

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

**Microplastiche, metalli pesanti e impatto potenziale sull'efficienza  
di schiusa in *Caretta caretta***

Tesi di Laurea in Biologia delle Tartarughe e dei Cetacei

Relatore

Prof.ssa Annalisa Zaccaroni

Presentata da

Alice Dal Chiele

Correlatore

Prof. Antonio Mingozzi

Sessione Anno Accademico 2020-2021



# INDICE

<b>INDICE</b>	<b>A</b>
<b>RIASSUNTO</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>2</b>
<b>CENNI DI BIOLOGIA DI CARETTA CARETTA</b>	<b>2</b>
SISTEMATICA	2
CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE	3
DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA E HABITAT	5
STATO DI CONSERVAZIONE	6
ALIMENTAZIONE	7
CICLO RIPRODUTTIVO	8
DETERMINAZIONE DEL SESSO	10
<b>CENNI DI TOSSICOLOGIA DEI METALLI</b>	<b>12</b>
<b>METALLI PESANTI</b>	<b>14</b>
INTRODUZIONE AI METALLI PESANTI	14
METALLI PESANTI E AMBIENTE	14
METALLI PESANTI E IMPATTI SULLE TARTARUGHE MARINE	16
<b>MICROPLASTICHE</b>	<b>21</b>
INTRODUZIONE ALLE MICROPLASTICHE	21
MICROPLASTICHE E AMBIENTE	22
MICROPLASTICHE E IMPATTI SULLE TARTARUGHE MARINE	24
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>26</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>27</b>
<b>AREA DI CAMPIONAMENTO</b>	<b>27</b>
<b>INFORMAZIONI RELATIVE AI NIDI</b>	<b>28</b>
<b>METODOLOGIA DI CAMPIONAMENTO</b>	<b>31</b>
<b>PREPARAZIONE DEI CAMPIONI</b>	<b>32</b>
METALLI	32
MICROPLASTICHE	32

<b>ANALISI DEI CAMPIONI</b>	<b>34</b>
METALLI	34
MICROPLASTICHE	35
ANALISI STATISTICA	35
<b><u>RISULTATI E DISCUSSIONE</u></b>	<b>36</b>
METALLI	36
MICROPLASTICHE	49
<b><u>CONCLUSIONE</u></b>	<b>59</b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA</u></b>	<b>61</b>
<b><u>RINGRAZIAMENTI</u></b>	<b>73</b>

## RIASSUNTO

I metalli pesanti svolgono un ruolo chiave nella contaminazione oceanica poiché molto stabili e non biodegradabili. Gli organismi non sono quindi in grado di scomporli ed eliminarli, ma procedono al loro accumulo e conservazione a lungo termine, determinando conseguentemente il loro inserimento nella catena trofica. Storicamente, la ricerca sui metalli pesanti si è concentrata su esemplari deceduti di tartaruga, mentre, più recentemente, la raccolta e l'analisi di campioni di sangue di esemplari vivi ha consentito di studiare le potenziali implicazioni sulla salute e sul successo riproduttivo delle popolazioni. Nonostante questi progressi, poche informazioni sono ancora disponibili sull'esposizione delle uova ai metalli e sul trasferimento dei contaminanti dalla madre all'embrione.

Dagli anni '40, la richiesta e produzione di materiali plastici sono aumentate in modo esponenziale a livello globale. La loro versatilità, leggerezza, resistenza ed economicità li hanno resi accessibili e convenienti per l'utilizzo di tutti i giorni. Questi vantaggi hanno avuto però un costo per gli ecosistemi marini di tutto il mondo e sono stati registrati danni a innumerevoli specie marine, tra cui anche *Caretta caretta*. Recenti studi hanno, ad esempio, dimostrato la capacità di queste particelle di influenzare negativamente il microambiente della camera di incubazione delle uova, causando impatti non indifferenti sullo sviluppo embrionale e sul successo di schiusa.

In questo lavoro di tesi si è andati quindi a verificare i livelli di esposizione ai metalli pesanti, mediante l'analisi all'ICP-OES delle uova, e i livelli di esposizione alle microplastiche, grazie a un nuovo metodo basato sul principio della flottazione della densità applicato sui campioni di sabbia, nei nidi di *C. caretta* rinvenuti durante la stagione di deposizione 2021 lungo la costa ionica della provincia di Catanzaro. Successivamente è stata valutata la correlazione tra i livelli di esposizione e il successo di schiusa della specie: i risultati ottenuti hanno permesso di affermare che per le concentrazioni dei metalli si ha una correlazione negativa ( $p=0,022$ ) tra il contenuto di Pb in tuorlo e albume combinati e il successo di schiusa registrato nei nidi presi in analisi, mentre ciò non è stato possibile per le concentrazioni delle microplastiche.

# INTRODUZIONE

## CENNI DI BIOLOGIA DI *Caretta caretta*

### SISTEMATICA

Le tartarughe marine sono considerate un gruppo monofiletico. Le specie attualmente viventi si sono originate e diffuse circa 100 milioni di anni fa (Hendrickson, 1980). Fanno tutte parte dell'ordine *Testudines* e della superfamiglia *Chelonioidea* e sono divise in due famiglie (Figura 1): *Cheloniidae*, che comprende sei specie viventi (*Caretta caretta*, *Lepidochelys kempii*, *Lepidochelys olivacea*, *Eretmochelys imbricata*, *Chelonia mydas* e *Natator depressus*), e *Dermochelyidae*, che comprende un'unica specie vivente (*Dermochelys coriacea*) (Hirayama, 1994).

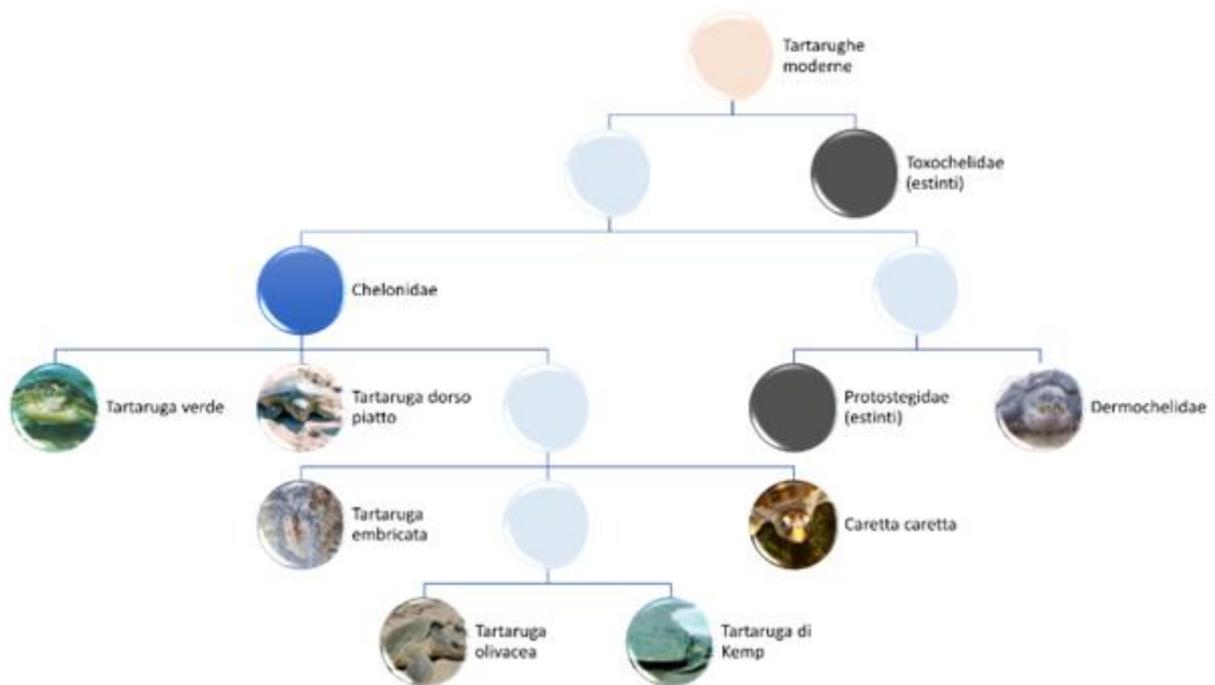


Figura 1 – Evoluzione delle moderne tartarughe marine (modificato Spotila, 2004)

La classificazione tassonomica di *Caretta caretta* (Linnaeus 1758) è mostrata in Tabella 1.

Regno	Phylum	Classe	Ordine	Famiglia	Genere
<i>Animalia</i>	<i>Chordata</i>	<i>Reptilia</i>	<i>Testudines</i>	<i>Cheloniidae</i>	<i>Caretta</i>

Tabella 1 – Classificazione tassonomica di *C. caretta* (Casale e Tucker, 2017)

## CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE

*Caretta caretta* si distingue dalle altre specie di tartarughe marine per avere delle pinne anteriori relativamente corte e una testa triangolare, grande rispetto alle dimensioni corporee, che sostiene mascelle potenti che le consentono di nutrirsi di prede a guscio duro (Figure 2 e 3) (Pritchard e Mortimer, 1999; Valente et al., 2008).

Il carapace della tartaruga è moderatamente ampio e a forma di cuore allungato, con un'area ispessita sopra la base della coda (a livello del quinto scudo vertebrale) nei subadulti e negli adulti. Presenta scudi non sovrapposti ed è collegato al piastrone da un ponte di tre paia di scudi inframarginali. Il margine posteriore risulta leggermente seghettato negli individui immaturi (Pritchard e Mortimer, 1999; Spotila, 2004; Witherington, 2017).

I subadulti e gli adulti presentano una colorazione del carapace variabile dal mogano al rosso-marrone e una colorazione del piastrone che può andare dal crema all'arancione. La porzione dorsale della testa e le pinne sono ricoperte da scaglie di una tonalità tra l'arancione e il marrone, con margini giallastri. Le pinne, inoltre, presentano due artigli ciascuna. Tutte queste caratteristiche possono essere oscurate dalla crescita di organismi commensali (Pritchard e Mortimer, 1999; Spotila, 2004; Witherington, 2017).

I piccoli presentano una colorazione del carapace variabile dal marrone chiaro al marrone scuro e grigio scuro e una colorazione marrone-giallastra del piastrone. Le pinne vanno dal grigio scuro al marrone, con margini bianco-grigio chiaro (Pritchard e Mortimer, 1999; Spotila, 2004; Witherington, 2017).

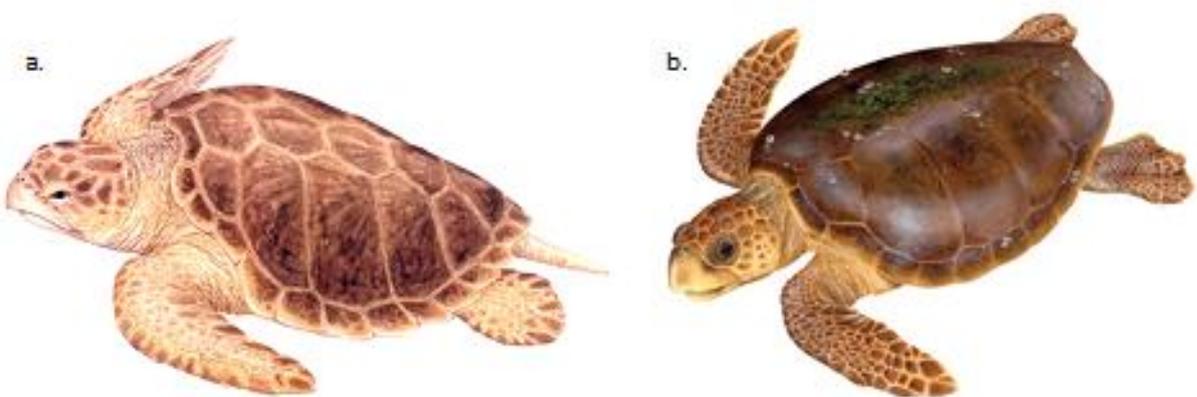


Figura 2 – Illustrazione di (a.) un maschio adulto (Spotila, 2004) e (b.) una femmina adulta (Witherington, 2017) di *C. caretta*

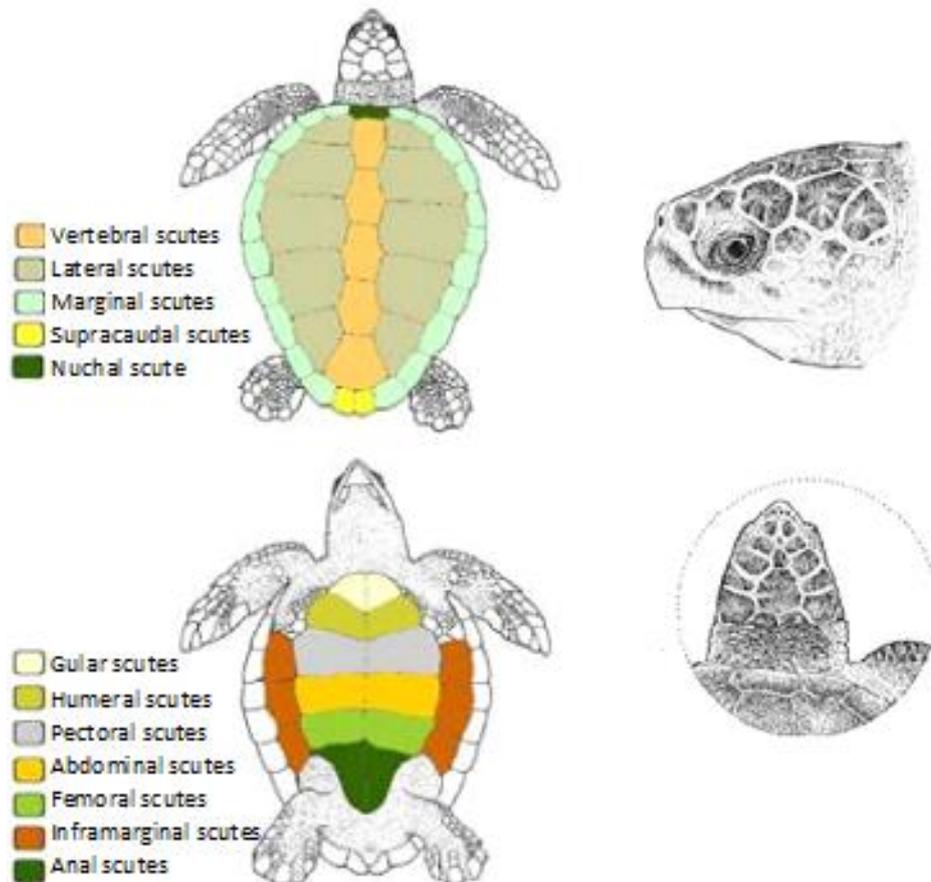


Figura 3 – Illustrazione delle caratteristiche morfologiche di *C. caretta* (Pritchard e Mortimer, 1999)

Il peso medio di una femmina adulta di *C. caretta* è di 180 kg nell'Oceano Atlantico Nord-Occidentale, di 150 kg nell'Oceano Pacifico e inferiore ai 100 kg nel Mar Mediterraneo (Pritchard e Mortimer, 1999).

Le dimensioni del carapace di una femmina di *C. caretta* che nidifica sulle spiagge mediterranee sono più piccole di quelle di una femmina che nidifica sulle coste del Pacifico e dell'Atlantico (Margaritoulis et al. 2003; Tiwari e Bjorndal, 2000): la lunghezza media del carapace, misurata come SCL (*Straight Carapace Length*), risulta essere di 105 cm nell'Oceano Atlantico Nord-Occidentale, di 100 cm nell'Oceano Pacifico e inferiore ai 90 cm nel Mar Mediterraneo (Pritchard e Mortimer, 1999).

Tartarughe marine che presentano delle dimensioni del carapace inferiori a 90 cm sono solitamente assegnate allo stadio subadulto nell'Oceano Atlantico e allo stadio adulto nel Mediterraneo (Piovano et al., 2011). Queste differenze sono probabilmente dovute alla plasticità fenotipica, come riscontrato anche in altre specie (es. *Chelonia mydas* e *Thunnus thynnus*) (Piovano et al. 2011; Tiwari e Bjorndal, 2000).

## DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA E HABITAT

*C. caretta* è presente in tutte le acque temperate, tropicali e subtropicali del Mar Mediterraneo e dell'Oceano Atlantico, Pacifico e Indiano (Figura 4). Occupa tre diversi ecosistemi nel corso della sua vita: la zona terrestre (dove avviene la nidificazione), la zona neritica e la zona oceanica (Pritchard e Mortimer, 1999; Wallace et al., 2010).

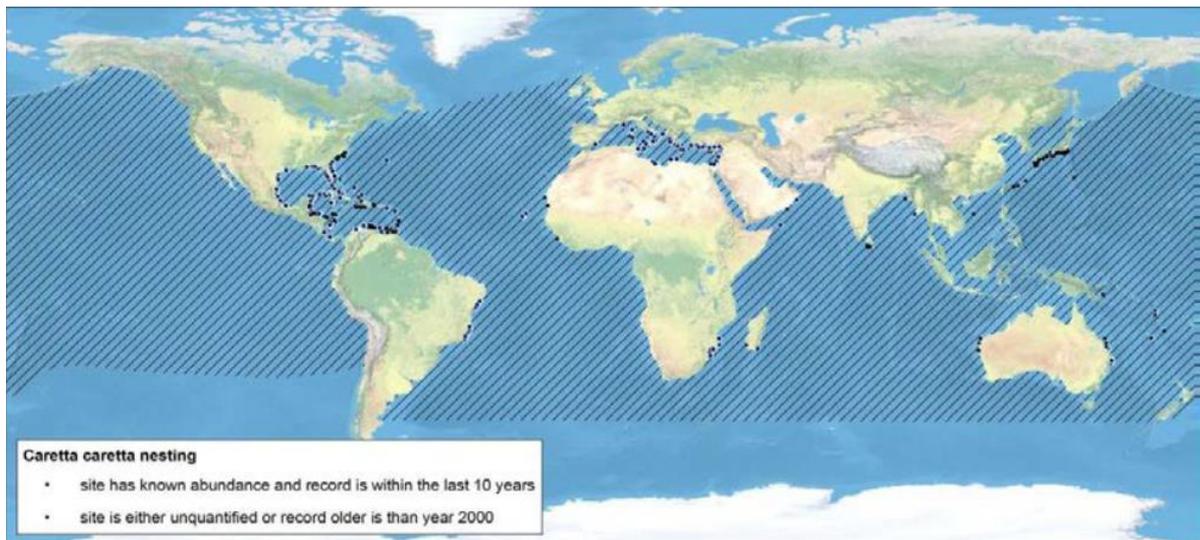


Figura 4 – Distribuzione globale e siti di nidificazione di *C. caretta* (Wallace et al., 2010)

È la specie più comune nel Mar Mediterraneo, che rappresenta anche un sito di nidificazione di fondamentale importanza, e una specie altamente migratoria, con individui in grado di migrare per migliaia di chilometri (Bolten e Witherington, 2003; Margaritoulis et al., 2003): gli individui giovanili sono in grado di effettuare migrazioni transoceaniche, mentre i subadulti e gli adulti possono compiere ampi movimenti stagionali; gli individui che raggiungono la maturità sessuale effettuano invece periodiche migrazioni riproduttive tra le acque di foraggiamento e le spiagge di nidificazione, identificate principalmente con i margini occidentali dell'Oceano Atlantico e dell'Oceano Indiano (Witherington, 2017).

In Tabella 2 sono riportati i principali habitat in cui possiamo ritrovare *C. caretta*.

Habitat	Season	Suitability	Major Importance?
9. Marine Neritic -> 9.1. Marine Neritic - Pelagic	Resident	Suitable	Yes
9. Marine Neritic -> 9.2. Marine Neritic - Subtidal Rock and Rocky Reefs	Resident	Suitable	Yes
9. Marine Neritic -> 9.3. Marine Neritic - Subtidal Loose Rock/pebble/gravel	Resident	Suitable	Yes
9. Marine Neritic -> 9.4. Marine Neritic - Subtidal Sandy	Resident	Suitable	Yes
9. Marine Neritic -> 9.5. Marine Neritic - Subtidal Sandy-Mud	Resident	Suitable	Yes
9. Marine Neritic -> 9.6. Marine Neritic - Subtidal Muddy	Resident	Suitable	Yes
9. Marine Neritic -> 9.9. Marine Neritic - Seagrass (Submerged)	Resident	Suitable	Yes
9. Marine Neritic -> 9.10. Marine Neritic - Estuaries	Resident	Suitable	Yes
10. Marine Oceanic -> 10.1. Marine Oceanic - Epipelagic (0-200m)	Resident	Suitable	Yes
12. Marine Intertidal -> 12.2. Marine Intertidal - Sandy Shoreline and/or Beaches, Sand Bars, Spits, Etc	Breeding	Suitable	Yes

Tabella 2 – Habitat di *C. caretta* (<https://www.iucnredlist.org/technical-documents/classification-schemes>)

## STATO DI CONSERVAZIONE

*C. caretta* costituisce una singola specie a livello globale che comprende 10 diverse sottopopolazioni: Oceano Atlantico Nord-Occidentale, Oceano Atlantico Nord-Orientale, Oceano Atlantico Sud-Occidentale, Mar Mediterraneo, Oceano Indiano Nord-Orientale, Oceano Indiano Nord-Occidentale, Oceano Indiano Sud-Orientale, Oceano Indiano Sud-Occidentale, Oceano Pacifico Settentrionale e Oceano Pacifico Meridionale (Figura 5) (Casale e Tucker, 2017).

