti a tre diverse concentrazioni di nanoplastiche. Le concentrazioni testate sono incluse nell'analisi. Tra parentesi sono riportati i p-value di ogni singolo coefficiente. I valori significativi ( $p < 0,05$ ) sono riportati con asterisco.

NPs	fago	GST gd	GST br	CAT gd	CAT br	MDA	AChE	[NPs]
lisoz	-0,612 (0,388)	-0,175 (0,825)	-0,921 (0,079)	0,394 (0,606)	0,504 (0,496)	-0,438 (0,562)	0,589 (0,411)	-0,562 (0,438)
fago		-0,699 (0,331)	0,279 (0,721)	-0,161 (0,839)	* -0,988 (0,011)	0,195 (0,805)	0,239 (0,761)	0,202 (0,798)
GST gd			0,527 (0,473)	-0,095 (0,905)	0,762 (0,238)	0,239 (0,761)	-0,823 (0,177)	0,339 (0,661)
GST br				-0,263 (0,737)	-0,142 (0,858)	0,586 (0,431)	-0,773 (0,227)	0,702 (0,298)
CAT gd					0,189 (0,811)	0,635 (0,365)	0,568 (0,432)	0,498 (0,502)
CAT br						-0,065 (0,934)	-0,330 (0,670)	-0,061 (0,939)
MDA							-0,074 (0,926)	* 0,985 (0,015)
AChE								-0,238 (0,762)

[MPs/NPs] = concentrazioni micro/nanoplastiche; **Lisoz** = liozima; **Fago** = fagocitosi; **GST** = glutazione S-transferasi; **CAT** = catalasi; **AChE** = acetilcolinesterasi; **MDA** = malondialdeide; **gd** = ghiandola digestiva; **br** = branchie.

## **8. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Negli ultimi decenni la plastica è stata prodotta ed utilizzata dall'uomo con sempre maggior frequenza, tanto che questo materiale è diventato il maggior detrito antropogenico inquinante presente negli oceani (Law *et al.*, 2010). Recenti valutazioni dimostrano che le microplastiche si sono accumulate negli oceani e nei sedimenti, con concentrazioni che raggiungono anche le 100.000 particelle m<sup>3</sup>. Il destino finale di queste plastiche e quale effetto potrebbero avere sull'ambiente marino sono diventati argomento di intenso studio. A causa delle loro piccole dimensioni, le microplastiche possono essere ingerite dalla fauna ai livelli trofici più bassi, con conseguenze incerte sulla salute dell'organismo e sulla capacità di trasferirsi lungo la catena trofica. Il potenziale di accumulo delle microplastiche nei tessuti è poco studiato, anche per le difficoltà incontrate nell'effettuare le misure.

L'assunzione di nanoplastiche in organismi filtratori viene favorita dalla dimensione nanometrica rispetto a quella micrometrica (Ward & Kach, 2009), poiché hanno un volume più piccolo e una superficie relativamente ampia, quindi il potenziale di penetrare nei corpi e nei tessuti degli organismi è più alto. Tuttavia rimane ancora sconosciuto quali siano i possibili effetti indotti a livello cellulare. Negli organismi acquatici le modalità di assunzione di nanoparticelle includono l'ingestione diretta o l'ingresso attraverso le branchie. Inoltre, i processi di internalizzazione cellulare su scala nanometrica ( $\leq 100$  nm) e micrometrica (100 -100,000 nm) delle particelle, quali endocitosi e fagocitosi, sono altamente sviluppati (Moore, 2006), e sono parte integrante di funzioni fisiologiche chiave come la digestione intracellulare e l'immunità cellulare.

Sono disponibili pochi dati sugli effetti in vivo che le nanoplastiche possono indurre sui biomarker nei bivalvi. Lo scopo di questa tesi è stato quindi la valutazione di parametri di stress ossidativo, applicando una batteria composta da 6 biomarker e proponendo il mitilo mediterraneo come organismo modello sulla base delle conoscenze circa le dinamiche fisiologiche che regolano le principali funzioni biologiche in questa specie (Fabbri & Capuzzo, 2010).

Più nel dettaglio è stato analizzato se e in che misura l'esposizione prolungata a micro- e nanoplastiche (0,3  $\mu$ m e 0,05  $\mu$ m) in differenti dosaggi, paragonabili al

range di valori misurato in ambiente, producesse alterazioni a carico del sistema antiossidante in diversi tessuti biologici, ghiandola digestiva, emibranchie ed emolinfa.

Precisamente abbiamo voluto:

- Misurare la capacità di risposta da parte del sistema immunitario dei mitili, analizzando gli emociti.
- Valutare possibili effetti subletali delle plastiche in tessuti di ghiandola digestiva e branchie utilizzando una batteria di 6 biomarker, selezionati come indicatori di stress ossidativo.
- Valutare l'effettiva insorgenza di stress ossidativo, e se fosse direttamente correlata con le dimensioni delle microparticelle di polistirene.
- Misurare un possibile effetto dose-risposta alle micro- e nanoplastiche, testando 3 trattamenti (LOW, MEDIUM, HIGH) differenti per concentrazione ma uguali in termini di peso.

La durata della sperimentazione in ambiente controllato e la scelta di condurlo in vivo e non in vitro, come la maggior parte degli studi riportati in letteratura, ha permesso di simulare una condizione più in linea con quella naturale.

La peculiarità di questo lavoro è l'affiancamento al set di biomarker enzimatici e neurotossici scelti come indicatori di stress ossidativo di biomarker immunologici.

Nel sistema immunitario dei bivalvi il **lisozima** svolge un importante ruolo batteriolitico nei confronti di un ampio range di patogeni; una ridotta attività di questo enzima suggerisce una immunosoppressione rendendo questa specie più vulnerabile agli attacchi da parte di organismi patogeni. Dai risultati ottenuti nel presente studio si evince che l'attività enzimatica del lisozima risulta inferiore rispetto al controllo a concentrazione di microplastiche MEDIUM e LOW. Andamento opposto si registra nel caso delle nanoplastiche dove i risultati mostrano un'attività più alta del lisozima alle concentrazioni LOW, ma una marcata diminuzione con l'aumentare del dosaggio. L'analisi statistica dei dati, mostra che le variazioni sono significative a tutte e tre le concentrazioni di nanoplastiche. In generale si può dire che entrambe le condizioni sperimentali (micro e nanoplastiche) sono in grado di alterare lo stato di immunosorveglianza.

Nei bivalvi gli emociti sono responsabili dell'immunità cellulo-mediata e rappresentano la prima linea di difesa contro il materiale not-self (Canesi *et al.*, 2012; Canesi & Prochazková, 2013) attraverso la fagocitosi. Nei mitili l'attività fagocitaria è uno dei parametri più importanti ai fini della funzionalità immunitaria, poiché i fagociti attivi rappresentano il principale tipo di cellula circolante (Canesi *et al.*, 1998; Ottaviani *et al.*, 1998; Wotton *et al.*, 2003b) e dal momento che gli invertebrati non sono in grado di produrre anticorpi, la fagocitosi rappresenta il principale indicatore dell'immunocompetenza. Premesso che l'alterazione degli emociti di *M. galloprovincialis*, trattati in vitro, a seguito di esposizione con nanoparticelle è già stata accertata da alcuni studi pubblicati precedentemente (Canesi *et al.*, 2008), in questo studio si osserva un decremento dell'**attività fagocitaria**, espressa come % di emociti fagocitanti, dopo trattamento con le microplastiche, con differenze significative rispetto al controllo solo alle concentrazioni LOW e MEDIUM. Diversi dati di letteratura sono in linea con quanto osservato, aggiungendo che le concentrazioni dei contaminanti giocano un ruolo importante nella modulazione della fagocitosi (Wootton *et al.*, 2003a; Coray *et al.*, 2007). Tuttavia, non si evincono effetti significativi dopo trattamento con nanoplastiche.

Ulteriori analisi hanno riguardato la valutazione delle attività enzimatiche nelle ghiandole digestive e/o nelle emibranchie, relativamente agli enzimi acetilcolinesterasi (AChE), catalasi (CAT) e glutatione S-transferasi (GST).

**L'AChE** è l'enzima che catalizza l'idrolisi del neurotrasmettitore acetilcolina in colina e acetato. Il saggio è stato svolto nelle branchie; in questo caso nei mitili esposti sono state osservate attività minori rispetto al controllo tranne che per la concentrazione minore di microplastiche, la cui differenza non risulta però significativa. L'unica differenza significativa si manifestava in corrispondenza della concentrazione media di nanoplastiche.

Le misure dell'attività di CAT e GST sono particolarmente utili quando si sospetta che la sostanza tossica causi stress ossidativo (Canesi *et al.*, 2007; Jemec *et al.*, 2008). La **catalasi** è un enzima coinvolto nei processi antiossidanti. Stimando l'attività enzimatica nelle emibranchie, che come noto nei mitili presentano valori

inferiori rispetto a quelli relativi alle ghiandole, i nostri risultati mostrano che l'attività della catalasi segue un profilo a campana dopo esposizione a microplastiche con differenze significative a concentrazioni LOW e MEDIUM dove si registra un picco di attività. Questo andamento è stato correlato ad un maggiore tasso catabolico e/o della diretta inibizione dell'attività delle molecole enzimatiche da parte dei componenti tossici (Viarengo *et al.*, 2007). Infatti questi risultati sono tipici delle risposte che vengono stimulate alle basse concentrazioni di una sostanza tossica e poi inibiti all'aumentare della sostanza stessa (Viarengo *et al.*, 2007). Anche in relazione alle nanoplastiche, il grafico sull'attività della catalasi nelle emibranchie mostra un profilo a campana con un incremento iniziale dovuto all'aumento della attività enzimatica seguita da una diminuzione, anche se le differenze sono meno marcate. L'attività della CAT nella ghiandola digestiva non era modificata in maniera significativa dai trattamenti.

Dall'analisi statistica emerge una correlazione negativa tra la fagocitosi e l'attività enzimatica della catalasi nelle branchie, infatti sia nel caso delle microplastiche che nel caso delle nanoplastiche all'aumentare dell'attività della catalasi diminuisce la % di emociti fagocitanti. Nel caso delle microplastiche questa correlazione negativa emerge anche con il lisozima: ovvero si osserva attività maggiore dell'enzima catalasi in relazione ad attività minori di lisozima e viceversa.

Per quanto riguarda l'attività dell'enzima **glutathione S-transferasi** (GST), che catalizza le reazioni di coniugazione di xenobiotici con il glutathione ridotto (GSH), nelle ghiandole dei mitili esposti non si riscontrano effetti significativi dopo esposizione dei mitili a micro- o a nanoplastiche.

Per meglio valutare lo stress ossidativo dei mitili esposti a micro e nanoplastiche è stato utilizzato un altro biomarker, rappresentato dall'accumulo di **malondialdeide** (MDA) nelle ghiandole digestive. La MDA è un composto che si forma come prodotto intermedio nei processi di perossidazione lipidica. Un aumento dei suoi livelli negli organismi è correlato ad un calo della qualità dell'ambiente dove vivono, responsabile dell'aumento dello stress ossidativo (Box *et al.*, 2007). Recenti studi hanno mostrato una correlazione tra aumento dei livelli di MDA e ridotta attività degli enzimi antiossidanti (Soltani *et al.*, 2012) in vongole esposte a inquinamento

ambientale. Nei nostri risultati si nota come il trattamento con microplastiche portava ad un incremento progressivo della produzione di MDA nei tessuti di mitilo, significativo alla concentrazione più elevata; anche nel caso di trattamento con nanoplastiche, l'accumulo è risultato significativo soltanto dopo esposizione alla dose più alta (HIGH).

In conclusione, considerati nell'insieme, i dati discussi dimostrano che, pur non registrando tassi di mortalità, l'esposizione a microplastiche e nanoplastiche:

- Produce alterazioni di alcune risposte fisiologiche negli animali; tali alterazioni si sono verificate anche alle concentrazioni più basse, rilevanti dal punto di vista ambientale,
- Ha indotto stress ossidativo
- Ha alterato funzioni immunitarie

Possiamo dire quindi che, pur non subendo effetti letali o di grave tossicità, i mitili sono vulnerabili alla esposizione a micro- e nanoplastiche; questo può determinare una inferiore capacità di sopravvivenza a successive esposizioni a stress ambientali, compromettendo la fitness o la sopravvivenza della specie stessa.