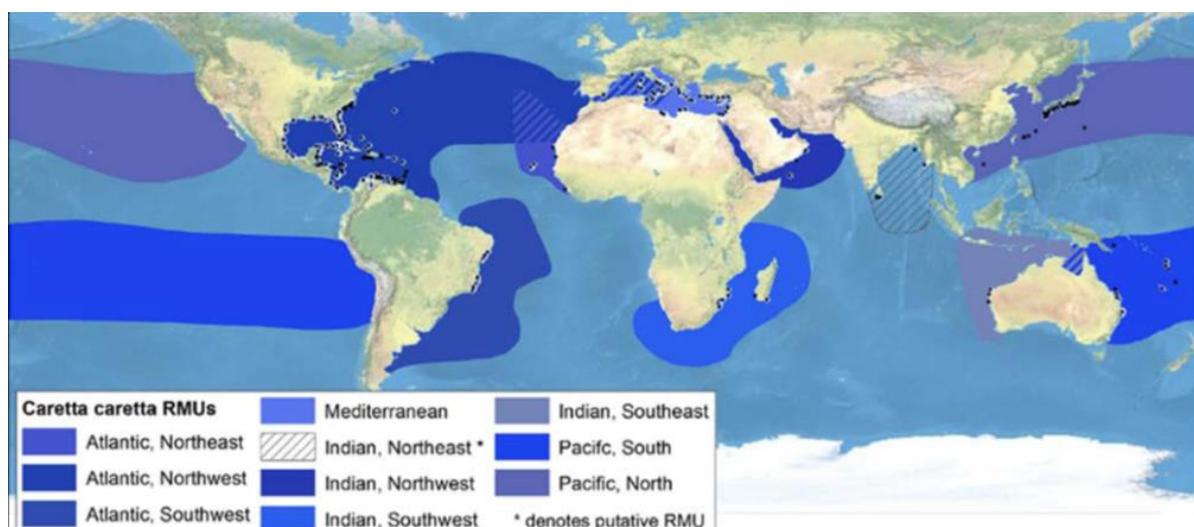


Figura 5 – Mappa globale delle sottopopolazioni e dei siti di nidificazione di *C. caretta* (Wallace et al., 2010)

*C. caretta* rientra nella *Red List* delle specie minacciate della IUCN ed è stata classificata dalla stessa IUCN come *Vulnerable species* a livello globale (Casale e Tucker, 2017).

Il rischio più elevato viene corso dai piccoli, sia durante lo sviluppo embrionale, che subito dopo la schiusa, ed è dovuto alla predazione da parte di uccelli, rettili e mammiferi, anche introdotti dall'uomo. Una volta arrivati in mare, sia i piccoli che gli adulti possono essere soggetti a predazione. Un altro fattore di rischio può essere rappresentato da malattie e agenti patogeni (un esempio è dato dalla fibropapillomatosi), ma attualmente la principale causa di morte rimane l'uomo:

- mortalità per catture accessorie da reti da traino, reti da posta, palangari e altre attività di pesca;
- mortalità per collisioni con imbarcazioni;
- mortalità per inquinamento e ingestione di plastiche;
- mortalità per cambiamento climatico;
- mortalità per perdita dell'habitat a causa dell'urbanizzazione costiera e del sovrasfruttamento degli ecosistemi marini;
- mortalità dei piccoli da illuminazione artificiale (Witherington, 2017);
- mortalità per uso e commercio di uova e animali (Casale e Tucker, 2017).

Per questi motivi *C. caretta* è protetta dal punto di vista legislativo ed è inserita nell'Appendice I della CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species*), nell'Appendice I e II della CMS (*Convention on Migratory Species*) e nell'Allegato II del Protocollo SPAW della Convenzione di Cartagena (Casale e Tucker, 2017).

## **ALIMENTAZIONE**

I piccoli di *C. caretta* sono sostenuti dal tuorlo che viene fornito loro dalla madre: il tuorlo rimasto dopo la schiusa viene utilizzato per sostenere il costo metabolico dovuto alla rottura del guscio e all'emersione dalla sabbia e come prima fonte di alimentazione in mare aperto (Kraemer e Bennett, 1981).

Una volta raggiunto il mare, *C. caretta* presenta una dieta carnivora. I piccoli si nutrono di organismi strettamente, se non obbligatoriamente, associati a *Sargassum*. Altre prede sono rappresentate da meduse, briozoi, ctenofori, copepodi, cirripedi, granchi, gamberi e organismi presenti in superficie, come frammenti galleggianti di alghe e cianobatteri filamentosi, uova di

pesce, insetti morti, sia di habitat acquatici (coleotteri acquatici, ditiscidi e libellule) che di habitat terrestri (formiche, cavallette, afidi) (Witherington, 2002; Witherington et al., 2012).

I subadulti e gli adulti nella zona neritica si nutrono di un'ampia varietà di granchi, crostacei, gasteropodi, bivalvi e cnidari. In alcuni casi si possono nutrire anche di pesce scartato dai pescherecci, elemento della dieta che diventa sempre più frequente man mano che le altre specie di prede diminuiscono in abbondanza (Plotkin et al., 1993; Lazar et al., 2005; Seney e Musick, 2007).

## **CICLO RIPRODUTTIVO**

*C. caretta* trascorre quasi tutta la vita in mare, mostrando adattamenti, sia fisiologici che morfologici, specifici per la vita in questo ambiente (Hendrickson, 1980).

Soltanto le femmine adulte escono dall'acqua per nidificare su spiagge poco pendenti e sabbiose, insulari e continentali, delle regioni temperate e subtropicali di tutto il mondo. A queste spiagge manifestano quello che prende il nome di *Natal Beach Homing*. È dimostrato, infatti, che le femmine mostrano fedeltà alle spiagge in cui sono nate, ritornando a deporre le proprie uova in stagioni successive (Lohmann et al., 1997; Casale e Tucker, 2017).

Le femmine migrano per nidificare circa ogni secondo o quarto anno (NMFS e USFWS 2008). La nidificazione avviene solitamente in primavera e in estate, con variazioni in funzione della latitudine e delle caratteristiche geografiche della costa. Le femmine nidificano da una a sei volte durante una stessa stagione riproduttiva. Ogni evento di deposizione è distanziato dall'altro di circa 12-15 giorni e per ogni evento vengono depositate da 40 a 190 uova. Una sola femmina potrebbe quindi deporre un massimo di 560 uova a stagione (Dodd, 1988, NMFS e USFWS 2008). Negli intervalli tra una deposizione e l'altra, le femmine non si allontanano dalla spiaggia di nidificazione, ma rimangono nelle immediate vicinanze. Al momento della deposizione, scavano una buca, profonda almeno 50-60 cm. Terminata l'incubazione, che dura da 45 a 60 giorni in funzione della temperatura, i piccoli di tartaruga escono dalle uova. L'emersione dei piccoli dal nido avviene tendenzialmente di notte per evitare la disidratazione e per ridurre il rischio di predazione e, successivamente, si muovono verso la porzione più luminosa dell'orizzonte. In ambiente naturale questa è rappresentata dalla superficie del mare che riflette la luce della luna e delle stelle (Spotila, 2004).

Dopo aver lasciato la spiaggia di nidificazione, i piccoli si orientano perpendicolarmente alle onde. Esperimenti condotti in laboratorio hanno dimostrato che sono in grado di utilizzare il campo geomagnetico terrestre per i loro spostamenti (Lohman et al., 1997). Inizia così una fase di sviluppo pluriennale in acque neritiche profonde o in acque oceaniche (Bjorndal et al., 2000; Bolten e Witherington, 2003).

I dati che caratterizzano comportamento, alimentazione e habitat dei giovanili durante questo periodo di sviluppo sono ancora molto scarsi. Per questo la fase pelagica è stata definita *Lost years*. Alcuni studi hanno svelato che le tartarughe marine, dopo la schiusa e durante i primi anni di vita, sono fortemente associate alle comunità di *Sargassum*, che rappresenta infatti un nascondiglio sicuro dai predatori e un importante sito di foraggiamento (Witherington, 2002; Witherington et al., 2012). In generale, essendo più vulnerabili alla predazione rispetto agli adulti, le piccole tartarughe cercano aree a basso rischio dove i predatori sono meno abbondanti, come l'ambiente oceanico, o dove i predatori più grandi non possono raggiungerle, come acque meno profonde (Musick e Limpus, 1997).

Man mano che le tartarughe marine si accrescono, il loro habitat deve cambiare: i loro requisiti dietetici cambiano (Bjorndal, 1997) e aumenta la necessità di habitat diversificati, come corridoi migratori riproduttivi, aree di corteggiamento e accoppiamento, spiagge di nidificazione (Musick e Limpus, 1997).

Dopo 5-20 anni nella zona oceanica, durante i quali vengono acquisite buone capacità di nuoto, *C. caretta* recluta in aree di sviluppo neritiche ricche di prede bentoniche o di prede epipelagiche, dove si nutre e si accresce fino alla maturità (Avens e Snover, 2013). In generale, la pubertà viene raggiunta quando la lunghezza del carapace, misurata come CCL (*Curved Carapace Length*), è circa il 75% della CCL dell'adulto (Snover, 2002).

Durante i periodi di non riproduzione gli adulti risiedono in aree di alimentazione costiere che a volte coincidono con gli habitat di sviluppo giovanile (Bolten e Witherington, 2003), mentre durante i periodi di riproduzione intraprendono migrazioni riproduttive dalle aree di foraggiamento alle aree di nidificazione. Queste migrazioni sono effettuate sia dai maschi che dalle femmine e possono attraversare zone oceaniche che si estendono da centinaia fino a migliaia di chilometri (Plotkin, 2003; Witherington, 2017).

L'accoppiamento avviene lungo le rotte migratorie e solo occasionalmente vicino alle spiagge di nidificazione. Successivamente, i maschi ritornano direttamente nelle zone di foraggiamento,

mentre le femmine si spostano verso le spiagge di nidificazione e solo dopo aver concluso la fase di deposizione delle uova rientrano alle zone di alimentazione (Plotkin, 2003; Witherington, 2017).

In Figura 6 è riportato lo schema del ciclo riproduttivo di *C. caretta*.

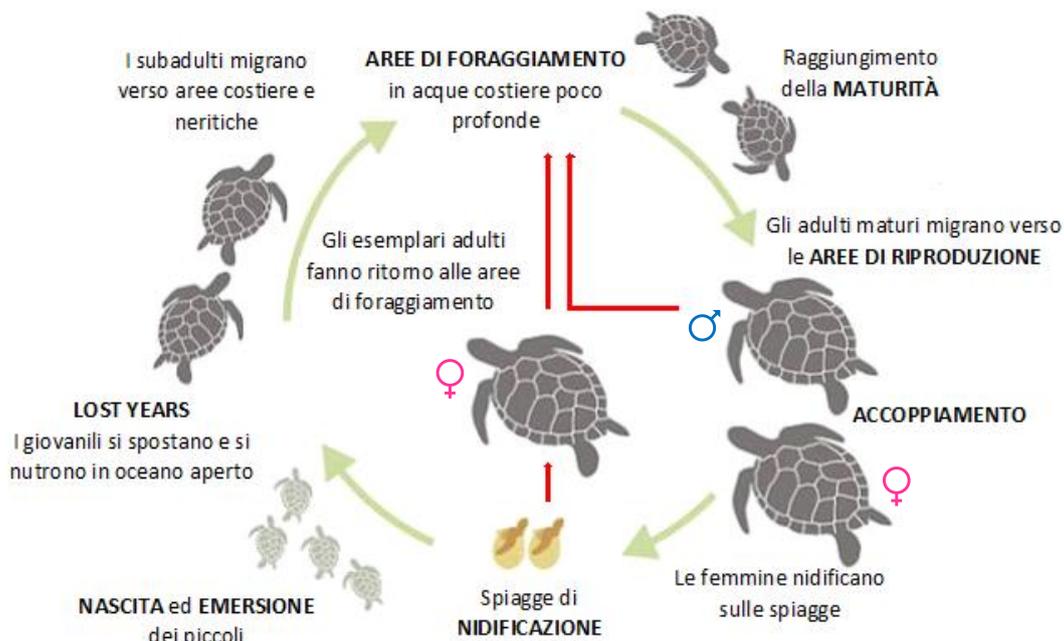


Figura 6 – Schema riproduttivo di *C. caretta*

## DETERMINAZIONE DEL SESSO

Fino a qualche decennio fa si presumeva che tutti i vertebrati avessero una determinazione del sesso geneticamente controllata. Tuttavia, nei rettili si verificano due tipologie fondamentali di determinazione del sesso: determinazione del sesso genotipico (GSD, *Genotypic Sex Determination*) e determinazione del sesso dipendente dalla temperatura (TSD, *Temperature-Dependent Sex Determination*) (Bull, 1980).

In *C. caretta* la temperatura è un fattore fondamentale nella differenziazione sessuale degli individui (Vogt e Bull, 1982). Charnov e Bull (1977) sostengono che il ritardo nella determinazione del sesso, che non si verifica infatti al momento del concepimento, consenta lo sviluppo del sesso che si adatterà meglio alle condizioni ambientali alla nascita: il 100% dei maschi viene prodotto a temperature più fresche (circa 27°C), il 100% delle femmine viene prodotto a temperature più calde (circa 31°C), mentre il rapporto 1:1 tra i sessi viene prodotto

a una temperatura tra i due estremi, designata come *Threshold Temperature* o *Pivotal Temperature* (circa 29°C) (Yntema e Mrosovsky, 1980; Yntema e Mrosovsky, 1982; Mrosovsky, 1988).

Fattori diversi dalla temperatura possono influenzare la determinazione del sesso, specialmente nell'intervallo di temperatura critica. Bull, Vogt e Bulmer (1982) suggeriscono infatti che esista un'influenza genetica.

Il sito di nidificazione influenza quindi la determinazione del sesso degli embrioni poiché influenza la temperatura alla quale si vengono a trovare le uova all'interno del nido. Ciò comporta variazioni sia temporali che spaziali (Standora e Spotila, 1985). Inoltre, poiché il sesso delle tartarughe dipende dalla temperatura ambientale, il rapporto tra i sessi dei piccoli (e successivamente degli adulti) può essere soggetto a variazioni semplicemente a causa dei cambiamenti climatici (Vogt e Bull, 1982).

## CENNI DI TOSSICOLOGIA DEI METALLI

Con il termine *Contaminazione ambientale* ci si riferisce a un'azione umana in grado di modificare le proprietà ambientali e/o la disponibilità e la qualità delle risorse di una determinata area in un determinato periodo di tempo (Bacci, 1993).

La tossicologia è lo studio degli effetti dei contaminanti sugli individui. Il termine ecotossicologia, invece, è comunemente usato per riferirsi allo studio degli effetti dei contaminanti sui livelli organizzativi al di sopra dell'individuo (popolazione, comunità ed ecosistema) (Selcer, 2006).

I contaminanti possono influenzare gli individui e le popolazioni in modo indiretto, andando ad alterare ad esempio la disponibilità delle risorse alimentari, la presenza di predatori e/o di competitori e la qualità dell'habitat in cui gli organismi vivono, provocando così un aumento dei livelli di stress. Tutte queste condizioni non ottimali si possono ripercuotere sia sulla sopravvivenza dell'organismo che sul suo successo riproduttivo: un aumento di stress e/o una diminuzione delle riserve energetiche possono ad esempio influenzare il tasso di crescita dell'organismo oppure interferire o inibire la riproduzione e influenzare l'età della prima riproduzione e la frequenza e la tempistica degli eventi riproduttivi successivi. Inoltre, la mancanza di risorse alimentari si può tradurre in una diminuzione della dimensione della prole e/o in una riduzione della qualità delle uova, comportando così una minor probabilità di sopravvivenza dei piccoli (Selcer, 2006).

I contaminanti che possono interferire in modo diretto con il sistema endocrino degli individui sono chiamati genericamente *Endocrine Disruptors*, in passato indicati con il termine *Environmental Estrogens* (Crisp et al., 1998).

Si tratta di composti che presentano una natura lipofila (Crisp et al., 1998), in grado quindi di accumularsi più facilmente nei tessuti adiposi e nel tuorlo, e che interferiscono con i recettori degli ormoni, interrompendo la comunicazione tra l'ormone e il suo mediatore proteico, oppure con le proteine che metabolizzano gli ormoni stessi (McLachlan, 2001).

Anche in questo caso gli effetti diretti dei contaminanti sugli organismi si possono suddividere in due gruppi: contaminanti che interferiscono con lo sviluppo embrionale, causando malformazioni embrionali che riducono la qualità di vita e la probabilità di sopravvivenza dei piccoli oppure influenzando la determinazione del sesso dei nascituri (Bergeron et al., 1994; Danzo, 1997), e contaminanti che interferiscono con la capacità riproduttiva dell'individuo. Gli

effetti di questi ultimi composti si osservano solo in tarda età, riguardano tutta la sfera riproduttiva degli organismi (fertilità, comportamento di accoppiamento, comportamenti basati sul sesso, comportamento dei genitori, numero di uova/piccoli prodotto per evento riproduttivo) e possono influenzare il successo dell'individuo e, conseguentemente, della popolazione (Selcer, 2006; Willingham, 2006).

Esistono inoltre dei contaminanti in grado di interagire con il sistema immunitario degli organismi (Keller et al., 2006). Il sistema immunitario dei vertebrati è un sistema complesso e intricato in grado di rilevare ed eliminare infezioni batteriche, virali, fungine e parassitarie, nonché cellule tumorali. Queste difese sono vitali per la salute e la sopravvivenza dei singoli individui e, se compromesse anche a causa di esposizioni a contaminanti ambientali, gli organismi possono diventare più vulnerabili a malattie debilitanti o mortali, con conseguente riduzione delle dimensioni delle popolazioni (Weeks et al., 2018; Keller et al., 2006).

Alcuni studi hanno evidenziato, per esempio, come l'esposizione al mercurio e ad altri metalli pesanti (Ag, Cd, Cr, Cu, Pb, Zn) possa determinare la soppressione delle funzioni immunitarie di *C. caretta* (Day, 2003; Heesemann et al., 2004; Peden-Adams et al., 2003).

# **METALLI PESANTI**

## **INTRODUZIONE AI METALLI PESANTI**

I metalli sono chimicamente definiti come elementi che conducono calore ed elettricità, sono malleabili e duttili, presentano una lucentezza metallica e hanno la capacità di perdere elettroni per formare ioni positivi. Un elemento che invece ha le proprietà e l'aspetto fisico di un metallo, ma che si comporta chimicamente come un non metallo è chiamato metalloide (Duffus, 2002).

Negli ultimi decenni, il termine *Heavy Metals* è stato utilizzato per indicare metalli e metalloidi associati a inquinamento e contaminazione ambientale, potenziale tossicità e/o ecotossicità ed effetti negativi sugli organismi (Duffus, 2002; Ali e Khan, 2018).

Chimicamente parlando, invece, si definiscono metalli pesanti quegli elementi chimici presenti in natura con un numero atomico ( $Z$ ) maggiore di 20 e una densità elementare maggiore di 5 g/cm<sup>3</sup>. Uno screening della tavola periodica fa rientrare in questa definizione almeno 51 elementi chimici (Ali e Khan, 2018).

## **METALLI PESANTI E AMBIENTE**

Tra gli inquinanti, i metalli svolgono un ruolo chiave nella contaminazione oceanica, in quanto sono molto stabili, non subiscono degrado e hanno la tendenza a entrare nella catena trofica (Haynes e Johnson, 2000; Storelli et al., 2005).

La contaminazione chimica da metalli pesanti può essere sia di natura globale (rilascio non puntuale) a causa dell'uso diffuso, della persistenza ambientale e del trasporto a lungo raggio di alcune sostanze chimiche, come il mercurio, oppure di natura più localizzata (rilascio da fonte puntuale) a causa dell'industria, dell'agricoltura, della gestione dei rifiuti o di altre attività umane. Infatti, le molteplici applicazioni industriali, domestiche, agricole, mediche e tecnologiche di questi elementi hanno portato alla loro ampia distribuzione in ambiente, sollevando così preoccupazioni sia per la salute umana che per lo stesso ambiente (Poppenga, 2017; Tchounwou et al., 2012).

In generale, la tossicità dei metalli pesanti dipende da diversi fattori, tra cui la concentrazione in ambiente, la modalità con cui avviene l'esposizione (in ambiente acquatico, gli organismi possono essere esposti a sostanze chimiche attraverso l'acqua, i sedimenti e occasionalmente anche l'aria), la durata dell'esposizione e la speciazione chimica in cui si trovano gli elementi,

nonché lo stadio di sviluppo, il sesso, la genetica e lo stato di nutrizione e di salute degli individui esposti. Inoltre, anche la qualità dell'acqua può influenzare la tossicità di metalli e metalloidi attraverso le interazioni di pH, durezza e salinità (Rand, 1995; Tchounwou et al., 2012).

Tra i metalli presenti in ambiente marino troviamo il Cadmio (Cd), il Cromo (Cr), il Rame (Cu), il Ferro (Fe), il Mercurio (Hg), il Manganese (Mn), il Nichel (Ni), il Piombo (Pb) e lo Zinco (Zn). Tra i metalloidi ritroviamo principalmente il Selenio (Se) e l'Arsenico (As) (Rand, 1995).

Questi elementi sono generalmente classificati come essenziali, necessari o tossici a seconda del loro ruolo biologico: gli elementi essenziali (es. Fe, Cu, Mn, Zn) sono necessari per varie funzioni biochimiche e fisiologiche dell'organismo; gli elementi necessari (es. Co, Cr, Ni, Se) hanno lo stesso ruolo degli elementi essenziali, ma un loro leggero aumento di concentrazione può farli diventare tossici; infine, gli elementi tossici (es. Hg, Pb, Cd, As) non hanno una funzione biologica stabilita, bensì hanno effetti deleteri, anche a basse concentrazioni, in quanto sono in grado di competere con i metalli essenziali nei siti di legame di importanti molecole biologiche (Uthus, 1992; Pérez-Granados e Vaquero, 2002; Walker et al., 2006; Tchounwou et al., 2012).

Sia i metalli che i metalloidi mostrano una tendenza a formare legami covalenti. Questa caratteristica ha due conseguenze tossicologiche per gli organismi. Per prima cosa, la capacità di legarsi a gruppi organici crea molecole lipofile. Questa proprietà aumenta la capacità dei metalli di attraversare le membrane cellulari e porta alla produzione di alcuni dei composti più tossici, come ad esempio il metilmercurio ( $\text{MeHg}^+$ ). In secondo luogo, questi elementi sono in grado di legarsi a costituenti non metallici delle molecole cellulari, causando anche in questo caso effetti tossici agli organismi (Walker et al., 2006).

A differenza degli inquinanti organici, i metalli che non sono presenti in complessi organometallici non sono biodegradabili e, di conseguenza, gli organismi non sono in grado di scomporli in forme meno tossiche ed eventualmente eliminarli. Le uniche opzioni attuabili per affrontare l'accumulo di metalli pesanti in corpo sono la conservazione a lungo termine o, se l'organismo ne possiede la capacità, l'escrezione (Rand, 1995).

## **METALLI PESANTI E IMPATTI SULLE TARTARUGHE MARINE**

Nel caso delle tartarughe marine esistono molti fattori che influenzano il grado di esposizione ai contaminanti. Tra questi, possiamo citare le attività umane localizzate, le rotte migratorie, le aree di foraggiamento e di nidificazione, la dieta e la fase vitale degli individui (Swarthout et al., 2010; Keller et al., 2012).

In generale, si ritiene che l'esposizione ai contaminanti sia ridotta per le tartarughe marine perché, da una parte, l'oceano aperto ha un effetto di diluizione sui contaminanti e, dall'altra, la maggior parte delle tartarughe marine consuma organismi che si trovano a livelli trofici relativamente bassi. Tuttavia, potenziali effetti sulla salute sono stati associati anche a bassi livelli di concentrazione di contaminanti, soprattutto in *C. caretta* (Keller et al., 2004a; Keller et al., 2004b).

La letteratura relativa agli impatti dei metalli pesanti su *C. caretta* è scarsa. La maggior parte degli studi si concentra principalmente sul verificare la presenza di metalli pesanti, sull'analizzare le loro concentrazioni negli organi e nei tessuti e sull'effettuare confronti tra i valori ottenuti con altre specie di tartaruga marina oppure con altre specie di vertebrati (es. mammiferi e uccelli marini). Altri studi esaminano invece le differenze di concentrazione esistenti tra individui di *C. caretta* che vivono in zone geografiche differenti. Lo scopo di molte di queste ricerche è quello di trovare e sviluppare una tecnica di monitoraggio dei metalli pesanti non invasiva e non letale per gli organismi.

In generale, i metalli pesanti possono essere accumulati in concentrazioni variabili nel fegato, nei reni, nel pancreas, nei muscoli, nel cervello, nell'epidermide e nei tessuti duri, come ossa e carapace (Sakai et al., 2000; Faust et al., 2014). Negli studi di Register et al. (2011), Storelli et al. (1998a), Maffucci et al. (2005) e Gardner et al. (2006) sono state esaminate le concentrazioni di alcuni metalli pesanti in vari tessuti: i risultati hanno mostrato significative correlazioni positive di Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, e Zn con le dimensioni corporee (massa corporea e lunghezza del carapace) delle tartarughe prese in analisi. Questo è spiegato dal fatto che questi metalli si accumulano con l'età degli organismi per i fenomeni di bioaccumulo, bioconcentrazione e biomagnificazione (Gray, 2002). Al contrario, correlazioni negative sono state osservate in particolari specie di tartaruga marina e per specifici elementi chimici negli studi di Sakai et al. (2000), Anan et al. (2001), Kampalath et al. (2006) e Faust et al. (2014) e sono state attribuite alle variazioni di dieta che avvengono durante il passaggio da giovanile ad adulto. Un altro fattore che potrebbe influire la correlazione tra l'età e le dimensioni corporee

degli esemplari con le concentrazioni dei metalli pesanti nei tessuti biologici è la regione geografica di appartenenza degli individui analizzati, mentre il sesso non sembrerebbe apportare nessuna influenza a tali correlazioni (Maffucci et al., 2005; Faust et al., 2014).

Inoltre, è stato osservato che alcuni elementi essenziali, come Cu, Fe, Mn e Zn, e un numero limitato di elementi tossici, come As, Cd, Hg e Pb, possono essere trasmessi dalla madre alle uova: in passato, alcuni studi si sono concentrati sulle modalità e sugli effetti del trasferimento di alcuni di questi metalli pesanti dalle femmine di *D. coriacea*, *C. mydas* ed *E. imbricata* alle loro uova. Purtroppo, le conseguenze negative di tale trasferimento sulla vitalità delle uova e dei piccoli sono ancora in gran parte sconosciute. Tuttavia, il trasferimento materno può potenzialmente abbassare le concentrazioni di contaminanti nelle femmine, svolgendo così una funzione protettiva: la deposizione delle uova potrebbe infatti fungere da significativo percorso di eliminazione per alcuni contaminanti. Allo stesso tempo, la presenza di alcuni metalli pesanti nelle uova può essere utilizzata dagli studiosi per valutare l'eventuale esposizione delle madri a tali elementi: questo è stato statisticamente verificato solo per Mn, Fe, As e Cu (Lam et al., 2006; Guirlet et al., 2008; Stewart et al., 2011; Ehsanpour et al., 2014).

L'**Arsenico** (As) è un contaminante ambientale molto diffuso che ha origine sia da fonti naturali (es. attività vulcanica) che da fonti antropogeniche (es. pesticidi, medicinali). Il suo ruolo nel sistema biologico è incerto e la maggior parte degli studi si è concentrata sulla sua tossicità. Le concentrazioni di As in acqua di mare e in acqua dolce sono simili. Tuttavia, gli organismi marini contengono As in concentrazioni più elevate rispetto agli organismi terrestri. Inoltre, la sua tossicità dipende dalla speciazione dell'elemento, con i sali di arsenico inorganici molto più tossici delle forme organiche, e dallo stato di valenza del metallo, con le forme trivalenti più tossiche delle forme pentavalenti. Nell'acqua di mare, la forma più predominante è l'arsenico pentavalente inorganico, sebbene siano presenti anche forme organiche metilate. Nelle tartarughe marine, questo metallo è stato riscontrato in vari tessuti nella forma di arsenobetaina e, in minor misura, nella forma di acido dimetilarsinico (DMA) (Saeki et al., 2000; Poppenga, 2017). La tossicità di questi due composti è risultata molto bassa. Ciò nonostante, lo studio di Okada e Yamanaka (1994) ha mostrato danni al DNA indotti da alcuni metaboliti del DMA.

Il **Selenio** (Se) è presente nei sistemi naturali come  $Se^{6+}$ ,  $Se^{4+}$ ,  $Se^{2+}$  e  $Se^0$ . La sua disponibilità e il suo potenziale tossico sono correlati alla sua forma chimica e, soprattutto, alla sua solubilità. Lo studio di Lam et al. (2006) ha mostrato che alte concentrazioni di Se nelle uova di *C. mydas* rappresentano un rischio considerevole per la sopravvivenza embrionale. La componente di

uovo in cui il Se è maggiormente presente risulta essere il tuorlo, seguito dal guscio e dall'albume e, in generale, le concentrazioni riscontrate risultano significativamente superiori rispetto a quelle di fegato e reni.

Il **Cadmio** (Cd) è un sottoprodotto dell'estrazione di Cu, Pb e Zn ed è presente anche nei fanghi industriali e nei fertilizzanti fosfatici. Si tratta di un elemento non essenziale ed è solo scarsamente escreto dalle tartarughe marine (Andreani et al., 2008). Studi sulle tartarughe d'acqua dolce hanno dimostrato che la più alta concentrazione di Cd si trova inizialmente nel fegato, importante sito di stoccaggio a breve termine per questo elemento (Thomas et al., 1994; Rie et al., 2001). Se l'esposizione a questo metallo persiste nel tempo, viene legato alla metallotioneina (MT), una proteina legante i metalli a basso peso molecolare implicata nella disintossicazione di sostanze tossiche e nell'omeostasi degli elementi essenziali, e trasportato attraverso il sangue come complesso Cd-MT alle cellule tubulari prossimali del rene, dove viene assorbito e concentrato (Linder e Grillitsch, 2000; Maffucci et al., 2005). Ciò può causare danni da stress ossidativo ai reni (Poppenga, 2017).

Il **Cromo** (Cr) è presente in natura sottoforma di stato ossidativo +2, +3 (il più stabile) e +6, mentre gli stati +4 e +5 sono relativamente rari. Il cromo esavalente è un potente ossidante e un noto cancerogeno, anche nell'uomo, che colpisce principalmente i sistemi respiratorio e riproduttivo. I lavori di Wise et al. (2014) e Speer et al. (2018) hanno evidenziato come il cromo esavalente induce in *E. imbricata* e *D. coriacea* livelli significativi di aberrazioni cromosomiche. Tale risultato solleva molte preoccupazioni per l'impatto di questo elemento sulla riproduzione e sullo sviluppo embrionale delle tartarughe marine: se la genotossicità dovesse verificarsi durante le fasi chiave della riproduzione o dell'embriogenesi, potrebbe infatti causare malformazioni o addirittura la mortalità degli embrioni (Wise et al., 2014; Speer et al., 2018).

**Rame** (Cu) e **Ferro** (Fe) svolgono un ruolo cruciale nel trasporto di ossigeno, nella produzione di energia e nell'attività enzimatica. Le loro proprietà redox possono però portare alla produzione di radicali liberi dell'ossigeno, principali responsabili dell'ossidazione di lipidi, proteine e DNA (Halliwell e Gutteridge, 1999; Gaetke e Chow, 2003). Per questo motivo, gli organismi devono regolare finemente i livelli di questi metalli per evitare effetti tossici: quando i livelli di Cu e Fe sono in eccesso, vengono immagazzinati nel fegato come Cu-MT e Fe-ferritina, entrambe forme non tossiche (Andreani et al., 2008). Per quanto riguarda invece le uova di tartarughe marine, le concentrazioni di Fe nel tuorlo risultano essere entrambe

significativamente superiori a quelle dell'albume e del guscio, mentre il Cu appare maggiormente presente nel guscio, seguito dal tuorlo e dall'albume (Lam et al., 2006).

Lo **Zinco** (Zn) è essenziale per la struttura e la funzione di molte proteine, inclusi più di 300 enzimi. Per questo motivo elevati livelli intracellulari di Zn vengono mantenuti mediante un efficiente controllo omeostatico da parte di proteine e trasportatori di membrana (Cousins et al., 2006). Secondo il lavoro di Lam et al. (2006), le concentrazioni di Zn nel tuorlo d'uovo risultano significativamente superiori a quelle dell'albume e del guscio. L'accumulo di Zn nel tessuto adiposo, invece, potrebbe essere associato alle proteine responsabili della pigmentazione verdastra dello strato lipidico sotto la pelle delle tartarughe (Andreani et al., 2008). Un altro possibile ruolo dello Zn nel tessuto adiposo potrebbe essere correlato alle sue proprietà antiossidanti che prevengono la perossidazione lipidica da parte dei radicali liberi contenenti ossigeno molecolare (Tapiero e Tew, 2003).

Il **Piombo** (Pb) è stato ampiamente utilizzato dagli esseri umani in quanto molto diffuso e facile da estrarre e da lavorare. Si tratta di un costituente naturale della crosta terrestre, ma è anche uno degli inquinanti più comuni in natura. Le principali conseguenze dell'esposizione al Pb per le tartarughe marine, e non solo, sono l'alterazione della funzionalità tiroidea e del tasso di sviluppo embrionale, con successive ripercussioni sul successo riproduttivo degli individui. Essendo un elemento persistente, le concentrazioni ambientali di Pb possono aumentare progressivamente nel tempo. Lo stesso succede nei tessuti biologici degli organismi che entrano in contatto con questo metallo. Guardando invece alle diverse frazioni di uovo di diverse specie di tartaruga marina (*L. olivacea*, *C. mydas* e *C. caretta*), le concentrazioni di Pb variano molto probabilmente in funzione della dieta e/o delle caratteristiche e dell'ubicazione delle aree di foraggiamento. In generale, si osservano percentuali maggiori a livello del tuorlo, seguito dal guscio e infine dall'albume (Paez-Osuna et al., 2010).

Il **Manganese** (Mn) gioca un ruolo chiave in un'ampia gamma di reazioni cellulari fondamentali per gli organismi. Concentrazioni elevate di Mn bloccano i canali del  $\text{Ca}^{2+}$ , andando a influenzare le trasmissioni neuromuscolari nei vertebrati (Yocom e Pecoraro, 1999). In merito al contenuto di Mn nelle componenti delle uova di *C. mydas*, invece, le concentrazioni si mostrano essere relativamente basse rispetto ai livelli registrati nel fegato e nei reni (Anan et al., 2001) e, nello specifico, la distribuzione percentuale di Mn nel tuorlo d'uovo risulta molto simile a quella del guscio d'uovo (Lam et al., 2006).

Il **Nichel** (Ni) viene utilizzato principalmente in varie leghe metalliche in quanto dona resistenza e buona conducibilità elettrica e termica. Si tratta di un elemento onnipresente in natura e che nelle uova di tartaruga marina è presente quasi interamente nel guscio d'uovo, con una quantità minore (2%) nel tuorlo e nessuna nell'albume (Lam et al., 2006).

Il **Mercurio** (Hg) è uno dei pochi elementi della tavola periodica (e l'unico metallo in assoluto) a essere liquido a temperatura ambiente. Si tratta di un contaminante altamente tossico e distribuito a livello globale (Driscoll et al., 2013). Lo ritroviamo principalmente negli ambienti acquatici e per questo motivo le catene alimentari acquatiche risultano essere le più colpite: in ambiente marino, il mercurio inorganico si trasforma in metilmercurio ( $\text{MeHg}^+$ ), composto caratterizzato da un'elevata capacità di bioaccumulo, e, nel momento in cui viene assorbito, viene demetilato e combinato con il selenio per formare un complesso persistente, ma non tossico, nei tessuti (Day et al., 2005). Nello studio di Day et al. (2007) si è osservato che concentrazioni di Hg più elevate nel sangue determinano una diminuzione del numero di linfociti circolanti. Questa evidenza porta a effetti immunosoppressivi, accompagnati da un aumento della suscettibilità agli agenti infettivi o alle cellule tumorali. In *C. caretta* l'esposizione al mercurio e ad altri metalli pesanti (Ag, Cd, Cr, Cu, Pb, Zn) può determinare la soppressione delle funzioni immunitarie ed è stata identificata come uno dei possibili fattori che contribuiscono allo sviluppo del fibropapilloma da infezione virale (FP). Questa malattia gravemente debilitante è caratterizzata da tumori, per lo più benigni, della pelle, dei tessuti perioculari, del carapace e del piastrone, nonché da tumori in tutti gli organi interni: queste masse tumorali possono andare a ostacolare gravemente la capacità dell'animale di nuotare, immergersi, localizzare, catturare e ingoiare il cibo e di evitare i predatori, rivelandosi così fatali (Balazs e Pooley, 1991; Day, 2003; Peden-Adams et al., 2003; Heesemann et al., 2004).

# MICROPLASTICHE

## INTRODUZIONE ALLE MICROPLASTICHE

Le materie plastiche sono polimeri organici sintetici che derivano dalla polimerizzazione di monomeri estratti da petrolio o gas. La loro domanda su scala annuale e a livello globale è aumentata negli ultimi anni in modo costante ed esponenziale. Essendo un materiale versatile, leggero, resistente ed economico, la plastica è ideale per un'enorme varietà di applicazioni, andando a sostituire in molti casi tutti quei materiali convenzionali, come vetro, metallo e carta (Andrady, 2011; Cole et al., 2011).

La plastica costituisce circa l'80-85% dei rifiuti marini (Tabella 3). Di questi, circa il 18% è attribuito all'industria della pesca e dell'acquacoltura, mentre il resto è derivato in gran parte da fonti terrestri (Andrady, 2003; Andrady, 2011).

Plastic Class		Specific Gravity	Percentage production*	Products and typical origin
Low-density polyethylene	LDPE LLDPE	0.91-0.93	21%	Plastic bags, six-pack rings, bottles, netting, drinking straws
High-density polyethylene	HDPE	0.94	17%	Milk and juice jugs
Polypropylene	PP	0.85-0.83	24%	Rope, bottle caps, netting
Polystyrene	PS	1.05	6%	Plastic utensils, food containers
Foamed Polystyrene				Floats, bait boxes, foam cups
Nylon	PA		<3%	Netting and traps
Thermoplastic Polyester	PET	1.37	7%	Plastic beverage bottles
Poly(vinyl chloride)	PVC	1.38	19%	Plastic film, bottles, cups
Cellulose Acetate	CA			Cigarette filters

\* Fraction of the global plastics production in 2007 after (Brien, 2007).

Tabella 3 – Principali classi di materiale plastico ritrovato in ambiente marino (Andrady, 2011)

Si parla di microplastiche quando ci si riferisce a particelle di plastica di dimensioni inferiori ai 5 mm, quindi difficilmente visibili a occhio nudo. Queste piccole particelle vengono prodotte da diverse attività antropiche, sia sulla terraferma che in mare aperto, e vengono rilasciate in ambiente principalmente a causa di inadeguate pratiche di gestione dei rifiuti o di perdite accidentali di materiale. Vengono trasportate e disperse negli oceani di tutto il mondo per mezzo di acque reflue domestiche e industriali, acque di scarico degli impianti di produzione e lavorazione, fiumi, vento, moto ondoso e correnti marine e possono essere ritrovate lungo le coste e le spiagge, nei sedimenti dei fondali marini, negli ambienti di acqua superficiale e profonda e persino nei ghiacci di Antartide e Artide (Tabella 4). La loro distribuzione nell'ambiente marino è influenzata dalla densità delle particelle, dalla localizzazione delle sorgenti e dalla tipologia di trasporto (Andrady, 2011; Cole et al., 2011; IMO, 2015; Auta et al., 2017).

Marine environment	Distribution (%)	Concentration	Reference
North East Atlantic Ocean	89	2.46 particles m <sup>-3</sup>	Lusher et al. (2014)
Arctic Polar Waters	95	0–1.31 particles m <sup>-3</sup>	Lusher et al. (2015a,b)
Laurentian Great Lake	20	43,000 particles km <sup>-2</sup> to 466,000 partides km <sup>-2</sup>	Eriksen et al. (2013)
Jade Bay, Southern North Sea	70	1770 particles L <sup>-1</sup>	Dubaish and Liebezeit (2013)
Northwestern Atlantic	60	2500 particles km <sup>-2</sup>	Law et al. (2010)
Portuguese Coast	53	332–362 itemsm <sup>-2</sup>	Antunes et al. (2013)
Mediterranean Sea	74	0.90 ± 0.10 microplastics g <sup>-1</sup>	Alomar et al. (2016)
Yangtze Estuary and East China Sea	90	0–144 particles m <sup>-3</sup>	Zhao et al. (2014)
Beaches of Guanabara Bay, Southeast Brazil	56	12–1300 particles m <sup>-2</sup>	Carvalho and Baptista Neto (2016)
Swedish Coast	–	150–2400 particles m <sup>-3</sup> to 68,000–102,000 partides m <sup>-3</sup>	Lönnstedt and Eklöv (2016)
Chinese Bohai Sea	–	63–201 items kg <sup>-1</sup>	Yu et al. (2016)

Tabella 4 – Distribuzione (%) e concentrazioni delle microplastiche nell'ambiente marino (Auta et al., 2017)

Possiamo distinguere le microplastiche in due categorie, entrambe presenti negli ecosistemi marini ad alte concentrazioni: le microplastiche primarie, che presentano dimensioni microscopiche e vengono prodotte appositamente per particolari applicazioni industriali o domestiche (sono presenti ad esempio in creme solari, dentifrici, deodoranti, creme esfolianti, creme da barba, smalti per unghie, repellenti per insetti e indumenti sintetici), e le microplastiche secondarie, che derivano dalla frammentazione di detriti di plastica di maggiori dimensioni, presenti in mare o sulla terraferma, a causa dell'esposizione a diverse temperature e alle radiazioni ultraviolette del sole o a causa dell'abrasione meccanica dovuta ad esempio al moto ondoso (Andrady, 2011; Cole et al., 2011; IMO, 2015; Auta et al., 2017).

## MICROPLASTICHE E AMBIENTE

Dagli anni '40 la produzione di plastica e microplastica ha seguito un aumento esponenziale, così come la loro presenza in ambiente (Barnes et al., 2009; Auta et al., 2017).

I rifiuti di plastica sono presenti negli ecosistemi marini di tutto il mondo. Spinti dal vento, dal moto ondoso e dalle correnti oceaniche, i detriti possono essere trasportati a grandi distanze in luoghi remoti, altrimenti incontaminati, compresi i poli e le profondità oceaniche. Tuttavia, mentre i rifiuti di plastica possono essere trovati in tutto l'ambiente marino, la loro distribuzione è eterogenea: infatti, in funzione del tempo di esposizione agli agenti ambientali e della composizione, densità e forma dei monomeri e polimeri che li costituiscono, i materiali plastici possono galleggiare, affondare oppure possono essere neutrali con l'acqua marina (Barnes et al., 2009; Cole et al., 2011).

Con l'aumento dell'abbondanza di microplastiche in ambiente marino aumenta anche la loro biodisponibilità. Le piccole dimensioni le rendono facilmente disponibili per l'ingestione accidentale da parte di un'ampia gamma di organismi, trasferendosi così nella catena alimentare e accumulandosi in organi e tessuti. Ciò rappresenta un grande rischio per la salute. È stato

infatti osservato che l'ingestione di queste minuscole particelle di plastica può ostacolare o bloccare del tutto il passaggio del cibo attraverso il tratto intestinale e causare una condizione di falsa sazietà, con conseguente diminuzione dell'assunzione di cibo, riduzione del tasso di crescita e aumento dei livelli di stress, rendendo gli organismi più vulnerabili a malattie e predazione (Fossi et al., 2016; Nelms et al., 2016; Sutton et al., 2016; Auta et al., 2017).

Una particolare rilevanza va data anche ai cosiddetti additivi che possono essere incorporati durante la produzione dei materiali plastici con lo scopo di modificarne le proprietà o prolungarne la vita, fornendo resistenza al calore, al danno ossidativo e alla degradazione microbica. Queste sostanze rappresentano un importante problema ambientale poiché prolungano i tempi di degradazione della plastica e possono interferire con importanti processi biologici, determinando potenziali alterazioni del sistema endocrino degli organismi (possono imitare, competere o interrompere la sintesi degli ormoni endogeni) che a sua volta può avere un impatto su mobilità, riproduzione, sviluppo, risposta immunitaria e cancerogenesi (Barnes et al., 2009; Andrady, 2011; Cole et al., 2011; Reisser et al., 2014; Sutton et al., 2016; Fossi et al., 2016; Auta et al., 2017).

Le microplastiche possono inoltre fungere da veicoli per il trasporto di agenti patogeni: i detriti plastici presenti in acqua sono suscettibili alla contaminazione da parte di una serie di inquinanti marini, inclusi metalli pesanti, interferenti endocrini e inquinanti organici persistenti (POPs) e, una volta ingeriti, possono trasferire tutte queste sostanze nella catena alimentare (Reisser et al., 2014).

Per tutti questi motivi l'inquinamento da microplastiche è considerato un notevole problema sia dal punto di vista ambientale e sanitario, che dal punto di vista economico. Le possibili misure di gestione di questa problematica sono ancora oggi difficili da mettere in atto, ma per prevenire e ridurre l'ingresso di microplastiche in ambiente è necessario innanzitutto identificare le fonti di produzione e immissione in ambiente di plastica e microplastica e creare consapevolezza pubblica attraverso l'istruzione, anche a livello governativo. Inoltre, strategie di mitigazione efficaci sono rappresentate dalla tempestiva rimozione dalle spiagge dei detriti di plastica più grandi, prima che questi siano esposti agli agenti atmosferici, e quindi degradati e frammentati, e dall'impiego di batteri in grado di degradare i polimeri per mezzo del processo chiamato biodegradazione (Andrady, 2011; Auta et al., 2017).