Rimangono ancora numerosi punti sui quali far luce per cui sono necessari maggiori indagini sui possibili fattori che influenzano la tossicità delle materie plastiche. I pochi dati di letteratura indicano che le nanoplastiche provocano effetti più tossici sugli organismi rispetto alle microplastiche, riconducibili alla superficie proporzionalmente più ampia (Jeong *et al.*, 2016; Sjollema *et al.*, 2016). Le particelle in ambiente acquatico, e soprattutto in quello marino, in cui la forza ionica è tale da indurre l'aggregazione, raramente esistono come entità singole, ma tendono ad aggregarsi sulla sostanza organica (Delay & Frimmel, 2011), migliorando l'efficienza di cattura da parte dei bivalvi. Studi recenti, hanno infatti dimostrato che i bivalvi rappresentano un significativo target per diverse forme di nanoparticelle in ambiente acquatico (Ward *et al.*, 2009; Canesi *et al.*, 2010). La tendenza ad aggregarsi in ambienti di transizione e salati, favorita dall'aumentata forza ionica (Brant *et al.*, 2005, Domingos *et al.*, 2009, Jiang *et al.*, 2009) rendono necessari ulteriori studi. I risultati ottenuti da questo lavoro sono comunque

importanti per suggerire future strategie di ricerca e sottolineare la necessità di accurata gestione dei rifiuti marini.

## 9. BIBLIOGRAFIA

---

- **Acampora** H., Schuyler Q. A., Townsend K. A., Hardesty B. D. (2014). Comparing plastic ingestion in juvenile and adult stranded short-tailed shearwaters (*Puffinus tenuirostris*) in eastern Australia. *Mar. Pollut. Bull.* 78(1-2): 63-68.
- **Akcha** F., Izuel C., Venier P., Budzinski H., Burgeot T., Narbonne J.F. (2000) Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 49:269–287.
- **Anderson** R.S. (2001). Reactive Oxygen Species and antimicrobial defenses of invertebrates: a bivalve model. In: Beck et al. Eds., *Phylogenetic perspectives on the Vertebrate Immune System*, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 131-139.
- **Anderson** P.J., Warrack S., Langen V., (2017). Microplastic contamination in Lake Winnipeg, Canada. *Environ. Pollut.* 225:223–231.
- **Andrady** A.L., Neal M.A. (2009). Applications and societal benefits of plastics. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 364:1977–1984.
- **Andrady** A.L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62:1596–1605.
- **Ashton** K., Holmes L., Turner A., (2010). Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 60 (11): 2050–2055.
- **Auffret** M., Rousseau S., Boutet I., Tanguy A., Baron J., Moraga D., Duchemin M. (2006). A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotox. Environ. Safe.* 63:393–405.
- **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. *Mar. Pollut. Bull.* 198:211–222.

- **Bachère E.**, Mialhe E., Noël D., Boulo V., Morvan A., Rodriguez J. (1995). Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* 132: 17-32.
- **Banni M.**, Dondero F., Jebali J., Guerbej H., Boussetta H., Viarengo A., (2007). Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression: a validation along the Tunisian coast. *Biomarkers* 12:369–383.
- **Bargagli B.**, Cruscanti M., Leonzio C. e Bacci E., (1998). I bioindicatori. In: Vighi M., Bacci E. *Ecotossicologia*. UTET, Torino, Italia, pp. 237.
- **Bayne B.L.** (1976). *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press.
- **Bergmann M.M.**, Thompson R.C. (2015). “ Microplastics in the Marine Environment: Sources, Consequences and Solutions”, *Marine Anthropogenic Litter*.
- **Barnes D.K.A.**, Galgani F., Thompson R.C., Barlaz M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 364: 1985–1998.
- **Besseling E.**, Wegner A., Foekema E.M. (2013). Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Environ. Sci. Technol.* 47 (1):593–600.
- **Box A.**, Sureda A., Galgani F., Pon A., Deudero S.(2007). Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 146: 531–539.
- **Brant J.**, Lecoantet H., Wiesner M.R. (2005). Aggregation and deposition characteristics of fullerene nanoparticles in aqueous systems. *J. Nanopart. Res.* 7: 545-553.
- **Brown R.J.**, Galloway T.S., Lowe D., Browne M.A, Dissanayake A., Jones M.B., Depledge M.H. (2004). Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 66:267–278.

- **Browne** M.A., Galloway T., Thompson R. (2007). Microplastic an emerging contaminant of potential concern? *Integr. Environ. Assess. Manag.* 3: 559–561.
- **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.). *Environ. Sci. Technol.* 42: 5026–5031.
- **Browne** M.A., Niven S.J., Galloway T.S., Rowland S.J., Thompson R.C. (2013). Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Curr. Biol.* 23: 2388–2392.
- **Canesi** L., Ciacci C., Piccoli G. (1998). In vitro and in vivo effects of heavy metals on mussel digestive gland hexokinase activity: the role of glutathione. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 120:261–268.
- **Canesi** L., Viarengo A., Leonzio C., Filippelli M., Gallo G. (1999). Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 46: 67-76.
- **Canesi** L., Gallo G., Gavioli M., Pruzzo C. (2002). Bacteria hemocyte interaction and phagocytosis in marine bivalve. *Microsc. Res. Tech.* 57 (6): 469-476.
- **Canesi** L., Lorusso L.C., Ciacci C., Betti M., Gallo G. (2005). Effects of the brominated flame retardant Tetrabromobisphenol-A (TBBPA) on cell signaling and function of *Mytilus* hemocytes: involvement of MAP kinases and protein kinase C. *Aquat. Toxicol.* 75:277–287.
- **Canesi** L., Borghi C., Ciacci C., Fabbri R., Vergani L., Gallo G. (2007). Bisphenol-A alters gene expression and functional parameters in molluscan hepatopancreas. *Mol. Cell. Endocrinol.* 276: 36-44.
- **Canesi** L., Ciacci C., Betti M., Fabbri R., Canonico B., Fantinati A., Marcomini A., Pojana G. (2008). Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. *Environ. Int.* 34:1114–1119.
- **Canesi** L., Fabbri R., Gallo G., Vallotto D., Marcomini A., Pojana G. (2010). Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected

- nano- particles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO<sub>2</sub>, Nano-SiO<sub>2</sub>). *Aquat. Toxicol.* 100:168-177.
- **Canesi L.**, Ciacci C., Fabbri R., Marcomini A., Pojana G., Gall, G. (2012). Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar. Environ. Res.* 76:16-21.
  - **Canesi L.**, Procházová P. (2013). The invertebrate immune system as a model for investigating the environmental impact of nanoparticles. In: Boraschi D., Duschl A. (Eds.). *Nanoparticles and the Immune System*. Acad. Press, Oxford, pp. 91–112.
  - **Canesi L.**, Ciacci C., Bergami E., Monopoli M.P., Dawson K.A., Papa S., Canonico B., Corsi I. (2015). Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Mar. Environ. Res.* 111:34–40.
  - **Canesi L.**, Ciacci C., Fabbri R., Balbi T., Salis A., Damonte G., Cortese K., Caratto V., Monopoli M.P., Dawson K., Bergami E., Corsi I. (2016). Interactions of cationic poly- styrene nanoparticles with marine bivalve hemocytes in a physiological environment: role of soluble hemolymph proteins. *Mar. Environ. Res.* 150: 73–81.
  - **Carr S.A.**, Liu J., Tesoro A.G., (2016). Transport and fate of microplastic particles in waste- water treatment plants. *Water Res.* 91:174–182.
  - **Carballal J.M.**, Lopez C., Azevedo C., Villalba A. (1997). In vitro phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 7:403-416.
  - **Casado M.P.**, Macken A., Byrne H.J. (2013). Ecotoxicological assessment of silica and polystyrene nanoparticles assessed by a multitrophic test battery. *Environ. Int.* 51: 97–105.
  - **Cheung C.C.C.**, Siu W.H.L., Richardson B.J, De Luca-Abbott S.B, Lam P.K.S. (2004). Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green lipped mussel, *Perna viridis*. *Environ. Pollut.* 128:393–403.

- **Chu F.L.E., La Peyre J.F.(1989).** Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Invert. Pathol.* 54:224–232.
- **Claessens M., DeMeester S., Van Landuyt L. (2011).** Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. *Mar. Pollut. Bull.* 62 (10): 2199–2204.
- **Cole M., Lindeque P., Halsband C., Galloway T.S.(2011).** Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 62: 2588–2597.
- **Cole M., Lindeque P., Fileman E., Halsband C., Goodhead R.M., Morger J., Galloway T. (2013).** Microplastic ingestion by zooplankton. *Environ. Sci. Technol.* 47: 6646–6655.
- **Coray C., St.-Jean S.D., Bard S.M. (2007)** Immunomodulation in Blue Mussels (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*) exposed to municipal effluent in Eastern Canada. *Water. Qual. Res. J. Cana.* 42 (3):194–201.
- **Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C., Babut M., Exinger A., Vasseur P. (1997)** Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotox .Environ. Safe.* 38:122–131.
- **Costa J.P., Duarte A.C., Rocha-Santos T.A.P. (2017).**Chapter 1. Microplastics Occurrence, Fate and Behaviour in the Environment. A.P.R.-S. Teresa, C.D. Armando (Eds.), *Comprehensive analytical chemistry*, Elsevier pp. 1–24.
- **Cozar A., Echevarria F., Gonzalez-Gordillo J.I. (2014).** Plastic debris in the open ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (28):10239–10244.
- **Crane M., Handy R.D., Garrod J., Owen R.(2008).** Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology* 17:421–437.

- **Cheng** T.C, Rodrick G.E. (1974). Identification and characterization of lysozyme from the hemolymph of the soft shelled clam, *Mya arenaria*. Biol. Bull. 147:311–320.
- **Delay** M., Frimmel F.H. (2011). Nanoparticles in aquatic systems. Anal. Bioanal. Chem. 402(2):583-92.
- **Dellali** M., Barelli M.G., Romeo M., Aissa P. (2001). The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. Comp. Biochem. Physiol. C. 130:227–235.
- **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. Mar. Pollut. Bull. 85:146–155.
- **Derraik** J.G.B. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Mar. Pollut. Bull.44:842–852.
- **Desforges** J.P.W., Galbraith M., Ross P.S. (2015). Ingestion of microplastics by zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69 (3): 320–330.
- **Di Giulio** R.T., Washburn P.C., Wenning R.J., Winston G.W., Jewell C.S., (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. Environ. Toxicol. Chem. 8:1103-1123.
- **Domingos** R. F., Tufenkji N., Wilkinson K. J. (2009). Aggregation of Titanium Dioxide Nanoparticles: Role of a Fulvic Acid. Environ. Sci. Tech. 43: 1282-1286.
- **Dubaish** F., Liebezeit G. (2013). Suspended microplastics and black carbon particles in the Jade System, Southern North Sea. Water Air Soil Pollut. 224: 1-8.
- **Duis** K., Coors A. (2016). Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. Environ. Sci. Eur. 28: 1–25.

- **Dunlap R.E., Scarce R. (1991).** Poll trends: environmental problems and protection. Public Opin. Q. 55 (4):651–672.
- **Eerkes-Medrano D., Thompson R.C., Aldridge D.C. (2015).** Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. Water Res. 75:63–82.
- **EFSA. (2016).** Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. EFSA J.14(6): 4501.
- **Engler R.E. (2012).** The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. Environ. Sci. Tech. 46:12302-12315.
- **Eriksen M., Maximenko N., Thiel M., Cummins A., Lattin G., Wilson S. (2013).** Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre. Mar. Pollut. Bull. 68:71–76.
- **Eriksen M., Lebreton L.C.M., Carson H.S., Thiel M., Moore C. J., Borerro J. C., Galgani F., Ryan P. G., Reisser J. (2014).** Plastic pollution in the world's oceans: More than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. PLoS one 9 (12):111-913.
- **Eubeler J.P., Bernhard, M., Knepper, T.P. (2010).** Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups. TrAC Trends Anal. Chem. 29: 84–100.
- **Fabbri E., Capuzzo A. (2010).** Cyclic AMP signaling in bivalve molluscs: an overview. J. Exp. Zool. A. 313:179-200.
- **Farrell P., Nelson K. (2013).** Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). Environ. Pollut. 177: 1–3.
- **Faure F., Corbaz M., Baecher H. (2012).** Pollution due to plastics and microplastics in Lake Geneva and in the Mediterranean Sea. Arch. Sci. 65:157–164.
- **Fendall L.S., Sewell M.A. (2009).** Contributing to marine pollution by washing your face: microplastics in facial cleansers. Mar. Pollut. Bull. 58: 1225–1228.
- **Fischer D., Kaeppler A., Eichhorn K.-J. (2015).** Identification of microplastics in the marine environment by Raman Microspectroscopy and imaging. American Laboratory, CompareNetworks, South San Francisco, USA.