## MICROPLASTICHE E IMPATTI SULLE TARTARUGHE MARINE

L'ingestione di detriti plastici da parte delle tartarughe marine risulta essere un fenomeno globale di portata e pericolosità crescente (Schuyler et al., 2013). L'ingestione di piccole quantità di plastica può causare infatti l'ostruzione intestinale dell'animale, fino a determinarne la morte (Bjorndal et al. 1994).

Molti studi sull'ingestione di plastica da parte di *C. caretta* e delle altre specie di tartaruga marina hanno descritto le caratteristiche fisiche degli oggetti ingeriti, come colore, forma, dimensione e tipologia, che, insieme alla descrizione delle caratteristiche chimiche dei detriti, permettono di comprendere le fonti e le modalità di immissione in ambiente di questi materiali. Tutte queste informazioni possono aiutare a stabilire e organizzare i piani di gestione e mitigazione di questa importante problematica (Jung et al. 2018; Di Renzo et al., 2021).

Altre ricerche cercano di comprendere come mai l'inquinamento da microplastiche colpisce questi organismi e se esistono fattori che lo favoriscono in una specie piuttosto che in un'altra. Secondo lo studio di Schuyler et al. (2013) la preferenza alimentare può influenzare la probabilità di ingestione di plastiche da parte delle tartarughe: le specie erbivore (*Chelonia mydas*), gelatinivore (*Dermochelys coriacea*) e onnivore (*Eretmochelys imbricata*) sembrano esserne più suscettibili rispetto alle specie carnivore (*Caretta caretta* e *Lepidochelys kempii*) a causa dell'elevata somiglianza della plastica morbida, come i sacchetti, con le loro prede e della loro ridotta selettività nella scelta delle prede, nonché della sovrapposizione delle zone di alimentazione con le aree maggiormente soggette ad accumulo di rifiuti antropici.

Queste differenze possono anche essere attribuite alla biologia degli animali e al modo in cui i loro sistemi digestivi affrontano i detriti una volta ingeriti: gli individui adulti e subadulti di *Caretta caretta* presentano un tratto digestivo di diametro maggiore rispetto gli adulti e subadulti di *Chelonia mydas*, facilitando maggiormente il passaggio e l'eliminazione dei materiali ingeriti. Inoltre, specie diverse possono presentare diversi enzimi e/o microflora intestinale che agiscono in modo differente sulle sostanze ingerite (Bjorndal, 1997; Di Renzo et al., 2011).

Altri studi ancora sono andati ad analizzare la presenza di microplastiche nei siti di nidificazione di *C. caretta*. I lavori di Beckwith e Fuentes (2018), Duncan et al. (2018) e Novillo-Sanjuan et al. (2022) hanno verificato e accertato la presenza, più o meno notevole, di microplastiche lungo le più importanti spiagge di nidificazione di *C. caretta* nel Golfo del Messico e nel Mar

Mediterraneo orientale e occidentale, evidenziando la potenziale minaccia di questi rifiuti antropici sull'ecologia di queste tartarughe. Elevate quantità di microplastiche nella sabbia possono infatti portare a un aumento della temperatura complessiva del sedimento in quanto la plastica presenta un calore specifico diverso rispetto a quest'ultimo (Andrady, 2011; Nelms et al., 2016; Beckwith e Fuentes, 2018). Questo determinerebbe la femminilizzazione degli embrioni e, in casi estremi, inciderebbe sulla loro forma fisica o addirittura sulla loro sopravvivenza (Nelms et al., 2016). Inoltre, il potenziale aumento delle temperature di incubazione dovuto alle microplastiche peggiorerebbe l'alterazione del rapporto tra i sessi che già si starebbe verificando a causa del cambiamento climatico (Nelms et al., 2016). Al contrario, nello studio di Carson et al. (2011) le analisi effettuate hanno evidenziato che la presenza di detriti di plastica porta a una riduzione dell'assorbimento di calore del substrato e quindi a una diminuzione delle temperature massime rispetto al sedimento senza plastiche. Questo fenomeno potrebbe quindi causare la mascolinizzazione degli embrioni di *C. caretta*. Inoltre, in questo studio, si è osservata un'alterazione della permeabilità del sedimento che causerebbe di conseguenza un'alterazione dell'idratazione delle uova, con conseguenze, anche gravi, sullo sviluppo e sulla sopravvivenza embrionale.

Oltre a tutte queste conseguenze, la maggior parte delle materie plastiche disponibili in commercio contengono additivi, sostanze chimiche nocive con attività estrogenica: un'elevata quantità di estrogeni ha il potenziale di alterare lo sviluppo riproduttivo e la fertilità degli individui e delle popolazioni di *C. caretta* e di influenzare indirettamente lo sviluppo dell'embrione, il periodo di incubazione, il rapporto tra i sessi e, di conseguenza, il successo di schiusa (Bergeron et al., 1994; Nelms et al., 2016).

Su queste basi, gli studiosi si sono successivamente posti la problematica di stimare e analizzare la presenza di microplastiche all'interno delle uova. Ne è un esempio lampante il lavoro di Savoca et al. (2021), in cui si è effettuata una valutazione completa della contaminazione dell'uovo considerando, per la prima volta, la presenza di microplastiche e ftalati (composti chimici usati nell'industria delle materie plastiche come agenti plastificanti per migliorare la flessibilità e la modellabilità dei polimeri) in tutti e tre i componenti: il tuorlo, l'albume e il guscio. L'origine della presenza di queste sostanze all'interno delle componenti dell'uovo di *C. caretta* risiede, secondo questo studio, nel trasferimento materno e i risultati ottenuti hanno evidenziato che la loro presenza nelle uova potrebbe compromettere lo stato di conservazione della specie.

## SCOPO DELLA TESI

Sulla base delle informazioni fino ad ora raccolte, sapendo che *C. caretta* rientra nella lista delle specie minacciate a livello mondiale della IUCN e per questo protetta dal punto di vista legislativo, conoscendo gli impatti negativi, diretti e indiretti, che l'uomo ha sulla sopravvivenza e sul successo riproduttivo di questa specie e avendo ben presente che la contaminazione da metalli pesanti e l'inquinamento da microplastiche sono attualmente uno dei principali problemi ambientali a livello globale, si è voluto esaminare il potenziale impatto di questi due fattori sull'efficienza di schiusa di *C. caretta*.

Scopo di questo lavoro di tesi è quindi quello di verificare i livelli di esposizione delle uova di tartaruga marina *C. caretta* a metalli pesanti e microplastiche, esposizione che avviene tramite l'ambiente in cui le stesse uova vengono depositate, e di valutare la possibile correlazione tra questi livelli di esposizione e il successo riproduttivo della specie.

Per fare ciò sono stati presi in analisi alcuni nidi rinvenuti durante la stagione di deposizione 2021 lungo le coste ioniche della provincia di Catanzaro. Per ciascuno di questi nidi sono stati raccolti dei campioni di sabbia per l'analisi della presenza di microplastiche all'interno della camera di incubazione e dei campioni di uova (uova non schiuse e gusci di uova schiuse) per verificare la concentrazione di metalli pesanti e valutare il loro impatto sul successo riproduttivo degli individui che trovano nelle coste calabresi un'importante area di nidificazione.

# MATERIALI E METODI

## AREA DI CAMPIONAMENTO

Per effettuare i campionamenti di sabbia e di uova analizzati in questo studio si sono presi in considerazione i nidi di *C. caretta* ritrovati a seguito di attività di monitoraggio lungo la costa catanzarese nell'estate 2021 (Figura 7). Si tratta di una porzione di costa lunga 25 km circa, situata al centro del bacino mediterraneo. È contraddistinta da spiagge prevalentemente sabbiose e a basso gradiente e caratterizzate dalla presenza di piccoli corsi d'acqua. I tratti più meridionali presentano una striscia di ghiaia a livello della battigia che, spostandosi verso nord, si assottiglia sempre più, fino a sparire completamente. Durante il periodo estivo le spiagge risultano particolarmente interessate dalla presenza umana. Troviamo infatti svariati stabilimenti balneari, strutture alberghiere, camping, ristoranti e locali e alcune rimesse di piccole imbarcazioni da pesca e di moto d'acqua e simili.

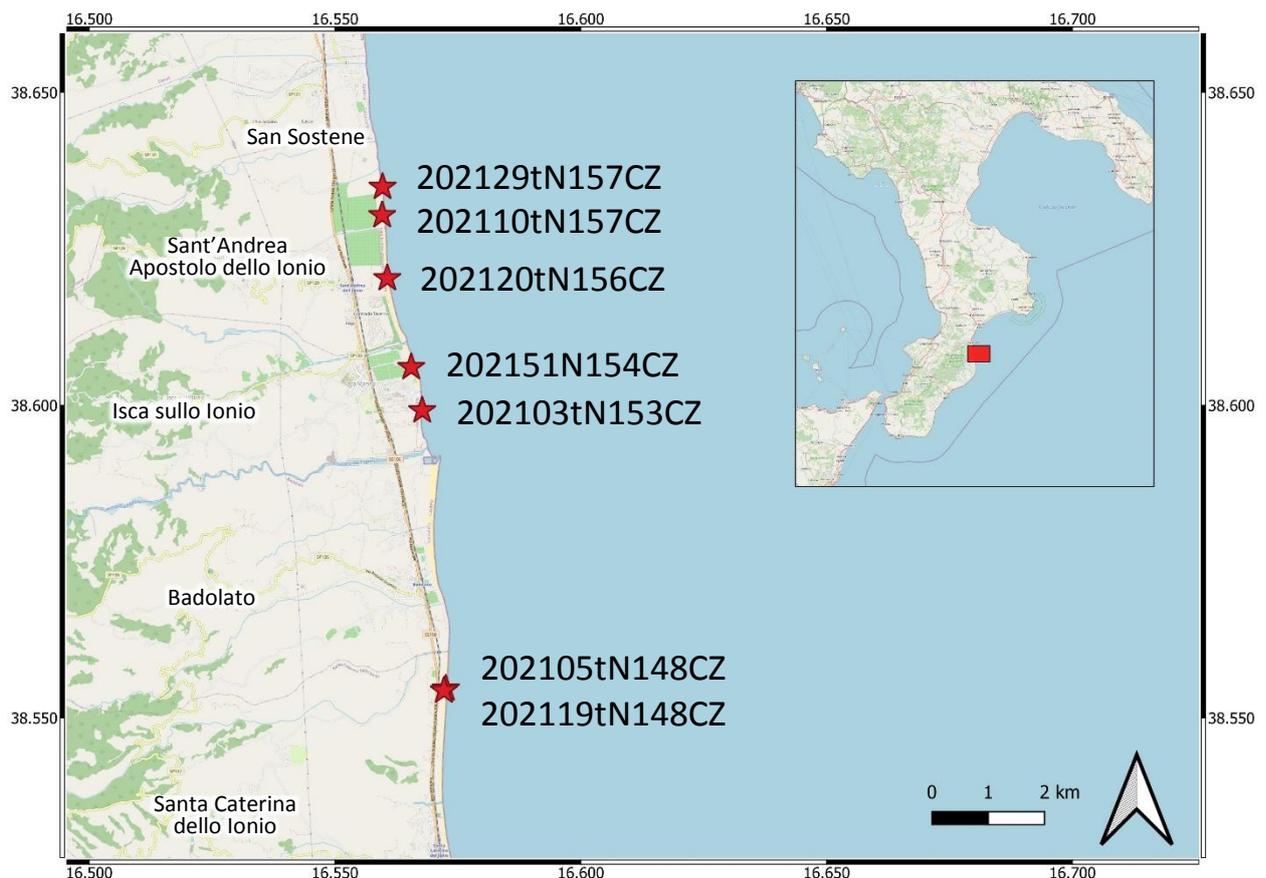


Figura 7 – Area di campionamento ottenuta tramite QGis e riportante i nidi analizzati in questo studio

## INFORMAZIONI RELATIVE AI NIDI

In totale, i nidi presi in considerazione in questo lavoro sono sette e sono stati soggetti ad attività di monitoraggio e protezione da parte dei volontari di CESRAM (Centro Studi e Ricerca Ambiente Marino) e di WWF Calabria nell'ambito del progetto TartAmar Calabria. Di seguito sono riportati i codici identificativi di ciascun nido (Tabella 5).

Codice identificativo record				
Anno	Nr. Progressivo anno	Tipo evento	Ukc	Provincia
2021	03	tN	153,7	CZ
2021	05	tN	148,7	CZ
2021	10	tN	157,5	CZ
2021	19	tN	148,7	CZ
2021	20	tN	156,3	CZ
2021	29	tN	157,9	CZ
2021	51	N	154,6	CZ

Tabella 5 – Codici identificativi dei nidi analizzati

I nidi sono stati rinvenuti grazie a una regolare e costante attività di monitoraggio delle spiagge catanzaresi, dal comune di Satriano Marina fino al comune di Guardavalle Marina, svolta da metà giugno fino a metà agosto 2021. In Tabella 6 sono riportati i riferimenti geografici di rinvenimento dei nidi presi in analisi.

Codice ID	Riferimenti geografici di rinvenimento			
	Comune	Toponimo	Lat N	Long E
202103tN153CZ	Isca sullo Ionio	Ferrobara	38°35'57.0"	16°34'03.7"
202105tN148CZ	Santa Caterina Ionio	Cappari	38°33'16.8"	16°34'21.0"
202110tN157CZ	S. Andrea Apostolo dello Ionio	Fondaco	38°37'49.36"	16°33'34.41"
202119tN148CZ	Santa Caterina Ionio	Cappari	38°33'15.61"	16°34'19.61"
202120tN156CZ	S. Andrea Apostolo dello Ionio	S. Andrea dello Ionio M.na	38°37'13.09"	16°33'38.15"
202129tN157CZ	S. Andrea Apostolo dello Ionio	Fondaco	38°38'5.61"	16°33'34.67"
202151N154CZ	Isca sullo Ionio	Isca Marina	38°36'21.9"	16°33'55.7"

Tabella 6 – Dati geografici di rinvenimento dei nidi analizzati

In funzione della data di rinvenimento e delle condizioni fisiche in cui sono state ritrovate le tracce di emersione e di nidificazione si è potuta ipotizzare la data di deposizione per ogni nido (Tabella 7).

Codice ID	Rinvenimento	Deposizione	
	Data rinvenimento	Data di deposizione	Margine di errore in giorni
202103tN153CZ	23/06/2021	23/06/2021	0
202105tN148CZ	26/06/2021	26/06/2021	0
202110tN157CZ	03/07/2021	03/07/2021	0
202119tN148CZ	12/07/2021	12/07/2021	0
202120tN156CZ	13/07/2021	13/07/2021	0
202129tN157CZ	24/07/2021	23/07/2021	1
202151N154CZ	28/08/2021	-	-

Tabella 7 – Dati di rinvenimento e di deposizione dei nidi analizzati

Per alcuni nidi è stato necessario effettuare una traslocazione in luogo più sicuro (Tabella 8): la motivazione che ha reso necessaria questa procedura è la troppa vicinanza al mare della camera di incubazione e la presenza di attività antropiche che avrebbero potuto interferire, anche in modo molto grave, sull'efficienza di schiusa, come ad esempio la presenza di fonti di luce artificiale, la presenza di stabilimenti balneari, il passaggio di mezzi meccanici sulla spiaggia e la vicinanza a rimesse di piccole imbarcazioni da pesca (Mo et al., 2013).

Codice ID	Traslocazione
	Data traslocazione
202103tN153CZ	23/06/2021
202105tN148CZ	26/06/2021
202110tN157CZ	03/07/2021
202119tN148CZ	-
202120tN156CZ	13/07/2021
202129tN157CZ	24/07/2021
202151N154CZ	-

Tabella 8 – Dati di traslocazione dei nidi analizzati

I tempi di schiusa si sono differenziati tra i diversi nidi, andando da un minimo di 3 giorni fino a massimo di 8 giorni (Tabella 9).

Codice ID	Hatchling		
	Data inizio schiusa	Data fine schiusa	$\Delta t$
202103tN153CZ	21/08/2021	26/08/2021	6
202105tN148CZ	10/08/2021	15/08/2021	6
202110tN157CZ	25/08/2021	01/09/2021	8
202119tN148CZ	29/08/2021	31/08/2021	3
202120tN156CZ	17/09/2021	20/09/2021	4
202129tN157CZ	07/10/2021	09/10/2021	3
202151N154CZ	28/08/2021	31/08/2021	4

Tabella 9 – Dati di schiusa dei nidi analizzati

Infine, l'ispezione dei nidi, e conseguentemente la raccolta dei campioni analizzati in questo studio, è stata effettuata almeno 3 notti dopo l'ultima emersione, come raccomandato dalle linee guida di Ispra e del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (Mo et al., 2013) (Tabella 10).

Codice ID	Digging	
	Data digging	Nr. giorni dall'ultima emersione
202103tN153CZ	01/09/2021	6
202105tN148CZ	19/08/2021	4
202110tN157CZ	05/09/2021	4
202119tN148CZ	05/09/2021	5
202120tN156CZ	03/10/2021	13
202129tN157CZ	18/10/2021	9
202151N154CZ	08/09/2021	8

Tabella 10 – Dati di scavo e controllo dei nidi analizzati

In Tabella 11 e 12 sono riportati i principali dati di interesse relativi alle dimensioni della covata e al successo di nidificazione dei nidi presi in analisi, calcolato come percentuale del rapporto tra il numero di uova schiuse recuperate al termine delle operazioni di ispezione dei nidi e il numero totale di uova conteggiate durante le operazioni di traslocazione o al termine delle operazioni di digging per quanto riguarda i due nidi non sottoposti a traslocazione.

Codice ID	Dimensioni covata						
	Nr. uova deposte	Nr. uova schiuse	Nr. uova non schiuse	Nr. uova danneggiate	Nr. piccoli spontaneamente emersi	Nr. piccoli recuperati vivi nel nido	Nr. piccoli trovati morti nel nido
202103tN153CZ	63	24	32	3	24	0	0
202105tN148CZ	125	113	10	2	110	0	3
202110tN157CZ	100	90	6	4	86	4	0
202119tN148CZ	95	70	23	0	69	1	0
202120tN156CZ	83	63	10	9	63	0	0
202129tN157CZ	61	57	4	0	56	1	0
202151N154CZ	93	89	4	0	89	0	0
	620	506	89	18	497	6	3

Tabella 11 – Dati relativi alle dimensioni della covata dei nidi analizzati

Codice ID	Successo di nidificazione
	Successo di schiusa in %
202103tN153CZ	38.10
202105tN148CZ	90.40
202110tN157CZ	86.54
202119tN148CZ	73.68
202120tN156CZ	75.90
202129tN157CZ	93.44
202151N154CZ	95.70
	79.11

Tabella 12 – Dati relativi al successo di nidificazione (%) dei nidi presi in analisi

## METODOLOGIA DI CAMPIONAMENTO

I campioni analizzati in questo studio sono stati prelevati durante la fase di ispezione di ciascun nido. Tutte le operazioni sono state eseguite da personale formato e autorizzato dal MATTM (Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare ridenominato nel 2021 Ministero della Transizione Ecologica), seguendo le indicazioni di ISPRA (Mo et al., 2013) e sotto la supervisione scientifica del Professor Antonio Mingozi ([antonio.mingozi@unical.it](mailto:antonio.mingozi@unical.it), Professore associato in Zoologia al Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra dell’Università della Calabria).

I campionamenti di sabbia sono stati effettuati per ciascun nido a metà della profondità della camera di incubazione delle uova (circa 40-45 cm di profondità dalla superficie) e successivamente conservati all’interno di vasetti di vetro muniti di tappi in alluminio per ridurre al minimo la contaminazione da plastiche ed etichettati con il codice identificativo relativo al nido di appartenenza.

Per ogni nido, inoltre, sono stati raccolti campioni di uova schiuse, per un massimo di 10 gusci per nido, e di uova non schiuse, per un massimo di 5 uova per nido. Il materiale è stato conservato all’interno di sacchetti, anch’essi etichettati con il relativo codice identificativo (Tabella 13). Tutti i campioni sono stati conservati in congelatore, a una temperatura di -21°C, fino alla loro analisi in laboratorio.

Codice ID	Campioni	
	Nr. Uova schiuse	Nr. Uova non schiuse
202103tN153CZ	10	5
202105tN148CZ	10	5
202110tN157CZ	10	3
202119tN148CZ	10	5
202120tN156CZ	7	4
202129tN157CZ	10	2
202151N154CZ	10	2
	67	26

Tabella 13 – Dati relativi alle dimensioni dei campioni analizzati

## PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

### METALLI

**Uova** – I campioni sono stati pesati e successivamente le componenti dell'uovo sono state separate. In alcuni casi, però, non è stato possibile distinguere, e di conseguenza isolare, l'albume dal tuorlo. Le singole frazioni sono state pulite da residui e granelli di sabbia utilizzando un pennellino, con particolare attenzione per quanto riguarda i gusci, e pesate. Da ciascuna di esse si è andati a prelevare 0,7 g circa e i campioni così ottenuti sono stati conservati in provette da 10 ml, a cui sono stati aggiunti 2 ml di acido nitrico (HNO<sub>3</sub>).

**Gusci** – I campioni sono stati pesati, puliti da residui e granelli di sabbia mediante un pennellino e conservati in provette da 10 ml, a cui sono stati aggiunti 2 ml di HNO<sub>3</sub>.

Tutti i campioni sono stati trasferiti all'interno dei vessel di teflon con altri 3 ml di HNO<sub>3</sub> per poter essere mineralizzati attraverso l'utilizzo del microonde Ethos-One Advanced Microwave Digestion System (Tabella 14).

Closed Vessel Microwave Digestion System			
Programma	Reagente	Temperatura max	Tempo
ANIMAL TISSUE	5 ml HNO <sub>3</sub>	200°C	45 min

Tabella 14 – Programma utilizzato per la mineralizzazione dei campioni

Dopo il raffreddamento, i campioni sono stati trasferiti e conservati in provette Falcon e portati a volume di 50 ml con acqua distillata.

### MICROPLASTICHE

Gli studi precedenti hanno sviluppato e testato diversi metodi per poter estrarre microplastiche dai sedimenti costieri. Il metodo più comunemente implementato e utilizzato è quello che prevede la separazione delle particelle di microplastiche dal sedimento in funzione della densità (Claessens et al., 2013).