- **Foekma** E.M., Gruijter C., Mergia M.T., Van Franeker J.A., Murk T.J., Koelmans A.A. (2013). Plastic in North Sea fish. *Environ. Sci. Technol.* 47: 8818–8824.
- **Fournier** M., Pellerin J., Lebeuf M., Brousseau P., Morin Y., Cyr D. (2002) Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquat. Toxicol.* 59:83–92.
- **Fulekar** M.H. (2010). *Nanotechnology: Importance and Applications*. I.K. International Publishing House.
- **Fulton** M.H., Key P.B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as indicator of organophosphorus insecticides exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:37-45.
- **Gagné** F., Auclair J., Turcotte P., Fournier M., Gagnon C., Sauve S., Blaise C. (2008). Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. *Aquat. Toxicol.* 86: 333-340.
- **Gall** S.C., Thompson R.C. (2015). The impact of debris on marine life. *Mar. Pollut. Bull.* 92: 170–179.
- **Gauquie** J., Devriese L., Robbens J., De Witte B. (2015). A qualitative screening and quantitative measurement of organic contaminants on different types of marine plastic debris. *Chemosphere* 138:348–356.
- **Geret** F., Jouan A., Turpin V., Bebianno M.J., Cosson R.P. (2002a). Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Living Resour.* 15:61–66.
- **Geret** F., Serafin A., Barreira L., Bebianno M.J. (2002b). Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussates*. *Biomarkers* 7:42–256.
- **Geret** F., Serafim A., Bebianno M.J. (2003). Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*? *Ecotoxicology* 12:417–426.

- **Geyer H**, Sheehan P, Kotzias D, Freitag D, Korte F. (1982). Prediction of ecotoxicological behaviour of chemicals: Relationship between physico-chemical properties and bioaccumulation of organic chemicals in the mussel *Mytilus edulis*. *Chemosphere* 11 (11):1121-1134.
- **Goldstein M.C.**, Carson H.S., Eriksen M. (2014). Relationship of diversity and habitat area in North Pacific plastic-associated rafting communities. *Mar. Biol.* 161:1441–1453.
- **Gregory M.R.** (1996). Plastic ‘scrubbers’ in hand cleansers: a further (and minor) source for marine pollution identified. *Mar. Pollut. Bull.* 32: 867–871.
- **Gregory M.R.** (2009). Environmental implications of plastic debris in marine settings entanglement, ingestion, smothering, hangers on, hitch hiking and alien invasions. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 364 (1526):2013–2025.
- **Guilhermino L**, Piedade B, Silva MC, Soares A.M.V.M. (1998). Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers* 3(2):157–163.
- **Gusmao F.**, Domenico M.D., Amaral A.C.Z., Martínez A., Gonzalez B.C., Worsaae K., Ivar do Sul J.A., Cunha Lana P.da. (2016). In situ ingestion of microfibres by meiofauna from sandy beaches. *Environ. Pollut.* 216: 584–590.
- **Halliwell B.**, Gutteridge (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. Oxford University Press, Oxford, UK.
- **Hammer J.**, Kraak M.H., Parsons J.R. (2012). Plastics in the marine environment: the dark side of a modern gift. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 220: 1–44.
- **Hanna S.K.**, Miller R.J., Zhou D., Keller A.A., Lenihan H.S. (2012). Accumulation and toxicity of metal oxide nanoparticles in a soft-sediment estuarine amphipod. *Aquat. Toxicol.* 142–143: 441–446.
- **Hansen P.D.**, Bock R., Brawer F. (1991). Investigations of phagocytosis concerning the immunological defence mechanism of *Mytilus edulis* using a

- sublethal luminescent bacterial assay (*Phosphobacterium phosphoreum*). *Comp. Biochem. Phys. C.* 100:129–152.
- **Hardy** S.W., Fletcher T.C., Gerrie L.M. (1976). Factors in hemolymph of the mussel *Mytilus edulis* L., of possible significance as defence mechanisms. *Bioche. Soc. T.* 4:473–475.
  - **Harvell** C., Kim K., Burkholder J.M., Colwell R.R., Epstein P.R., Grimes D.J., Hofmann E.E., Lipp E.K., Osterhaus A.D.M.E., Overstreet R.M., Porter J.W., Smith G.W., Vasta G.R. (1999) Emerging marine diseases climate links and anthropogenic factors. *Science* 285:1505–1510.
  - **Holmes** L.A., Turner A., Thompson R.C. (2014). Interactions between trace metals and plastic production pellets under estuarine conditions. *Mar. Chem.* 167: 25–32.
  - **Ivar do Sul** J.A., Costa M.F., Barletta M., Cysneiros F.J.A. (2013). Pelagic microplastics around an archipelago of the Equatorial Atlantic. *Mar. Pollut. Bull.* 75: 305–309.
  - **Jemec** A., Tisler T., Drobne D., Sepčić K., Jamnik P., Ros M. (2008). Biochemical biomarkers in chronically metal stressed daphnids. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 147: 61–68.
  - **Jeong** C.B., Won E.J., Kang H.M., Lee M.C., Hwang D.S., Hwang U.K., Zhou B., Souissi S., Lee S.J., Lee J.S. (2016). Microplastic size-dependent toxicity, oxidative stress induction, and p-JNK and p-P38 activation in the monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*). *Environ. Sci. Technol.* 50(16):8849-57.
  - **Jiang** W., Mashayekhi H., Xing B. S. (2009). Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environ. Pollut.* 157: 1619-1625.
  - **Kadhim** M. (1990) Methodologies for monitoring the genetic effects of mutagens and carcinogens accumulated in the body tissue of marine mussels. *Rev. Aquatic Sci.*, 2:83–107;
  - **Katsnelson** A., (2015). News feature: microplastics present pollution puzzle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112: 5547–5549.