Una soluzione satura di cloruro di sodio (NaCl) viene spesso utilizzata come soluzione di estrazione economica, come testato da Claessens et al. (2013), ma si traduce in un minor successo. Lo stesso studio ha registrato una resa maggiore utilizzando una soluzione di ioduro di sodio (NaI), ma la soluzione richiede estrazioni ripetute multiple per ottenere una resa

complessiva più elevata (Claessens et al., 2013). Il cloruro di zinco ( $ZnCl_2$ ) è più costoso, ma ha dimostrato di produrre risultati ottimali senza la necessità di estrazioni ripetute (Coppock et al., 2017). Questo lavoro di tesi segue quindi i metodi di laboratorio di Coppock et al. (2017).

Per preparare la soluzione di  $ZnCl_2$ , 972 g di  $ZnCl_2$  sono stati aggiunti a 1 l di acqua ultrapura in un becher di vetro da 3 l. Il peso di  $ZnCl_2$  è stato determinato da Coppock et al. (2017) come quantità raccomandata per estrarre microplastiche da campioni di sedimento con un intervallo di peso di 30-50 g. La miscela è stata agitata fino a quando il sale non si è completamente sciolto in soluzione e successivamente filtrata utilizzando filtri in quarzo 0,43 mm (Sartorius AG, Germany).

Seguendo Coppock et al. (2017), è stata costruita un'unità *SMI* (Sediment-Microplastic Isolation) (Figura 8) utilizzando tubazioni in PVC trasparente e una valvola a sfera fissata su una piastra in PVC per fornire supporto.

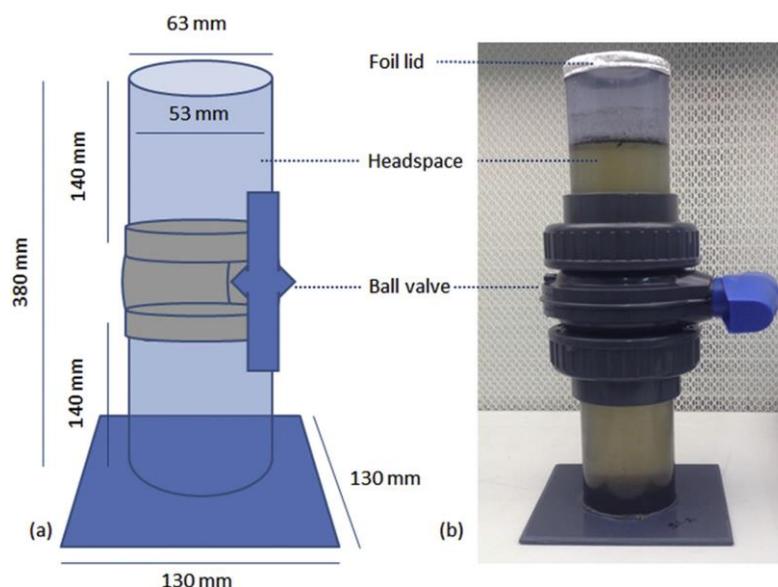


Figura 8 – Schema unità *SMI* (Coppock et al, 2017)

Tutti i componenti delle unità sono stati accuratamente risciacquati con acqua ultrapura prima dell'assemblaggio. Dopo l'assemblaggio, si è andati a versare 700 ml di  $ZnCl_2$  e si è andati ad aprire e chiudere più volte la valvola. L'unità è stata lasciata a valvola aperta per 5 minuti per consentire a eventuali residui di derivazione esterna di galleggiare in superficie e successivamente si è andati a filtrare la soluzione utilizzando filtri di quarzo. Questi passaggi sono stati ripetuti prima di ogni estrazione.

Durante l'estrazione vera e propria, all'interno delle unità a valvola aperta si è andati ad aggiungere, nell'ordine, il campione di sabbia (50 g peso secco), una spoletta magnetica e 700

ml di  $ZnCl_2$ . È stata utilizzata una piastra di agitazione magnetica per mescolare il sedimento per 5 minuti, quindi il sedimento è stato lasciato depositare per 5 minuti, seguito da 3 brevi impulsi di agitazione per consentire la fuoriuscita di eventuali bolle d'aria intrappolate nel campione. L'unità è stata lasciata riposare fino a quando il surnatante non è risultato trasparente, completamente ripulito dal sedimento (circa 30 minuti).

Successivamente, la valvola è stata chiusa con attenzione e il surnatante presente al di sopra della valvola è stato filtrato su filtri in quarzo, successivamente trasferiti in piastre Petri in attesa dell'osservazione al microscopio.

Tutti i passaggi precedenti sono stati effettuati a unità coperte da un foglio di alluminio per ridurre al minimo la contaminazione esterna e dopo ogni estrazione si è provveduto a lavare con acqua ultrapura le unità.

## ANALISI DEI CAMPIONI

### METALLI

I metalli pesanti che si è andati a valutare nel presente studio sono l'Arsenico, il Cadmio, il Cobalto, il Cromo, il Rame, il Ferro, il Mercurio, il Manganese, il Nichel, il Piombo, il Selenio e lo Zinco. Le analisi sulla loro presenza e concentrazione nelle varie componenti di uovo prese in esame sono state effettuate mediante l'utilizzo dell'ICP-OES PerkinElmer-Optima 2100 DV ICP System (Figura 9).

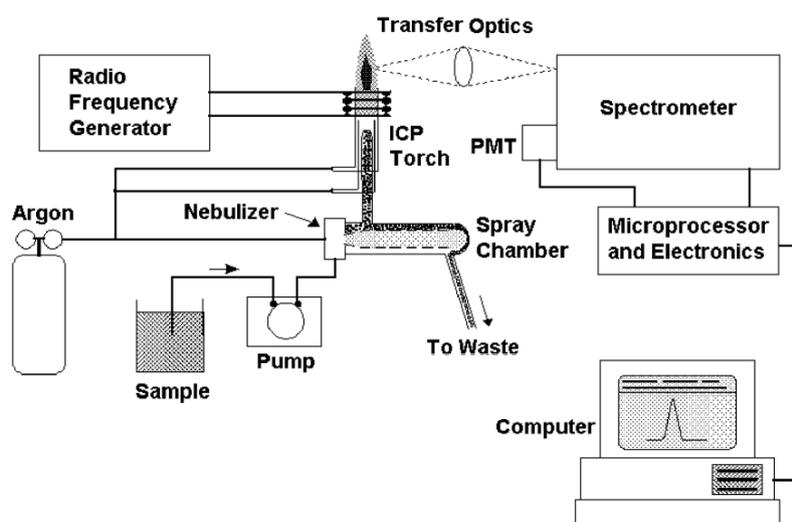


Figura 9 – Schema ICP-OES

## **MICROPLASTICHE**

Le analisi sulla presenza di microplastiche nei campioni di sabbia sono state effettuate tramite l'utilizzo del *Nile Red* (NR; Sigma-Aldrich 19123), un colorante idrofobo, metacromatico e fotochimicamente stabile, non tossico per l'uomo, comunemente usato nella ricerca sulle microplastiche (Shim et al., 2016; Erni-Cassola et al, 2017; Shruti et al., 2022).

La soluzione di NR utilizzata in questo studio è stata preparata sciogliendo il colorante in metanolo (CH<sub>3</sub>OH) ad una concentrazione di 1 µg/ml. A ogni filtro sono state quindi aggiunte quattro gocce di soluzione e i campioni sono stati mantenuti al buio per 15 minuti a 60°C.

Le osservazioni sono state effettuate mediante l'utilizzo del microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse Ni Microscope con un ingrandimento 10x10 e la fluorescenza è stata testata su tre diversi filtri, verde (eccitazione ed emissione rispettivamente a 460 nm e 525 nm), rosso (eccitazione ed emissione rispettivamente a 565 nm e 630 nm) e blu (eccitazione ed emissione rispettivamente a 450 nm e 510 nm). Questo, durante l'elaborazione delle immagini, ha permesso di distinguere le particelle e fibre di microplastica da tutto ciò che non è materiale plastico (Erni-Cassola et al., 2017; Prata et al., 2021; Meyers et al., 2022).

Le immagini sono state ottenute mediante l'utilizzo della fotocamera digitale Nikon DS-Qi1Nc e il programma NIS Elements Software BR 4.20.01 (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Netherlands). Per ogni nido e per ogni filtro di eccitazione ed emissione sono state acquisite 10 immagini, successivamente analizzate mediante il programma ImageJ (Java, LOCI, University of Wisconsin).

## **ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica è stata eseguita con il Programma STATISTICA 6.0 (StatSoft Italia S.r.l.) applicando l'analisi della varianza sulle concentrazioni di metalli in funzione delle variabili analizzate. La normale distribuzione dei dati è stata inizialmente valutata applicando il test di Shapiro-Wilk. Dato che tutti i dati non erano distribuiti normalmente, sono stati applicati test statistici non parametrici. I valori sono presentati come medie ± d.s. In tutti i test, un valore  $p < 0,05$  è stato considerato per indicare la significatività statistica.

# RISULTATI E DISCUSSIONE

## METALLI

In Tabella 15 sono riportati i campioni analizzati, suddivisi in funzione delle diverse matrici prese in considerazione per l'analisi statistica. Nello specifico, con *G* si intende il numero di gusci derivati dalle uova schiuse, mentre con *GNS* ci si riferisce al numero di gusci appartenenti alle uova non schiuse, a cui sono associati i campioni di albume (*A*) e tuorlo (*T*) e nei casi in cui non è stato possibile differenziare l'albume dal tuorlo abbiamo la sigla *AT*.

Codice ID	Campioni				
	G	GNS	A	T	AT
202103tN153CZ	10	5	1	1	4
202105tN148CZ	10	5	4	4	1
202110tN157CZ	10	3	1	2	1
202119tN148CZ	10	5	3	4	1
202120tN156CZ	7	4	0	0	3
202129tN157CZ	10	2	0	0	1
202151N154CZ	10	2	1	1	1
	67	26	10	12	12

Tabella 15 – Dati relativi alle dimensioni dei campioni utilizzati per l'analisi statistica

Come possibile vedere in Tabella 15, la numerosità campionaria non è omogenea: i campioni in analisi, infatti, risultano essere sbilanciati a favore dei gusci (*GNS* e *G*).

Dalle analisi effettuate all'IPC-OES abbiamo ottenuto i dati di concentrazione per ogni metallo e per ogni matrice analizzata (Tabella 16), espressa come mg/kg peso fresco (p.f.). Dalla Figura 10 alla 20 sono rappresentati i valori medi  $\pm$  d.s. delle concentrazioni dei metalli espresse in mg/kg per ogni matrice analizzata.

	GNS	G	A	T	AT
As	0.54354 $\pm$ 0.3622	0.52164 $\pm$ 0.32386	0.59476 $\pm$ 0.22441	0.49041 $\pm$ 0.27192	0.66394 $\pm$ 0.28517
Cd	0.01586 $\pm$ 0.00260	0.01870 $\pm$ 0.00587	0.01408 $\pm$ 0.00146	0.01463 $\pm$ 0.00162	0.01499 $\pm$ 0.00152
Cr	0.02235 $\pm$ 0.01132	0.01931 $\pm$ 0.01579	0.02243 $\pm$ 0.00187	0.02044 $\pm$ 0.00270	0.01981 $\pm$ 0.00374
Cu	0.19196 $\pm$ 0.17706	1.02585 $\pm$ 0.3018	0.05493 $\pm$ 0.03497	0.02367 $\pm$ 0.02003	0.03303 $\pm$ 0.02443
Fe	4.77186 $\pm$ 7.47141	41.9036 $\pm$ 48.5959	2.25883 $\pm$ 1.70086	3.34838 $\pm$ 2.72641	14.84450 $\pm$ 11.54313
Hg	0.16578 $\pm$ 0.09006	0.12371 $\pm$ 0.04968	0.07853 $\pm$ 0.01035	0.07905 $\pm$ 0.01136	0.07415 $\pm$ 0.00902
Mn	0.04556 $\pm$ 0.08686	0.2826 $\pm$ 0.31643	0.10394 $\pm$ 0.19274	0.12639 $\pm$ 0.21490	0.10781 $\pm$ 0.23342
Ni	0.01075 $\pm$ 0.00458	0.00664 $\pm$ 0.0055	0.01086 $\pm$ 0.00106	0.01103 $\pm$ 0.00105	0.01075 $\pm$ 0.00141
Pb	0.14977 $\pm$ 0.04930	0.15132 $\pm$ 0.05125	0.13276 $\pm$ 0.01471	0.13534 $\pm$ 0.01798	0.13377 $\pm$ 0.01794
Se	0.08956 $\pm$ 0.12782	0.05508 $\pm$ 0.01675	0.00925 $\pm$ 0.01098	0.01354 $\pm$ 0.01188	0.01618 $\pm$ 0.01318
Zn	0.92134 $\pm$ 2.28884	0.27038 $\pm$ 0.43429	0.36454 $\pm$ 0.3392	2.21589 $\pm$ 0.52824	2.20430 $\pm$ 0.81185

Tabella 16 – Valori medi  $\pm$  d.s. delle concentrazioni dei metalli (mg/kg) per ogni matrice

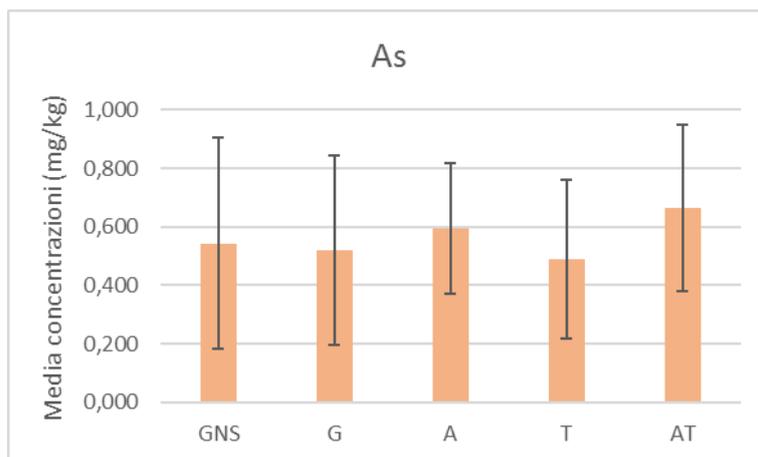


Figura 10 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di As nelle diverse matrici

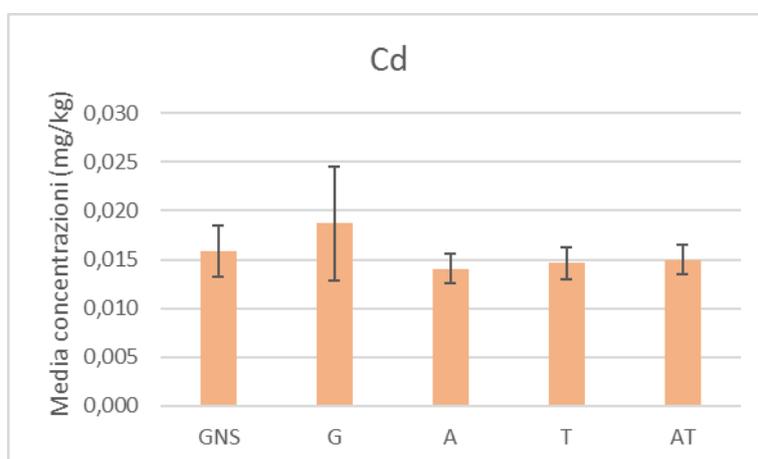


Figura 11 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Cd nelle diverse matrici

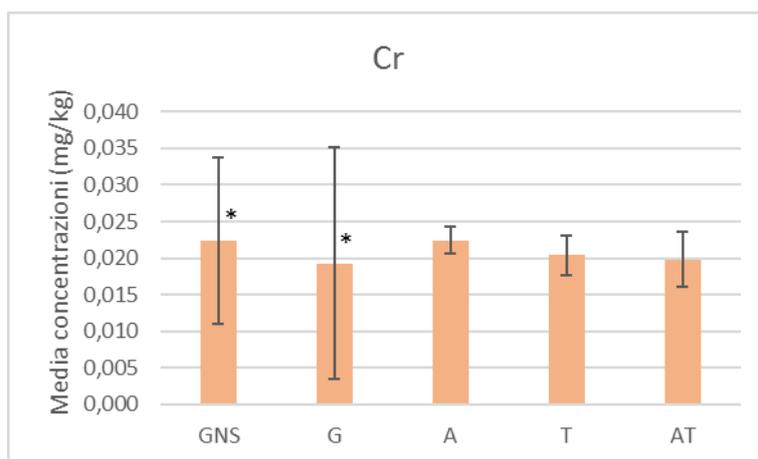


Figura 12 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Cr nelle diverse matrici

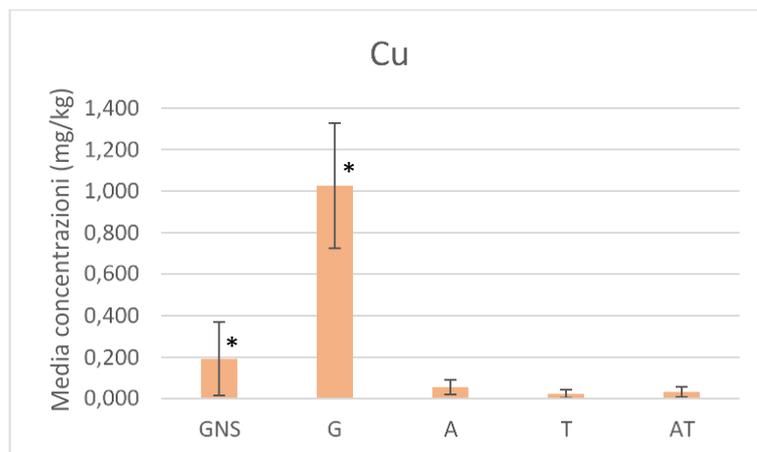


Figura 13 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Cu nelle diverse matrici

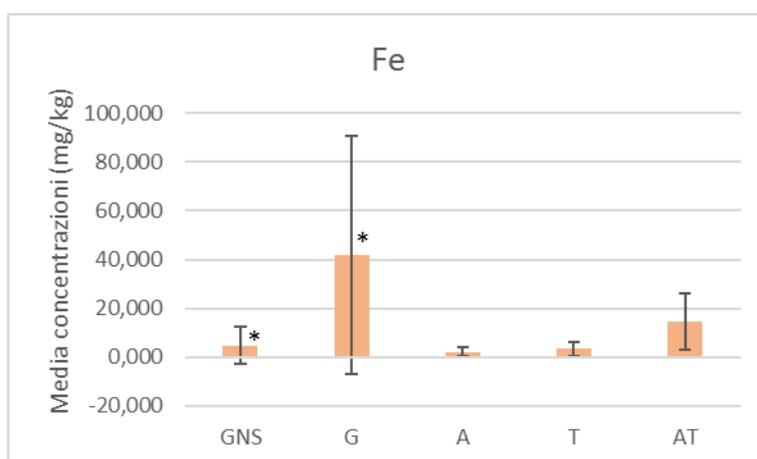


Figura 14 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Fe nelle diverse matrici

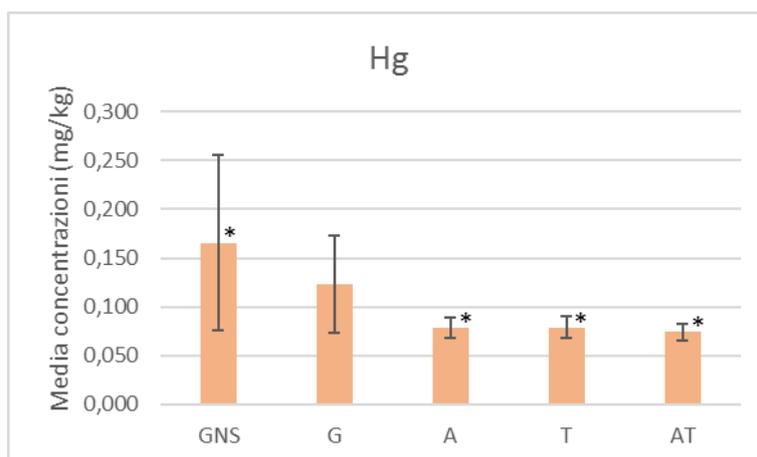


Figura 15 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Hg nelle diverse matrici

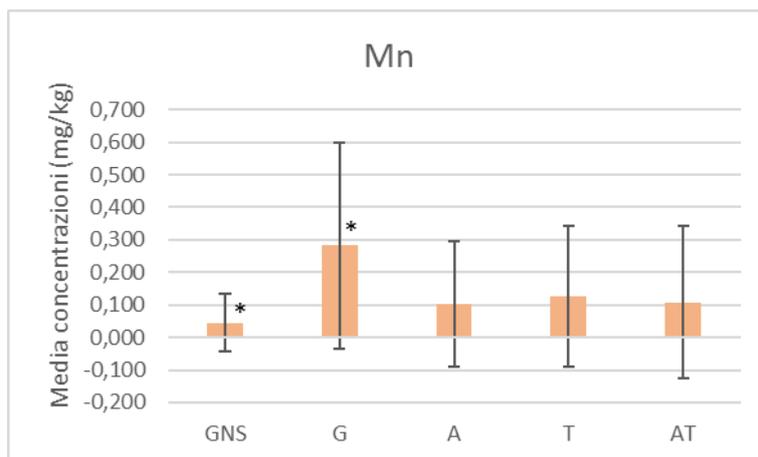


Figura 16 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Mn nelle diverse matrici

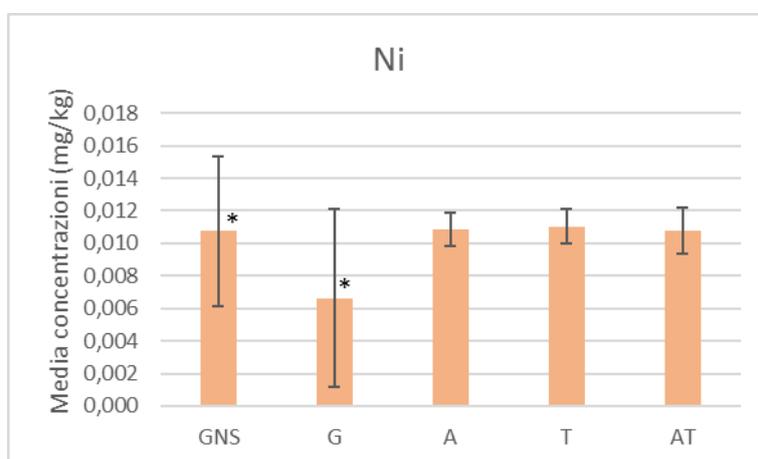


Figura 17 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Ni nelle diverse matrici

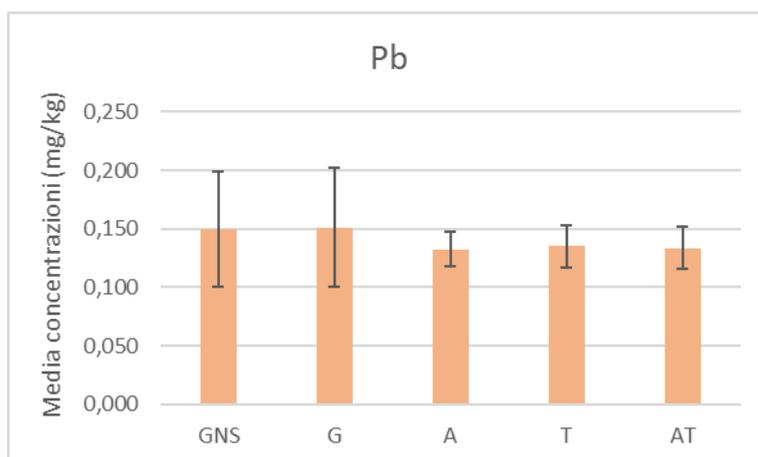


Figura 18 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Pb nelle diverse matrici

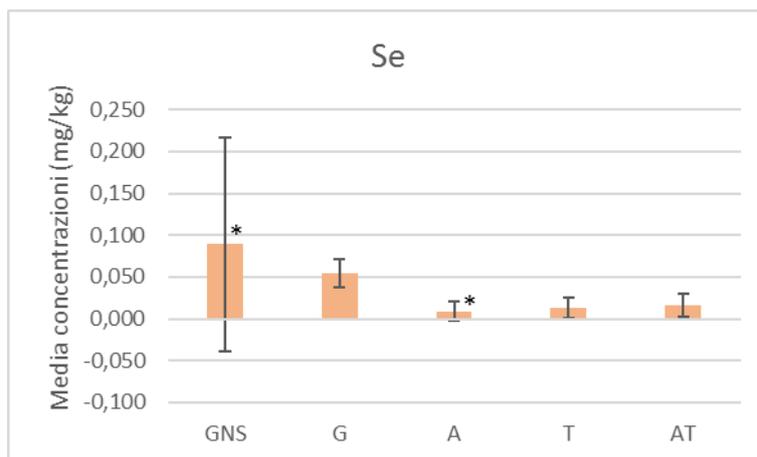


Figura 19 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Se nelle diverse matrici

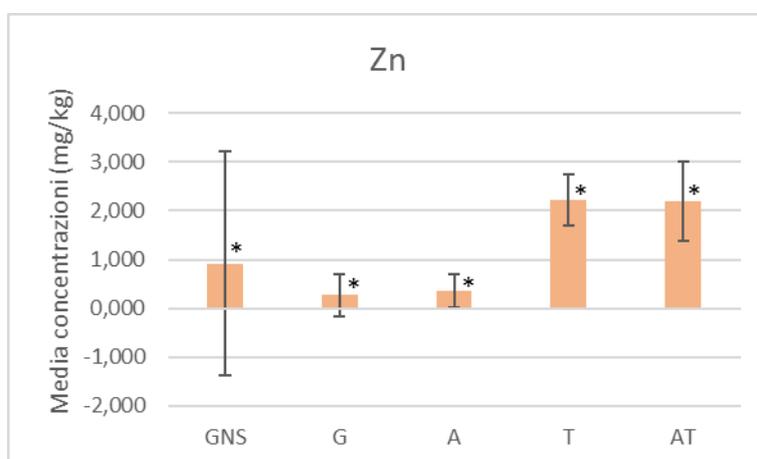


Figura 20 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Zn nelle diverse matrici

Mediante il test di Kruskal-Wallis sono state osservate differenze statisticamente significative nelle concentrazioni degli elementi essenziali, nello specifico Cu, Fe, Mn e Zn (con un livello di significatività corrispondente di  $p=0,000$ ;  $p=0,000$ ;  $p=0,000$ ;  $p=0,001$ ), nelle concentrazioni degli elementi necessari, nello specifico Cr, Ni e Se (con un livello di significatività corrispondente di  $p=0,0287$ ;  $p=0,0001$ ;  $p=0,000$ ) e nelle concentrazioni degli elementi tossici, nello specifico Cd e Hg (con un livello di significatività corrispondente di  $p=0,0036$ ;  $p=0,000$ ). Questo non è stato riscontrato per le concentrazioni di As e Pb.

Dall'analisi post-hoc, uno degli aspetti importanti da sottolineare è rappresentato dalle differenze di concentrazione statisticamente significative evidenziate per i metalli essenziali, nello specifico per Zn, e per i metalli necessari, nello specifico Cr e Ni, tra la matrice G e la matrice GNS ( $p=0,00123$ ;  $p=0,042744$ ;  $p=0,001879$ ): i livelli medi di concentrazione di Zn, Cr e Ni nei gusci delle uova non schiuse risultano più elevati rispetto ai gusci delle uova schiuse (Figure 20, 12 e 17). Questo ci permette di ipotizzare che i gusci delle uova schiuse presentano

concentrazioni minori di questi metalli in quanto l'embrione ha assorbito tali nutrienti non solo dall'albume e dal tuorlo, ma anche dal guscio.

Questo discorso non vale per gli altri elementi essenziali (Cu con  $p=0,000000$ ; Fe con  $p=0,000000$ ; Mn con  $p=0,000000$ ) presi in analisi in questo studio: i livelli di concentrazione di questi metalli nei gusci delle uova non schiuse risultano essere infatti minori rispetto ai gusci delle uova schiuse (Figure 13,14 e 16). Possiamo quindi ipotizzare che, al fine del corretto sviluppo dell'embrione, tali elementi vengano assorbiti principalmente da tuorlo e albume oppure, al contrario, che questi metalli vengano anche assorbiti dal guscio, ma la loro bassa concentrazione nei gusci non schiusi non abbia permesso il corretto sviluppo dell'embrione.

I restanti elementi tossici, rappresentati da Cd e Hg, e l'ultimo elemento necessario preso in analisi in questo lavoro di tesi, ovvero Se, non presentano differenze statisticamente significative tra i gusci delle uova schiuse e i gusci delle uova non schiuse.

Allo stesso modo, non si osservano differenze di concentrazione statisticamente significative tra albume, tuorlo e albume e tuorlo combinati: l'ipotesi che possiamo avanzare è che i metalli presi in analisi non vadano incontro ad accumulo selettivo nel tuorlo o nell'albume. L'unica eccezione è rappresentata da Zn: si sono infatti osservate differenze statisticamente significative tra i valori di concentrazione in *A* e in *T* ( $p=0,003756$ ) e tra i valori di concentrazione in *A* e in *AT* ( $p=0,004322$ ). Analizzando i valori medi per questo metallo, possiamo evidenziare una sua maggior presenza nel tuorlo rispetto all'albume (Figura 20). Possiamo quindi ipotizzare che Zn, essendo uno degli elementi essenziali allo sviluppo embrionale, si accumula nel tuorlo proprio perché questa componente dell'uovo provvede al nutrimento e sostentamento dell'embrione ed è la sede di tutte le attività enzimatiche che permettono lo sviluppo e la crescita dello stesso.

Differenze di concentrazione statisticamente significative tra *GNS* e le componenti interne dell'uovo (*A*, *T* e *AT*) sono state individuate in soli due metalli analizzati: Se presenta differenze significative tra *GNS* e *A* ( $p=0,019291$ ), con valori di concentrazione superiori a livello del guscio rispetto all'albume (Figura 19), mentre Hg presenta differenze significative tra *GNS* e tutte le altre componenti interne dell'uovo (*A* con  $p=0,000010$ ; *T* con  $p=0,000004$ ; *AT* con  $p=0,000000$ ), con valori medi di concentrazione superiori a livello del guscio rispetto ad *A*, *T* e *AT*, valori quest'ultimi che si equivalgono tra loro (Figura 15). Questi due dati ci permettono di ipotizzare che Se e soprattutto Hg tendono ad accumularsi con maggior probabilità a livello del guscio. Un'altra possibile ipotesi può essere che la forte variabilità nella concentrazione tra esterno ed interno delle uova è dovuta a fattori ambientali: una maggior esposizione ambientale

a questi due metalli potrebbe infatti determinare una maggior presenza di questi a livello del guscio. Questa ipotesi va a supportare la funzione principale svolta dal guscio, ovvero quella di offrire protezione e fungere da barriera fisica contro l'ambiente esterno.

In Tabella 17 e nelle Figure dalla 21 alla 31 sono rappresentati i valori medi  $\pm$  d.s. delle concentrazioni dei metalli espresse in mg/kg per ogni nido.

	202103tN153CZ	202105tN148CZ	202110tN157CZ	202119tN148CZ
As	0.50497 $\pm$ 0.25666	0.5218 $\pm$ 0.22661	0.4181 $\pm$ 0.326405	0.63187 $\pm$ 0.31227
Cd	0.01621 $\pm$ 0.00202	0.0154 $\pm$ 0.00318	0.0138 $\pm$ 0.001967	0.01847 $\pm$ 0.00429
Cr	0.01677 $\pm$ 0.00761	0.0138 $\pm$ 0.01156	0.0169 $\pm$ 0.007865	0.02216 $\pm$ 0.02241
Cu	0.62744 $\pm$ 0.40929	0.8672 $\pm$ 0.60179	0.4655 $\pm$ 0.259860	0.86490 $\pm$ 0.61832
Fe	15.15759 $\pm$ 12.09380	29.6880 $\pm$ 20.39958	12.7307 $\pm$ 7.801264	65.85244 $\pm$ 86.75763
Hg	0.11381 $\pm$ 0.02628	0.1139 $\pm$ 0.03041	0.1115 $\pm$ 0.035430	0.14968 $\pm$ 0.04460
Mn	0.18587 $\pm$ 0.24975	0.2393 $\pm$ 0.33304	0.1671 $\pm$ 0.282336	0.19328 $\pm$ 0.16748
Ni	0.00735 $\pm$ 0.00500	0.0094 $\pm$ 0.00376	0.0048 $\pm$ 0.004477	0.00590 $\pm$ 0.00496
Pb	0.14052 $\pm$ 0.01951	0.1270 $\pm$ 0.02716	0.1180 $\pm$ 0.027972	0.14974 $\pm$ 0.03435
Se	0.04199 $\pm$ 0.02723	0.0739 $\pm$ 0.07755	0.0307 $\pm$ 0.016385	0.06077 $\pm$ 0.06487
Zn	1.17779 $\pm$ 3.04632	0.4154 $\pm$ 0.74915	0.3423 $\pm$ 0.453666	0.51063 $\pm$ 0.75836
<b>Tot. Metalli</b>	<b>18.01043 <math>\pm</math> 12.60831</b>	<b>32.1034 <math>\pm</math> 20.78791</b>	<b>14.4356 <math>\pm</math> 7.77014</b>	<b>68.47935 <math>\pm</math> 87.30155</b>

As	202120tN156CZ	202129tN157CZ	202151N154CZ
Cd	0.58697 $\pm$ 0.44998	0.60944 $\pm$ 0.367255	0.43220 $\pm$ 0.36825
Cr	0.02305 $\pm$ 0.00869	0.02227 $\pm$ 0.005138	0.01618 $\pm$ 0.00259
Cu	0.02898 $\pm$ 0.01241	0.03102 $\pm$ 0.012708	0.01305 $\pm$ 0.01063
Fe	0.77661 $\pm$ 0.60458	0.80200 $\pm$ 0.284434	0.88776 $\pm$ 0.30952
Hg	28.65294 $\pm$ 41.15827	23.97958 $\pm$ 9.441864	33.21425 $\pm$ 37.01931
Mn	0.21557 $\pm$ 0.08986	0.13089 $\pm$ 0.112156	0.09765 $\pm$ 0.02174
Ni	0.28979 $\pm$ 0.38545	0.10162 $\pm$ 0.118835	0.29183 $\pm$ 0.40664
Pb	0.00914 $\pm$ 0.00454	0.01195 $\pm$ 0.005985	0.00756 $\pm$ 0.00715
Se	0.20405 $\pm$ 0.06556	0.19836 $\pm$ 0.062431	0.12350 $\pm$ 0.02880
Zn	0.09303 $\pm$ 0.14335	0.04941 $\pm$ 0.025893	0.09028 $\pm$ 0.04123
<b>Tot. Metalli</b>	<b>0.52156 <math>\pm</math> 0.58980</b>	<b>0.33965 <math>\pm</math> 0.194043</b>	<b>0.51869 <math>\pm</math> 0.71941</b>
	<b>31.42854 <math>\pm</math> 41.87817</b>	<b>26.30337 <math>\pm</math> 9.448342</b>	<b>35.71083 <math>\pm</math> 37.50074</b>

Tabella 17 – Valori medi  $\pm$  d.s. delle concentrazioni dei metalli (mg/kg) per ogni nido

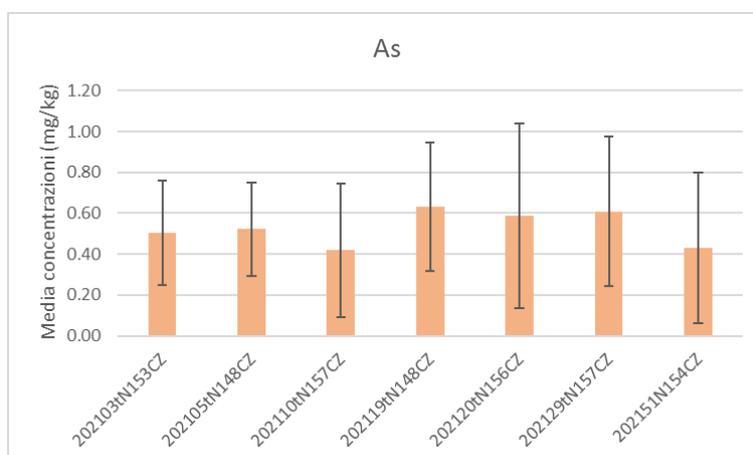


Figura 21 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di As nei diversi nidi

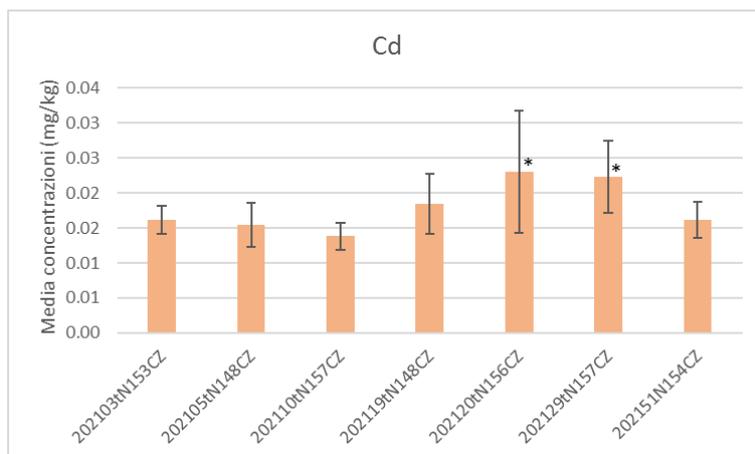


Figura 22 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Cd nei diversi nidi

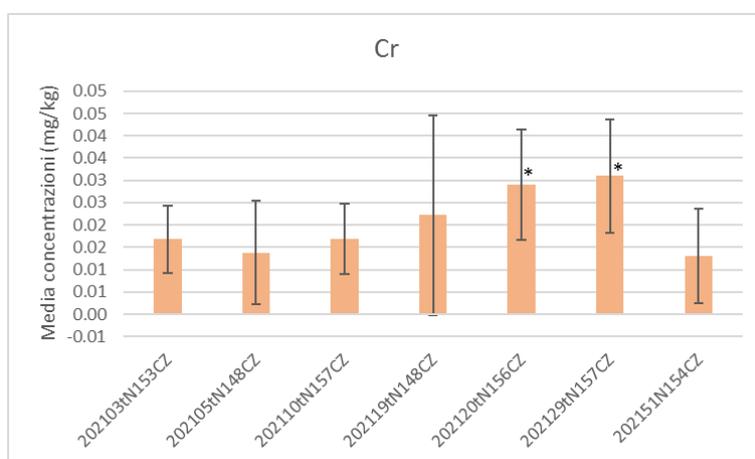


Figura 23 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Cr nei diversi nidi

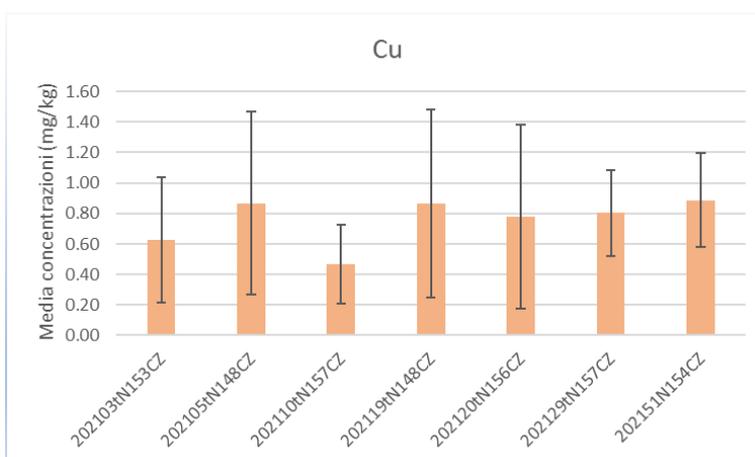


Figura 24 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Cu nei diversi nidi

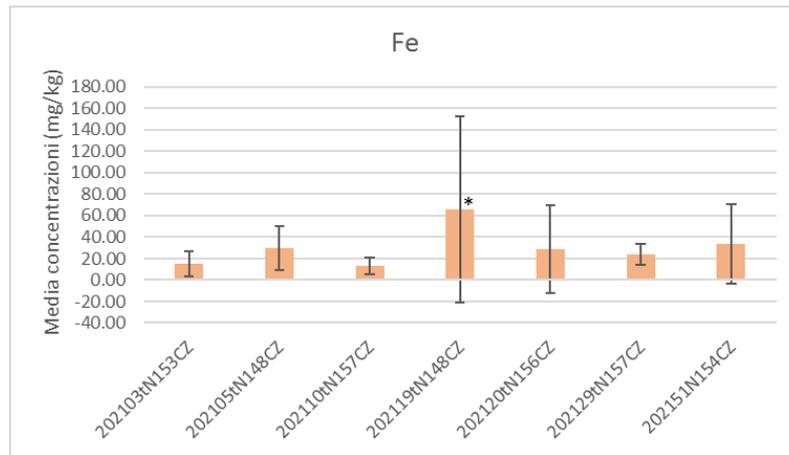


Figura 25 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Fe nei diversi nidi

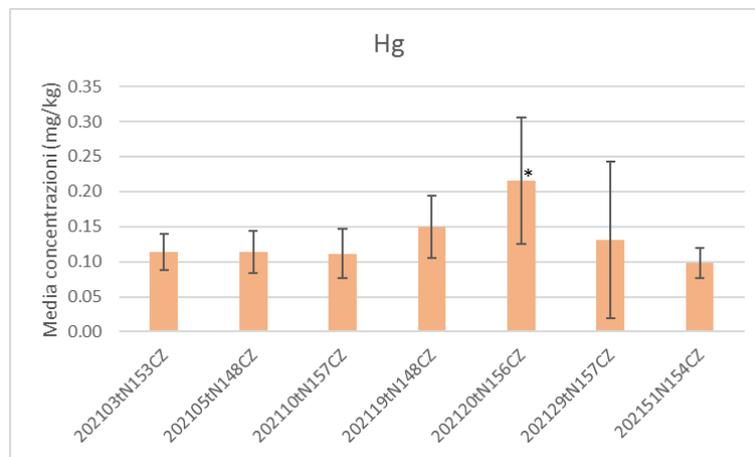


Figura 26 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Hg nei diversi nidi

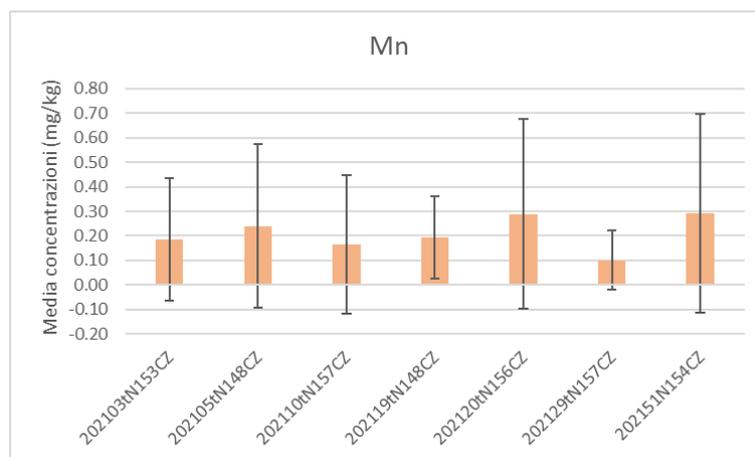


Figura 27 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Mn nei diversi nidi

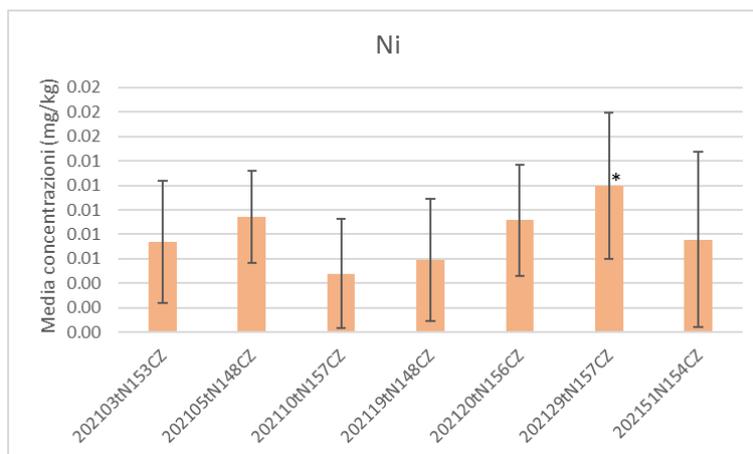


Figura 28 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Ni nei diversi nidi