- **Klaine** S.J., Koelmans A.A., Horne N., Carley S., Handy R.D., Kapustka L. (2012). Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. *Environ. Toxicol. Chem.* 31: 3–14.
- **Klaper** R. , Crago J., Barr J., Arndt D., Setyowati K., Chen J. (2008). Toxicity biomarker expression in daphnids exposed to manufactured nanoparticles: changes in toxicity with functionalization. *Environ. Pollut.* 157:1152-1156.
- **Klein** S., Worch E., Knepper T.P. (2015). Occurrence and spatial distribution of microplastics in river shore sediments of the Rhine-Main area in Germany. *Environ. Sci. Technol.* 49 (10):6070–6076.
- **Koelmans** A.A., Besseling E., Shim W.J. (2015). Nanoplastics in the Aquatic Environment. Critical Review. In: Bergmann M, Gutow L, Klages M (eds.). *Marine Anthropogenic Litter*. Springer International Publishing, Cham. 325–340.
- **Lafontaine** Y.D., Gagne F., Blaise C., Costan G., Gagnon P., Chan H.M., (2000). Biomarkers in zebra mussels (*Dreissenap olymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol.* 50: 51–71.
- **Lambert** S., Sinclair C., Boxall A., (2014). Occurrence, degradation, and effect of polymer- based materials in the environment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 227:1–53.
- **Law**, K.L., Morét-Ferguson, S., Maximenko, N.A., Proskurowski, G., Peacock, E.E., Hafner, J., Reddy, C.M., (2010). Plastic accumulation in the North Atlantic sub- tropical gyre. *Science* 329: 1185-1188.
- **Law** K.L., Thompson R.C., (2014). Microplastics in the seas. *Science* 345 (6193):144–145.
- **Lechner** A., Keckeis H., Lumesberger-Loisl F.(2014) The Danube so colourful: A potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe's second largest river. *Environ. Pollut.* 188:177–181.
- **Lee** K.W., Shim W.J., Kwon O.Y., Kang J.H.( 2013). Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ. Sci. Technol.* 47 (19), 11278–11283.

- **Lehtonen** K.K., Schiedek D., Köhler A., Lang T., Vuorinen P.J., Förlin L., Baršienė J., Pempkowiak J., Jens Gercken J. (2006). The BEEP project in the Baltic Sea: overview of results and outline for a regional biological effects monitoring strategy. *Mar. Pollut. Bull.* 53:523–537.
- **Li** J.N., Yang D., Li L., Jabeen K., Shi H., (2015). Microplastics in commercial bivalves from China. *Environ. Pollut.* 207:190–195.
- **Li** J.N., Qu X.Y., Su L., Zhang W., Yang D., Kolandhasamy P., Li D., Shi H.H. (2016). Microplastics in mussels along the coastal waters of China. *Environ. Pollut.* 214:177–184.
- **Lima** A.R., Barletta M. & Costa M.F. (2016). Seasonal-dial shifts of ichthyoplankton assemblages and plastic debris around an Equatorial Atlantic archipelago. *Front. Environ. Sci.* 4: 56.
- **Livingstone** D.R. & Pipe R.K. (1992). Mussels and environmental contaminants: molecular and cellular aspects. In *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Gosling, Elsevier Amsterdam 425-464.
- **Lowry** O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- **Luna-Acosta** A., Bustamante P., Godefroy J., Fruitier-Arnaudin I., Thomas-Guyon H. (2010). Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on health status of juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed in situ. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17(4):999–1008.
- **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. *Mar. Pollut. Bull.* 67: 94–99.
- **Lusher** A.L., Tirelli V., O'Connor I., Officer R. (2015). Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples. *Sci. Rep.* 5:14947.
- **Lusher** A., Welden N., Sobral P., Cole M. (2017). Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Anal. Methods*, 9: 1346-1360.

- **Mailman** M., Stepnuk L., Cicek N., Bodaly R. (2006) Strategies to lower methyl mercury concentrations in hydroelectric reservoirs and lakes: A review. *Sci. Total. Environ.* 368(1): 224-35.
- **Malham** S.K., Coulson C.L., Runham N.W. (1998). Effects of repeated sampling on the haemocytes and haemolymph of *Eledone cirrhosa* (Lam.). *Comp. Biochem. Physiol.* 121A: 431–440.
- **Mathalon** A., Hill P. (2014). Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Mar. Pollut. Bull.* 81: 69–79.
- **Martin-Diaz** M.L., Blasco J., Sales D., DelValls T.A. (2008). Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. *Environ. Pollut.* 151:631–640.
- **Mato** Y., Isobe T., Takada H., Kanehiro H., Ohtake C., Kaminumm T. (2001). Plastic resin pellets as a transportmedium for toxic chemicals in the marine environment. *Environ. Sci. Technol.* 35 (2):318–324.
- **Mengoli** A. (1998). *Aspetti morfo-funzionali dei mitili*. Asl Ferrara.
- **Mitta** G., Vandebulcke F., Roch P. (2000). Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* 486: 185-190.
- **Moore** M.N., Allen J.I. (2002). A computational model of the digestive gland epithelial cell of the marine mussel and its simulated responses to aromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.* 54: 579–584.
- **Moore** M.N., Allen J.I., McVeigh A. (2006) Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar. Environ. Res.* 61:278–304.
- **Murray** F., Cowie P.R. (2011). Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Mar. Pollut. Bull.* 62:1207–1217.
- **McCormick** A., Hoellein T.J., Mason S.A., Schlupe J., Kelly J.J. (2014). Microplastic is an abundant and distinct microbial habitat in an urban river. *Environ. Sci. Technol.* 48:11863–11871.
- **McDade** J.E., Tripp M.R. (1967). Lysozyme in the hemolymph of the oyster *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* 9:531–535.