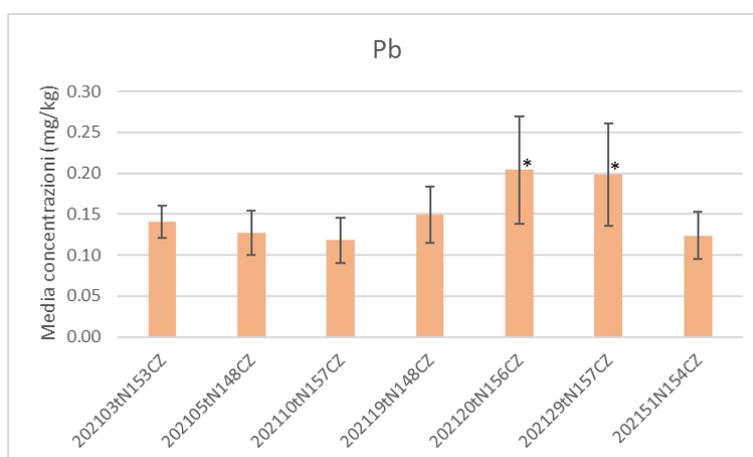


Figura 29 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Pb nei diversi nidi

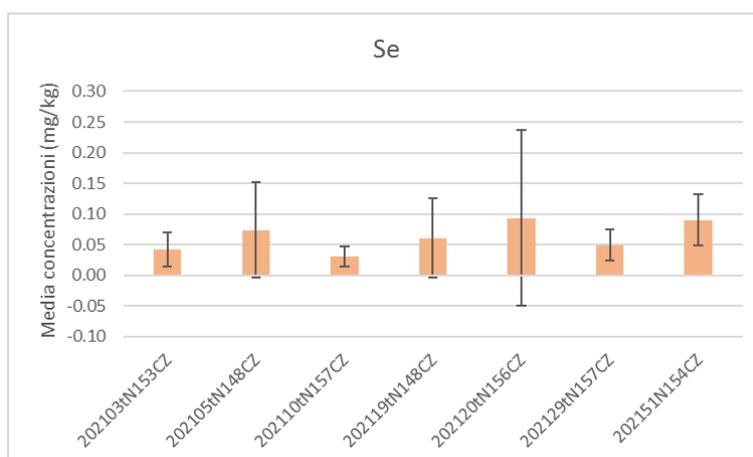


Figura 30 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Se nei diversi nidi

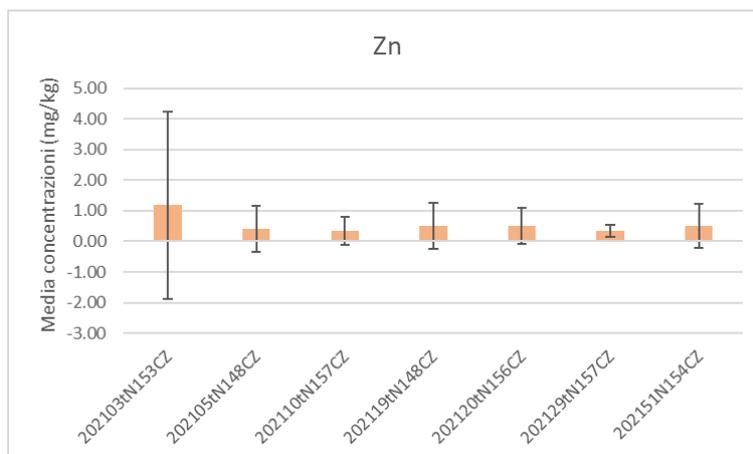


Figura 31 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni di Zn nei diversi nidi

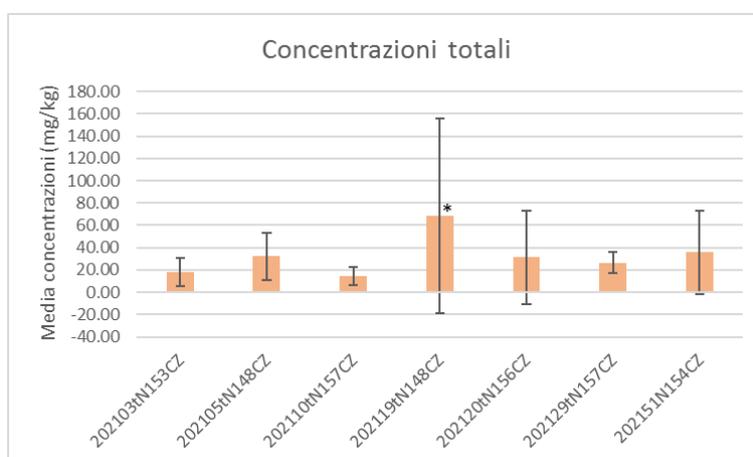


Figura 32 – Valori medi ( $\pm$ d.s.; n=93) delle concentrazioni totali dei metalli nei diversi nidi

Mediante il test di Kruskal-Wallis differenze statisticamente significative tra i nidi sono state riscontrate per le concentrazioni di Cd ( $p=0,000$ ), Cr ( $p=0,0005$ ), Fe ( $p=0,0318$ ), Hg ( $p=0,0002$ ), Ni ( $p=0,0124$ ), Pb ( $p=0,0000$ ) e Se ( $p=0,0006$ ) e per la concentrazione totale dei metalli analizzati ( $p=0,0251$ ). Questo ci permette di ipotizzare che abbiamo una variabilità nell'esposizione delle uova ai metalli pesanti in funzione della posizione geografica del nido.

L'analisi post-hoc, effettuata mediante il test di Duncan, ha permesso di valutare le differenze tra i nidi in funzione delle concentrazioni medie dei metalli. In generale, possiamo dire che il nido 202120tN156CZ e il nido 202129tN157CZ risultano essere i più contaminati, in confronto a tutti gli altri, in quanto presentano concentrazioni medie statisticamente più elevate per quanto riguarda le concentrazioni di Cd (Figura 22), Cr (Figura 23) e Pb (Figura 29). Il nido 202120tN156CZ, inoltre, risulta essere il nido più contaminato in assoluto per le concentrazioni di Hg (Figura 26), mentre il nido 202129tN157CZ risulta essere il nido più contaminato in assoluto per le concentrazioni di Ni (Figura 28). Possiamo quindi affermare che i nidi

202120tN156CZ e 202129tN157CZ presentano le concentrazioni più alte per quanto riguarda i metalli tossici, ma, se osserviamo le concentrazioni totali dei metalli, non sono i nidi ad avere più metalli in totale (Figura 32). Il nido 202119tN148CZ, invece, presenta i livelli più elevati rispetto a tutti gli altri per quanto riguarda le concentrazioni di Fe (Figura 25). Inoltre, questo nido risulta avere differenze statisticamente significative anche nelle concentrazioni totali dei metalli rispetto a tutti gli altri nidi (Figura 32).

In Tabella 18 sono rappresentati i valori medi  $\pm$  d.s. delle concentrazioni dei metalli espresse in mg/kg.

	<b>Metalli</b>
As	0.52994 $\pm$ 0.32729
Cd	0.01767 $\pm$ 0.00528
Cr	0.01997 $\pm$ 0.01433
Cu	0.75372 $\pm$ 0.48263
Fe	30.40366 $\pm$ 43.74864
Hg	0.13193 $\pm$ 0.06597
Mn	0.20852 $\pm$ 0.28747
Ni	0.00788 $\pm$ 0.00543
Pb	0.14937 $\pm$ 0.04971
Se	0.06174 $\pm$ 0.06927
Zn	0.56134 $\pm$ 1.34938

Tabella 18 – Valori medi  $\pm$  d.s. delle concentrazioni dei metalli (mg/kg)

Ai fini dell'elaborazione statistica, dalla Tabella 11 e 12 siamo andati a considerare:

- il numero totale delle uova deposte;
- il numero delle uova non schiuse;
- il numero delle uova danneggiate;
- la percentuale di successo di schiusa.

Mediante il test di Product-Moment and Partial Correlations si è andati a valutare la correlazione tra le concentrazioni dei singoli metalli nelle uova e i parametri sopra citati.

La prima cosa da evidenziare è che la percentuale di successo di schiusa non correla con la concentrazione dei metalli, ma correlazioni negative statisticamente significative si osservano tra il numero totale di uova deposte e le concentrazioni di Cd ( $p=0,003$ ), Cr ( $p=0,0016$ ) e Pb ( $p=0,000$ ). Correlazioni positive statisticamente significative sono, invece, verificate tra il numero di uova danneggiate e le concentrazioni di Hg ( $p=0,000$ ) e Pb ( $p=0,031$ ). Ciò significa che maggiore è la concentrazione di Cd, Cr, Hg e Pb, maggiore è la probabilità di avere un ridotto successo di deposizione e un incremento nel numero di uova danneggiate e,

conseguentemente, possiamo avere un maggiore impatto sul successo riproduttivo degli individui e delle popolazioni.

Guardando il dettaglio per la matrice *AT*, abbiamo una correlazione negativa tra la percentuale di successo di schiusa e la concentrazione di Pb ( $p=0,022$ ). Inoltre, il numero totale di uova deposte correla negativamente con Cd ( $p=0,041$ ), Ni ( $p=0,018$ ) e Pb ( $p=0,044$ ) e positivamente con Fe ( $p=0,034$ ). Infine, il numero totale di uova deposte correla negativamente con il carico totale di metalli ( $p=0,043$ ).

Guardando il dettaglio per la matrice *G*, invece, abbiamo una correlazione negativa tra il numero totale di uova deposte e le concentrazioni di Cd ( $p=0,005$ ), Cr ( $p=0,018$ ) e Pb ( $p=0,001$ ) e si confermano le correlazioni positive tra le concentrazioni di Hg ( $p=0,000$ ) e Pb ( $p=0,031$ ) e il numero di uova danneggiate.

Non è stato possibile valutare le correlazioni per le matrici *A* e *T* a causa della ridotta numerosità dei campioni disponibili, come illustrato in Tabella 15.

Mediante il test di Duncan abbiamo poi verificato che non esiste una differenza tra la percentuale di successo di schiusa e il totale assoluto dei metalli. Questo accade anche per il totale assoluto dei metalli e il numero di uova danneggiate, il totale assoluto dei metalli e il numero totale di uova deposte e il totale assoluto dei metalli e il numero di uova non schiuse.

## MICROPLASTICHE

Le foto acquisite al microscopio a fluorescenza sono state analizzate per verificare la presenza di microplastiche: il numero di particelle (P) e il numero di fibre (F) presenti nella porzione di filtro analizzata sono riportati in Tabella 19.

Codice ID	Microplastiche		Percentuale della porzione di filtro analizzata
	F	P	
202103tN153CZ	0	21	35.0
202105tN148CZ	2	25	29.5
202110tN157CZ	8	25	33.9
202119tN148CZ	30	32	29.1
202120tN156CZ	0	21	29.4
202129tN157CZ	0	20	30.3
202151N154CZ	6	22	27.9
	46	166	
	212		

Tabella 19 – Dati relativi alla presenza di microplastiche, suddivise in particelle e fibre, nella porzione di filtro analizzata

I dati riportati in Tabella 19 sono stati successivamente corretti per la percentuale di filtro per ottenere la quantità totale di microplastiche presenti nei 50 g di campione analizzato per ogni nido (Tabella 20).

Codice ID	Microplastiche		
	Nr. particelle	Nr. fibre	Nr. totale
202103tN153CZ	60	0	60
202105tN148CZ	85	7	92
202110tN157CZ	74	24	98
202119tN148CZ	110	103	213
202120tN156CZ	71	0	71
202129tN157CZ	66	0	66
202151N154CZ	79	22	101
	545	156	701

Tabella 20 – Numero di particelle e fibre di microplastica presenti in 50 g di campione di sabbia

L'analisi delle immagini mediante il programma ImageJ ha reso possibile calcolare l'area ( $\text{mm}^2$ ), il perimetro (mm) e la lunghezza massima (mm) delle particelle di microplastica e la lunghezza massima (mm) delle fibre di microplastica (Tabella dalla 21 alla 23).

Codice ID	Microplastiche		Area (mm <sup>2</sup> )	
	Tipologia	Numero	Valore medio	d.s.
202103tN153CZ	P	21	0.003310	0.003186
202103tN153CZ	F	0	-	-
202105tN148CZ	P	25	0.004856	0.008117
202105tN148CZ	F	2	-	-
202110tN157CZ	P	25	0.003660	0.003150
202110tN157CZ	F	8	-	-
202119tN148CZ	P	32	0.006322	0.008532
202119tN148CZ	F	30	-	-
202120tN156CZ	P	21	0.006510	0.008008
202120tN156CZ	F	0	-	-
202129tN157CZ	P	20	0.004835	0.004616
202129tN157CZ	F	0	-	-
202151N154CZ	P	22	0.001977	0.001092
202151N154CZ	F	6	-	-

Tabella 21 – Dati relativi ai valori medi  $\pm$  d.s. dell'area delle microplastiche nella porzione di filtro analizzata

Codice ID	Microplastiche		Perimetro (mm)	
	Tipologia	Numero	Valore medio	d.s.
202103tN153CZ	P	21	0.220619	0.121729
202103tN153CZ	F	0	-	-
202105tN148CZ	P	25	0.232560	0.173810
202105tN148CZ	F	2	-	-
202110tN157CZ	P	25	0.232760	0.119361
202110tN157CZ	F	8	-	-
202119tN148CZ	P	32	0.286688	0.207362
202119tN148CZ	F	30	-	-
202120tN156CZ	P	21	0.293048	0.179455
202120tN156CZ	F	0	-	-
202129tN157CZ	P	20	0.264400	0.133052
202129tN157CZ	F	0	-	-
202151N154CZ	P	22	0.178273	0.065066
202151N154CZ	F	6	-	-

Tabella 22 – Dati relativi ai valori medi  $\pm$  d.s. del perimetro delle microplastiche nella porzione di filtro analizzata

Codice ID	Microplastiche		Lunghezza massima (mm)	
	Tipologia	Numero	Valore medio	d.s.
202103tN153CZ	P	21	0.078143	0.049094
202103tN153CZ	F	0	-	-
202105tN148CZ	P	25	0.076200	0.056892
202105tN148CZ	F	2	0.2095	0.135057
202110tN157CZ	P	25	0.081680	0.043244
202110tN157CZ	F	8	0.165	0.098702
202119tN148CZ	P	32	0.094000	0.064833
202119tN148CZ	F	30	0.215066667	0.075409
202120tN156CZ	P	21	0.102571	0.063360
202120tN156CZ	F	0	-	-
202129tN157CZ	P	20	0.090050	0.050414
202129tN157CZ	F	0	-	-
202151N154CZ	P	22	0.059818	0.023834
202151N154CZ	F	6	0.241	0.096106

Tabella 23 – Dati relativi ai valori medi  $\pm$  d.s. della lunghezza massima delle microplastiche nella porzione di filtro analizzata

Grazie l'analisi statistica, effettuata tramite il Product-Moment and Partial Correlations, possiamo affermare che:

- non abbiamo correlazioni statisticamente significative tra la presenza di particelle e fibre di microplastica e la percentuale di successo di schiusa dei nidi;
- non abbiamo correlazioni statisticamente significative tra la presenza delle sole particelle di microplastica e la percentuale di successo di schiusa dei nidi;
- non abbiamo correlazioni statisticamente significative tra la presenza delle sole fibre di microplastica e la percentuale di successo di schiusa dei nidi.

Anche graficamente (Figura 33), è evidente come non ci sia una correlazione tra il numero totale di microplastiche e la percentuale di successo di schiusa: esempio lampante di ciò è rappresentato dal fatto che il nido 202103tN153CZ, ovvero il nido che presenta il minor numero di microplastiche, è anche quello ad avere la percentuale di successo di schiusa minore.

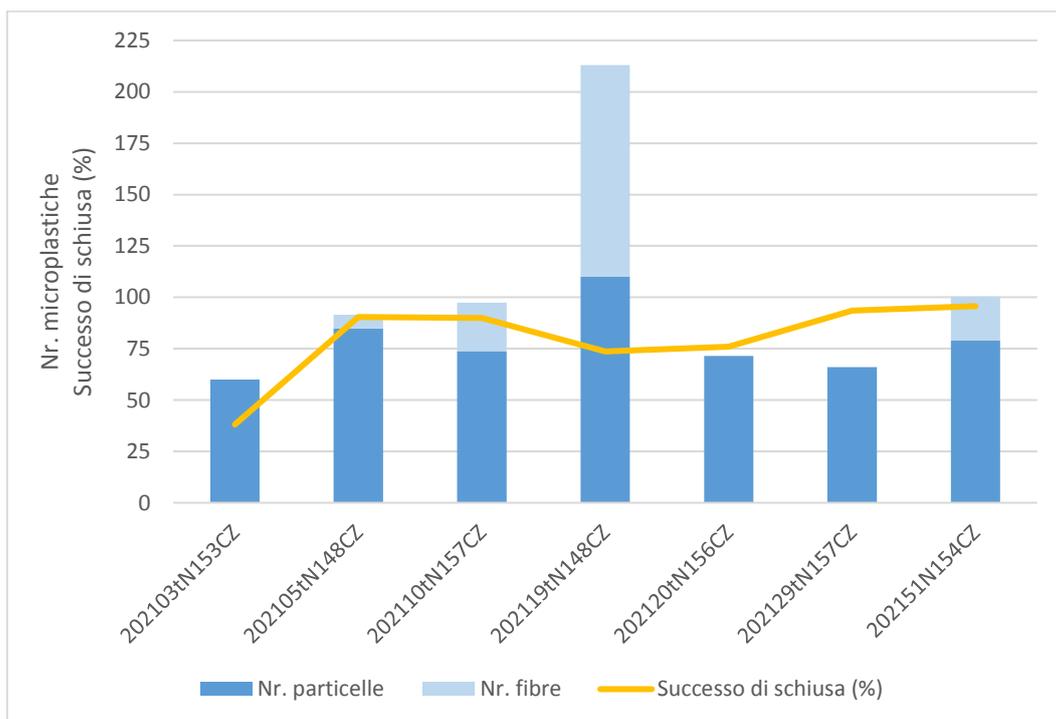


Figura 33 – Numero di particelle e fibre di microplastiche in relazione alla percentuale di successo di schiusa presenti in ogni nido preso in analisi

Di seguito alcuni degli esempi più rappresentativi delle immagini acquisite al microscopio a fluorescenza (Figura 34 alla 40).

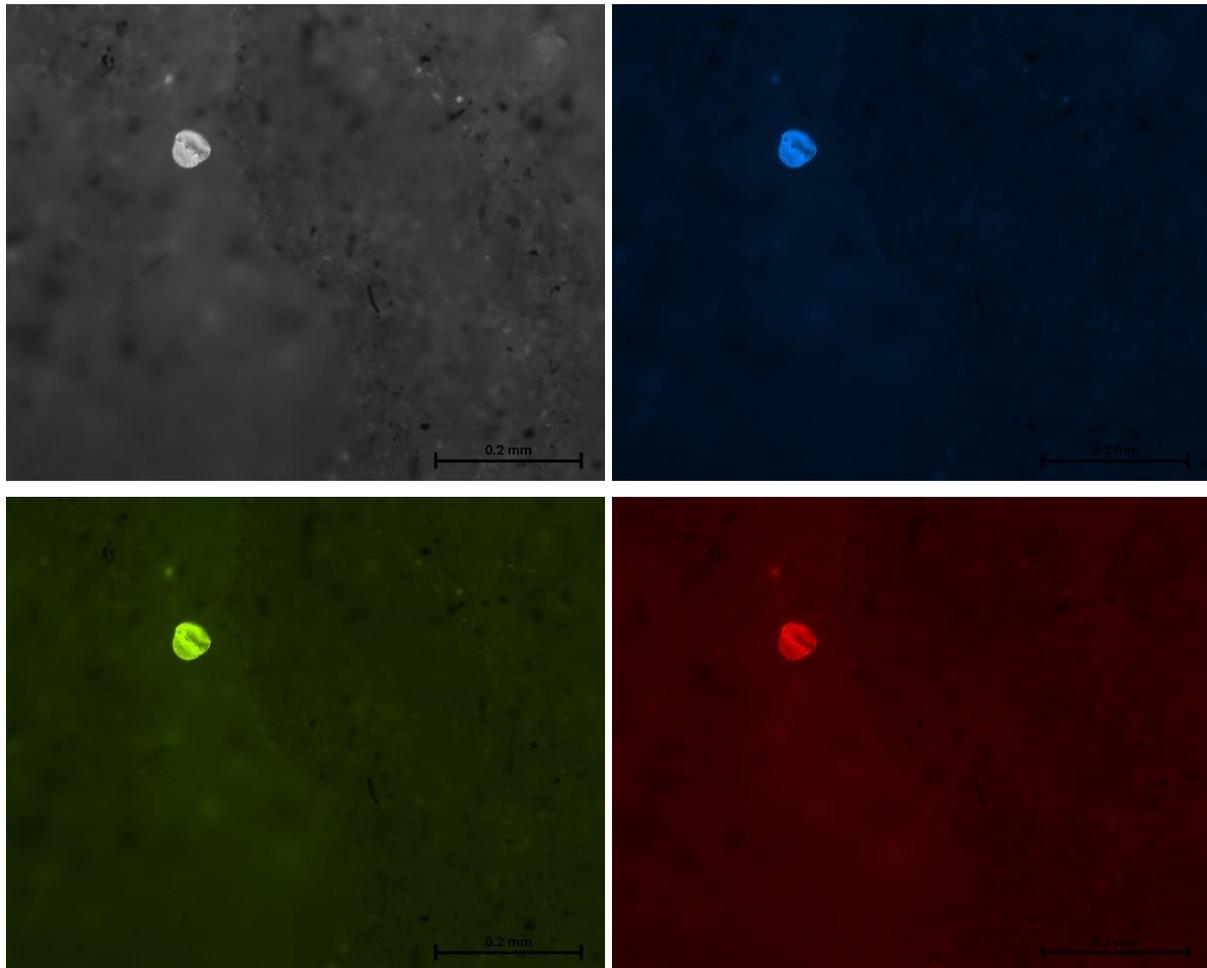


Figura 34 – Particelle e fibre di microplastiche presenti nel nido 202103tN153CZ, colorate con NR e osservate al microscopio a fluorescenza