- **Nasci C.**, Nesto N., Monteduro R.A., Da Ros L. (2002) Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (VE Italy). *Mar. Environ. Res.* 54:811–816.
- **Norén F.**, Naustvoll L.J. (2010). Survey of Microscopic Anthropogenic Particles in Skagerrak. 2779. Klima org forurensningsdirektoratet Norge Rep. TA, pp. 1–20.
- **Obbard R.W.**, Sadri S., Wong Y.Q., Khitun A.A., Baker I., Thompson R.C. (2014). Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. *Earth's Future* 2(6): 315-320.
- **Oliver L.M.**, Fisher W.S. (1999). Appraisal of prospective bivalve immunomarkers. *Biomarkers* 4:510–530.
- **Orbea A.**, Ortiz-Zarragoitia M., Cajaraville M.P. (2002). Interactive effects of benzo(a)pyrene and cadmium and effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on antioxidant and peroxisomal enzymes and peroxisomal volume density in the digestive gland of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.), *Biomarkers* 7: 33–48.
- **Orbea A.**, Cajaraville M.P. (2006). Peroxisome proliferation and antioxidant enzymes in transplanted mussels of four basque estuaries with different levels of polycyclic aromatic hydrocarbon and polychlorinated biphenyl pollution. *Environ. Toxicol. Chem.* 25:1616–1626.
- **Ortiz-Zarragoitia M.** & Cajaraville M.P. (2006). Biomarkers of exposure and reproduction related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 361–369.
- **Ory N.C.**, Sobral P., Ferreira J.L., Thiel M. (2017). Amberstripe scad *Decapterus muroadsi* (Carangidae) fish ingest blue microplastics resembling their copepod prey along the coast of Rapa Nui (Easter Island) in the South Pacific subtropical gyre. *Sci. Total Environ.* 586: 430-437.

- **Ottaviani E.**, Franchini A., Barbieri D., Kletsas D. (1998). Comparative and morphofunctional studies on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: presence of two aging-related hemocyte stages. *It. J. Zool.* 65: 349-354.
- **Pan J.F.**, Buffet P.E., Poirer L., Amiard-Triquet C., Gilliland D., Joubert Y., Pilet P., Guibbolini M., Faverney C.R., Roméo M., VAlsaml-Jones E., Mouneyrac C. (2012). Size dependent bioaccumulation and ecotoxicology of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: The Tellinid clam *Scrobicularia plana*. *Environ. Pollut.* 168: 37–43.
- **Paul-Pont I.**, Lacroix C., Fernández C.G., Hégaret H., Lambert C., Le Goïc N., Frère L., Cassone A.L., Sussarellu R., Fabioux C., Guyomarch J., Albetosa M., Huvet A., Soudant P. (2016). Exposure of marine mussels *Mytilus spp.* to polystyrene microplastics: toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. *Environ. Pollut.* 216:724-37.
- **Payne J.F.** (1977). Mixed function oxidases in marine organism in relation to petroleum hydrocarbon metabolism and detection. *Mar. Pollut. Bull.* 8:112-116.
- **Pellerin-Massicotte J.** (1997). Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive gland of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *J. Rech. Oceanogr.* 22:91–98.
- **Pipe R.K.** (1992). Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* 16(2–3):111–122.
- **Pipe R. K.**, Porte C., Livingstone D. R. (1993). Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* 3: 221–223.
- **Pipe R.K.**, Coles J.K. (1995). Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 5:581–595.
- **Pipe R.K.**, Coles J.A., Thomas M.E., Fossato V.U., Pulsford A.L. (1995). Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. *Aquat. Toxicol.* 32:59–73.

- **Regoli F., Principato G. (1995).** Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31: 143–164.
- **Regoli F., Pellegrini D., Winston G.W., Gorbi S., Giuliani S., Virno- Lamberti C., Bompadre S. (2002).** Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Mar. Pollut. Bull.* 44: 912–922.
- **Regoli F., Winston G.W., Gorbi S., Frenzilli G., Nigro M., Corsi I., Focardi S. (2003).** Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22:56–65.
- **Regoli F., Frenzilli G., Bocchetti R., Annarumma F., Scarcelli V., Fattorini D., Nigro M. (2004).** Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquat. Toxicol.* 68: 167–178.
- **Resgalla J.R.C., Brasil E.S., Salomão L.C. (2007).** The effect of temperature and salinity on the physiological rates of the mussel *Perna perna* (Linnaeus 1758). *Braz. Arch. Biol. technol.* 50: 543–556.
- **Roch P. (1999).** Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172: 125-145.
- **Rocha-Santos T., Duarte A.C. (2015).** A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *TrAC Trends Anal. Chem.* 65:47–53.
- **Rocher B., Le Goff J., Peluhet L., Briand M., Manduzio H., Gallois J., Devier M.H., Geffard O., Gricourt L., Augagneur S., Budzinski H., Pottier D., Andre V., Lebailly P., Cachot J. (2006).** Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquat. Toxicol.* 79:65–77.

- **Rochman** C.M., Hoh E., Hentschel B.T., Kaye S. (2013). Long-term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: implications for plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47 (3): 1646–1654.
- **Rochman** C.M., Kurobe T., Flores I., Teh S.J. (2014). Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Sci. Total Environ.* 493:656–661.
- **Romeo** M., Gnassia-Barelli M. (1997). Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussates*. *Comp. Biochem. Physiol. C* .118: 33.
- **Rossi** G., Barnoud J., Monticelli L. (2014). Polystyrene nanoparticles perturb lipid membranes. *J. Phys. Chem. Lett.* 5:241–246.
- **Sadri** S.S. & Thompson R.C. (2014). On the quantity and composition of floating plastic debris entering and leaving the Tamar Estuary, Southwest England. *Mar. Pollut. Bull.* 81(1): 55-60.
- **Santana** M.F.M. (2012). Seleção, ingestão, retenção e assimilação de microplásticos (PVC) por invertebrados bentônicos marinhos. Monograph (undergraduate research). University of São Paulo, Oceanography Institute. 50.
- **Seltenrich** N. (2015). New link in the food chain? Marine plastic pollution and seafood safety. *Environ. Health Perspect.* 123:35-41.
- **Setälä** O., Fleming-Lehtinen V., Lehtiniemi M. (2014). Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environ. Pollut.* 185:77–83.
- **Shah** A.A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 26: 246-265.
- **Sjollema** S.B., Redondo-Hasselerharm P., Leslie H.A., Kraak M.H., Vethaak A.D. (2016). Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth? *Aquat. Toxicol.* 170:259–261.

- **Soltani N., Amira A., Sifi K., Beldi H.(2012).** Environmental of the Annaba Gulf (Algeria):mesasurement of biomarkers in *Donax trunculus* and metallic pollution. Bull. soc. zool.Fr.137 (1-4):51-60.
- **Tanaka K., Takada H., Yamashita R., Mizukawa K., Fukuwaka M., Watanuki, Y. (2013).** Accumulation of plastic-derived chemicals in tissues of seabirds ingesting marine plastics. Mar. Pollut. Bull. 69:219-222.
- **Teuten E.L., Rowland S.J., Galloway T.S., Thompson R.C. (2007).** Potential for plastics to transport hydrophobicm contaminants. Environ. Sci. Technol. 41 (22):7759– 7764.
- **Teuten E.L., Saquing J.M., Knappe D.R., Barlaz M.A., Jonsson S., Björn A. (2009).** Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. Philos. Trans. R. Soc. B .364:2027–2045.
- **Thompson R.C., Olsen Y., Mitchell R.P., Davis A., Rowland S.J., John A.W., McGonigle D., Russell A.E. (2004).** Lost at sea: where is all the plastic? Science 304(5672): 838-838.
- **Thompson R.C., Swan S.H., Moore C.J., VomSaal F.S. (2009).** Our plastic age. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci. 364 (1526):1973–1976.
- **Tourinho P.S., Ivar do sul J.A., Filmann G. (2010).** Is marine debris ingestion still a problem for the coastal marine biota of southern Brazil?. Mar. Pollut. Bull. 60:396–401.
- **UNEP (2016).** Marine plastic debris and microplastics. Global lessons and research to inspire action and guide policy change. United Nations Environment Programme, Nairobi.
- **UNEP/RAMOGÉ (1999).** Manual on The Biomarkers Recommended for The MED POL Biomonitoring Programme. UNEP, Athens, p. 94.
- **Valbonesi P., Sartor G., Fabbri E. (2003).** Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. Sci. Total Environ. 312:79–88.
- **Van Cauwenberghe L. (2013).** Microplastic pollution in deep-sea sediments. Environ. Pollut. 182:495–499.

- **Van cauwenberghe L., Janssen C.R. (2014).** Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environ. Pollut.*193:65–70.
- **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. *Environ. Pollut.*199:10–17.
- **Vandermeersch G., Van Cauwenberghe L., Janssen C.R., Marques A., Granby K., Fait G., Kotterman M.J.J., Diogene J., Bekaert K., Robbens J., Devriese L. (2015).** A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environ. Res.* 143 (Pt B): 46-55.
- **Velzeboer I., Kwadijk C.J., Koelmans A.A. (2014).** Strong sorption of PCBs to nanoplastics, microplastics, carbon nanotubes, and fullerenes. *Environ. Sci. Technol.* 48: 4869–4876.
- **Viarengo A.M., Canesi L., (1991).** Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture* 94: 225-243.
- **Viarengo A., Abele-Oeschger D., Burlando B. (1998).** Effects of low temperature on prooxidant processes and antioxidant defence systems in marine organisms. In: Portner, R.C., Playle, R.C. (Eds.), *Cold Ocean Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge. 213–235.
- **Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C., Fabbri E., Koehler A. (2007).** The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146:281–300.
- **Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou M.J., Valavanidis A. (2007)** Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos gulf of Greece. *Mar Poll Bull* 54:1361–1371.
- **Von moos N., Burkhardt-Holm P., Kohler A. (2012).** Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environ. Sci. Technol.*46,:11327–11335.

- **Waller** C.L., Griffiths H.J., Waluda C.M., Thorpe S.E., Loaiza I., Moreno B., Pacherras C.O. & Hughes K.A. (2017). Microplastics in the Antarctic marine system: An emerging area of research. *Sci. Total Environ.* 598: 220-227.
- **Ward** J.E., Kach, D.J. (2009). Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Mar. Environ. Res.* 68:137–142.
- **Wang** H., Adeleye A.S., Huang Y., Li F., Keller A.A. (2015). Heteroaggregation of nanoparticles with biocolloids and geocolloids. *Adv. Colloid Interf. Sci.* 226: 24–36.
- **Wang** J., Tan Z., Peng J., Qiu Q., Li M. (2016). The behaviors of microplastics in the marine environment. *Mar. Environ. Res.* 113:7-17.
- **Wegner** A., Besseling E., Foekema E.M., Kamermans, P., Koelmans A.A. (2012). Effects of nanopolystyrene on the feeding behaviour of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Environ. Toxicol. Chem.* 31: 2490–2497.
- **Winston** G.W., Di Giulio R.T., (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19:137-161.
- **Winston** G.W., Moore M.N., Kirchin M.A., Soverchia C. (1996). Production by reactive oxygen species by haemocytes from the marine mussel *Mytilus edulis*: lysosomal localization and effects of xenobiotics. *Comp. Biochem. Phys. C.* 113:221–229.
- **Winzer** K. (2001). Oxidative stress in the marine environment ,prognostic tools for toxic injury in fish liver cells. Academic Thesis, University of Amsterdam.
- **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. *Mar. Pollut. Bull.* 85:146–155.
- **Wootton** E.C., Dyrinda E.A., Pipe R.K., Ratcliffe N.A. (2003,a). Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquat. Toxicol.* 65:13–25.

- **Wootton** E.C., Dyrinda E.A., Ratcliffe N.A. (2003 b). Bivalve immunity: comparison between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). Fish Shellfish Immunol. 15: 195- 210.
- **Wright** R. K. (1981). Urochordates, vol. 2. Academic Press, Ltd., London, England.
- **Wright** S.L., Thompson R.C., Galloway T.S. (2013a). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. Environ. Pollut. 178:483–492.
- **Wright** S.L., Rowe D., Thompson R.C. (2013b). Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. Curr. Biol. 23: R1031–R1033.
- **Xia** T., Kovoichich M., Liang M., Zink J.I., Nel A.E., (2008). Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. ACS Nano 2:85–96.
- **Zettler** E.R., Mincer T.J., Amaral-Zettler L.A. (2013). Life in the “Plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. Environ. Sci. Technol. 47:7137-7146.
- **Zitko** V., Hanlon M. (1991). Another source of pollution by plastics: skin cleaners with plastic scrubbers. Mar. Pollut. Bull. 22:41–42.