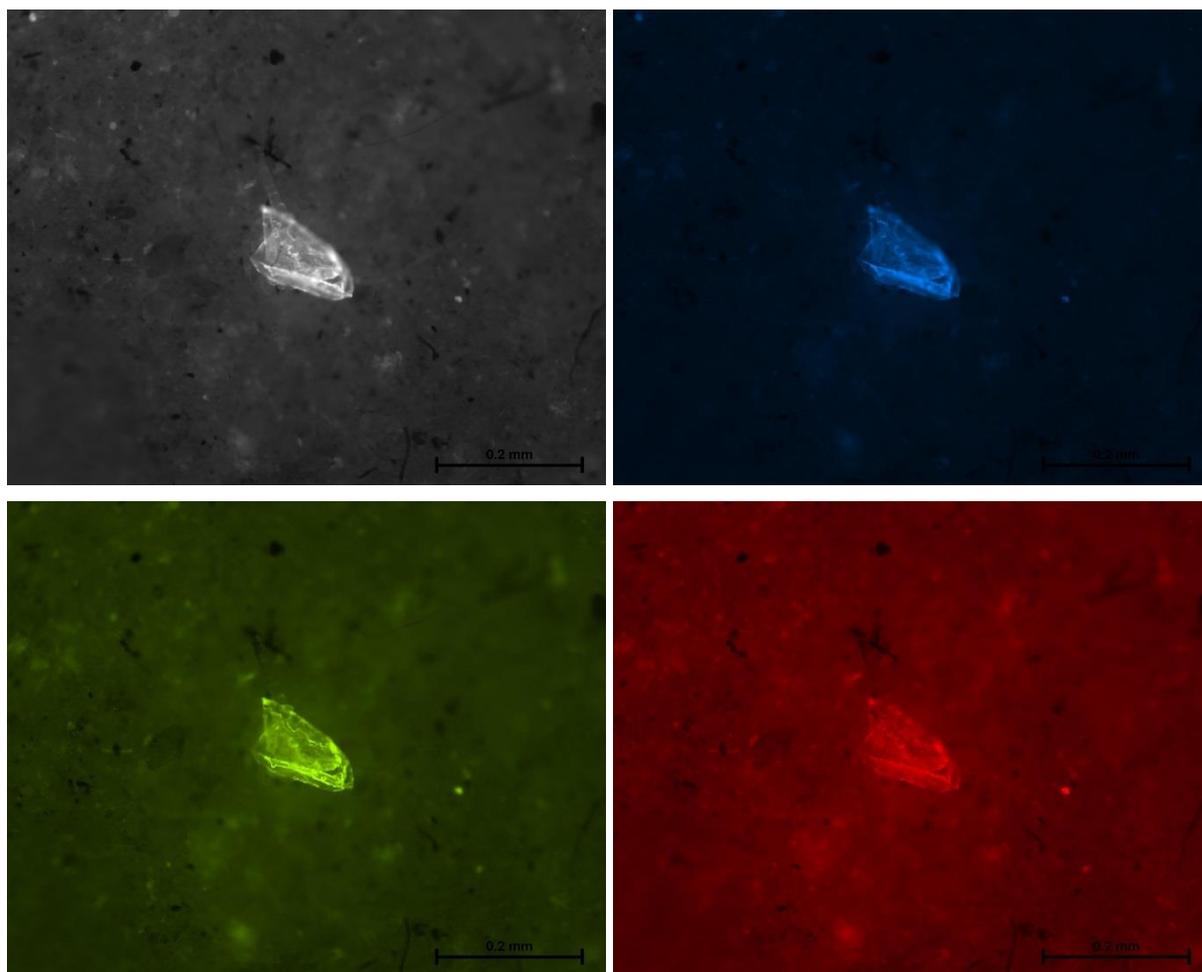


Figura 35 – Particelle e fibre di microplastiche presenti nel nido 202103tN153CZ, colorate con NR e osservate al microscopio a fluorescenza

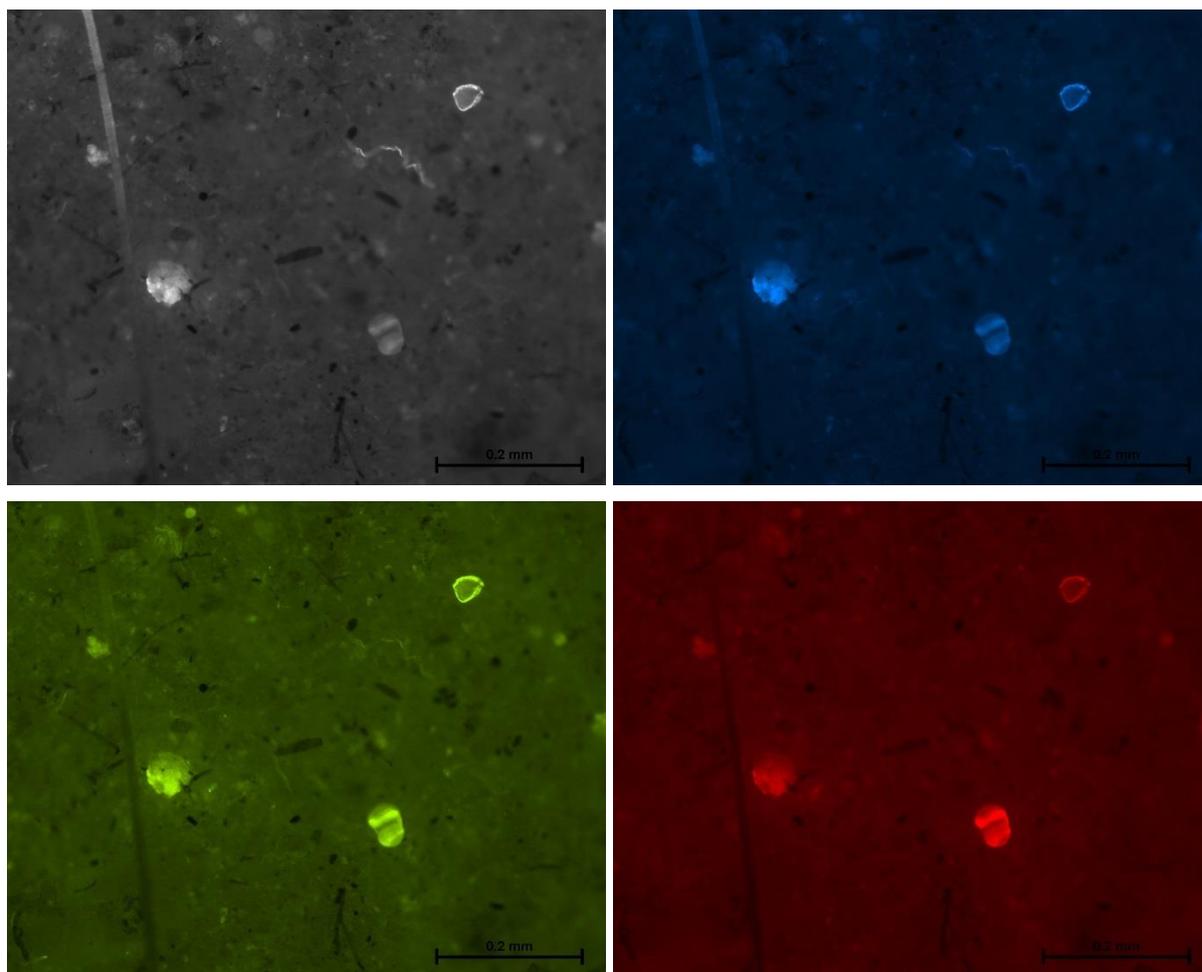


Figura 36 – Particelle e fibre di microplastiche presenti nel nido 202103tN153CZ, colorate con NR e osservate al microscopio a fluorescenza

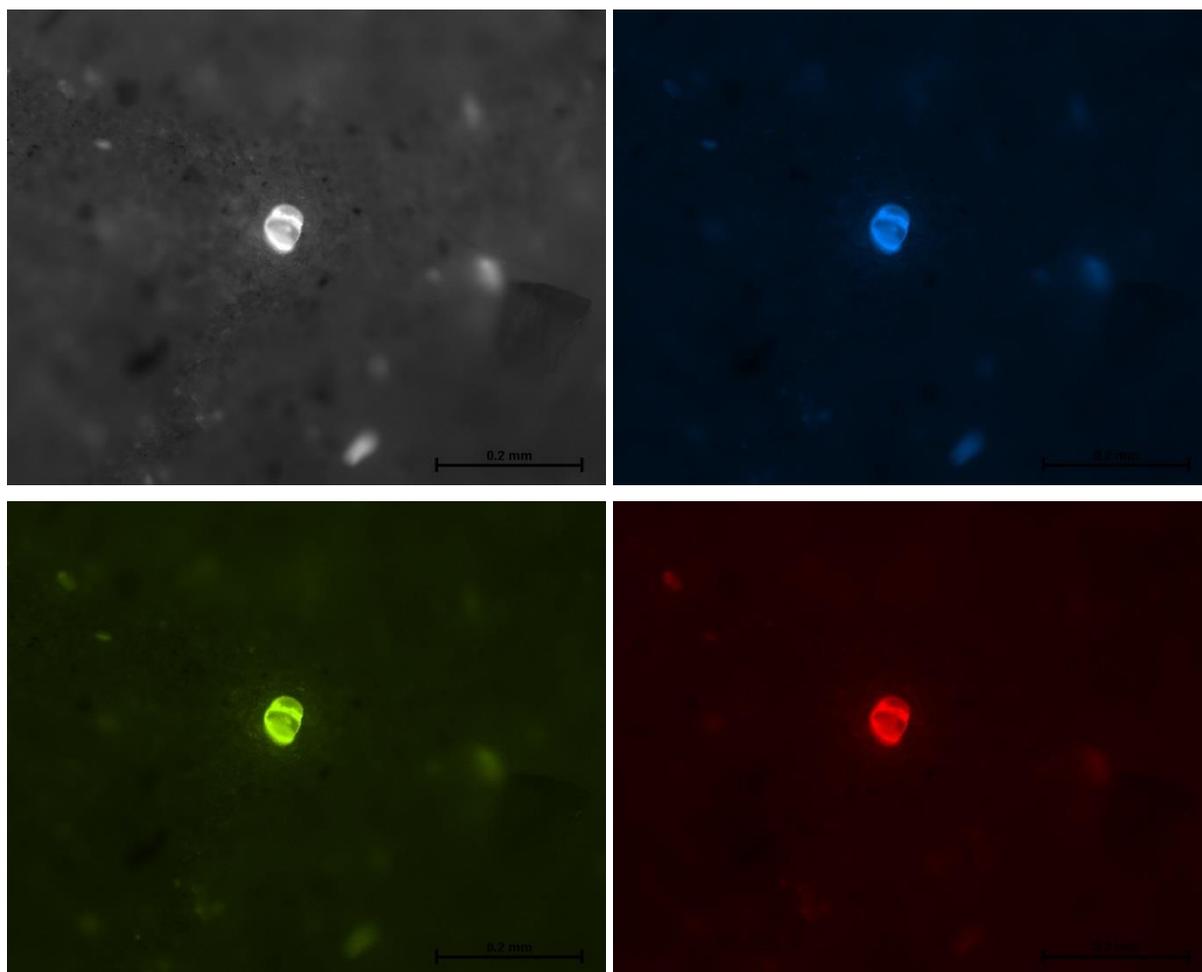


Figura 37 – Particelle e fibre di microplastiche presenti nel nido 202120tN156, colorate con NR e osservate al microscopio a fluorescenza

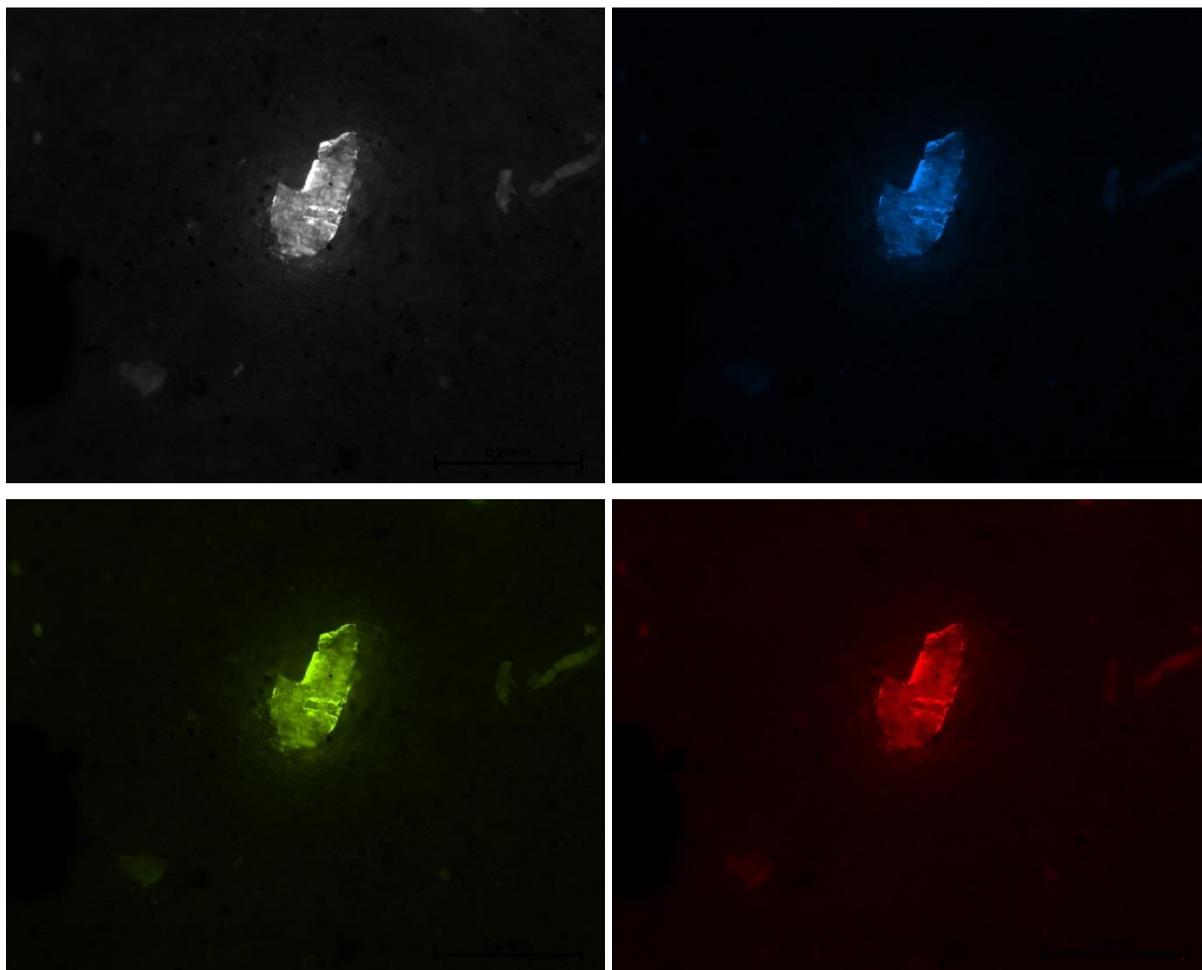


Figura 38 – Particelle e fibre di microplastiche presenti nel nido 202129tN157, colorate con NR e osservate al microscopio a fluorescenza

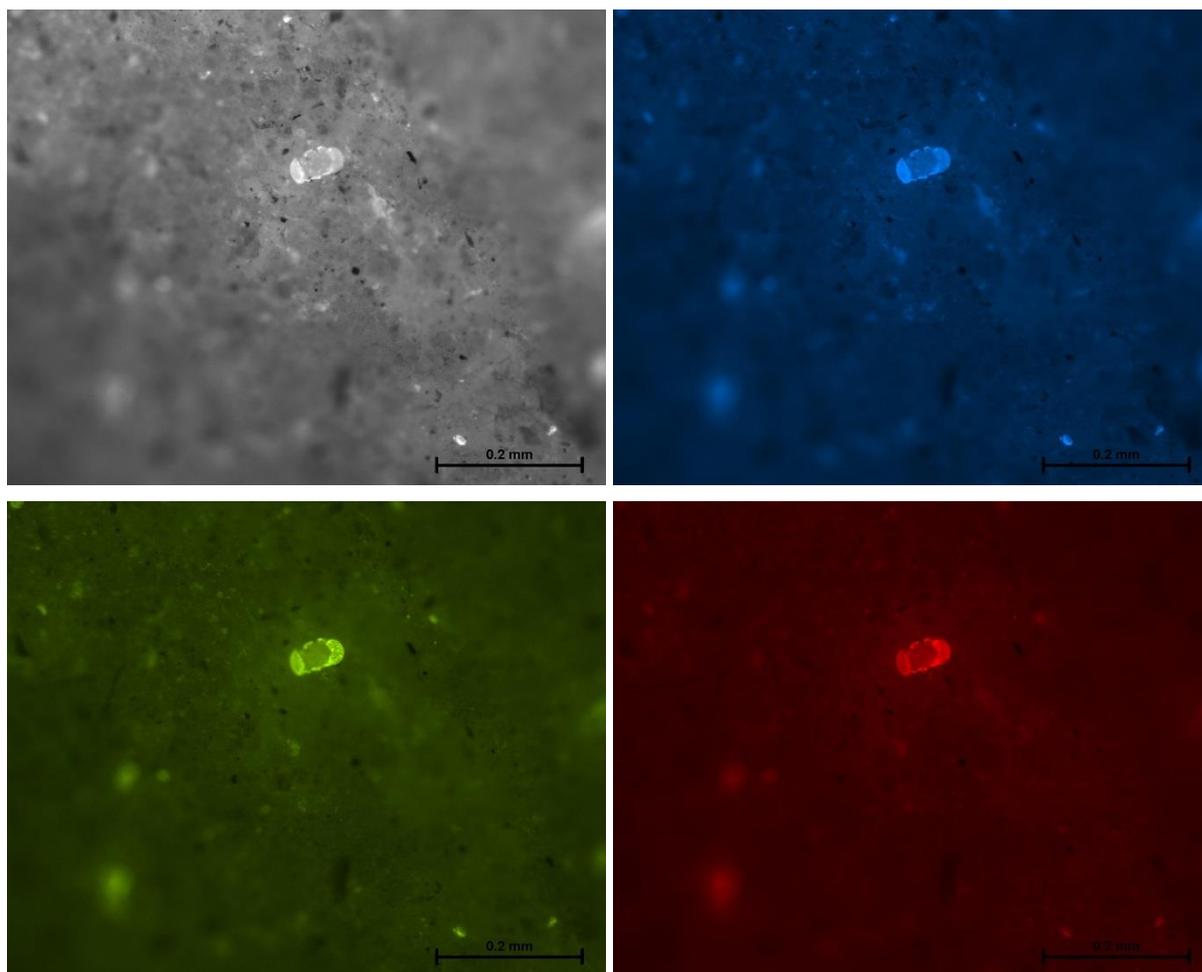


Figura 39 – Particelle e fibre di microplastiche presenti nel nido 202151N154, colorate con NR e osservate al microscopio a fluorescenza

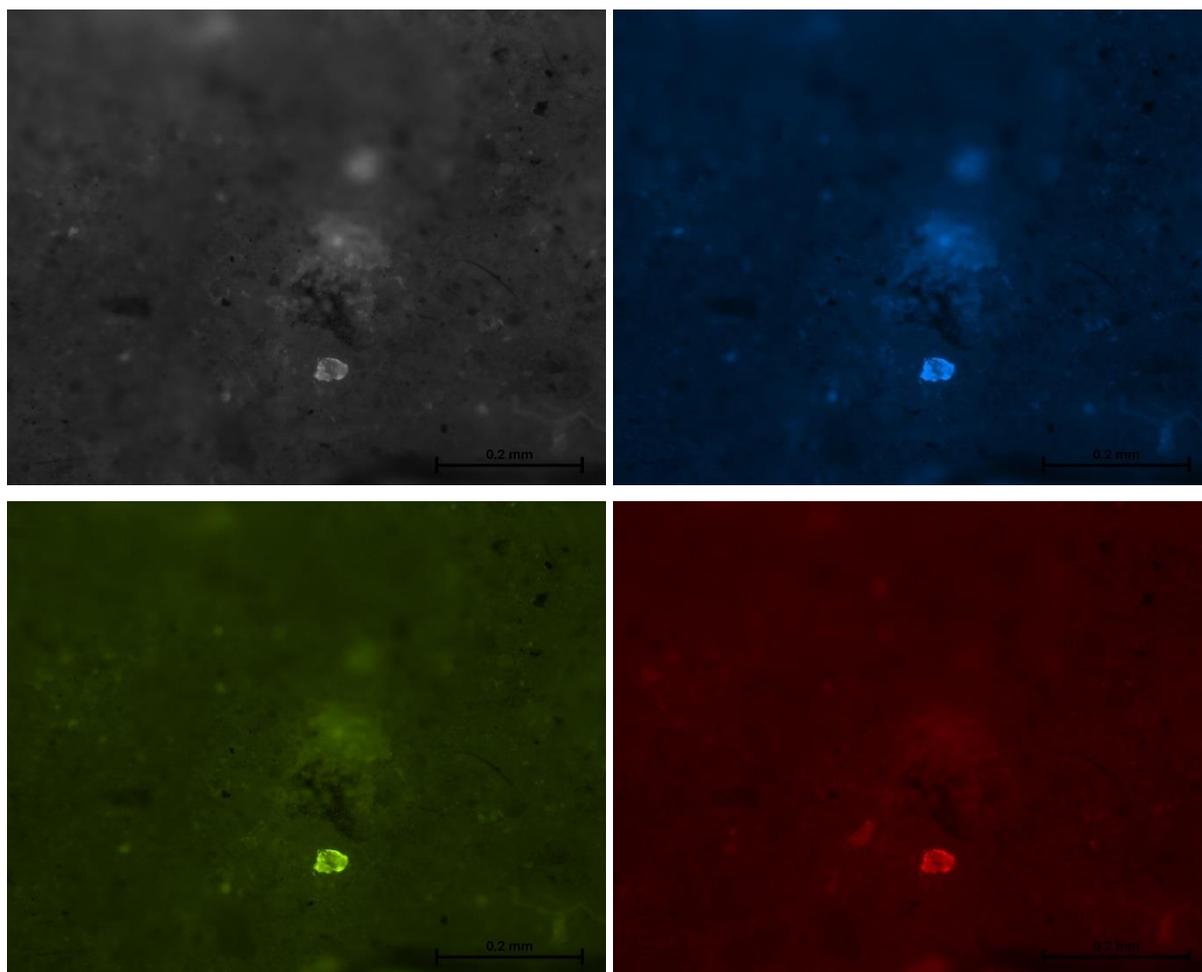


Figura 40 – Particelle e fibre di microplastiche presenti nel nido 202151N154Z, colorate con NR e osservate al microscopio a fluorescenza

## CONCLUSIONE

I contaminanti, tra cui rientrano metalli pesanti e microplastiche, possono essere considerati fattori in grado di influire sulle condizioni ambientali locali e, conseguentemente, possono andare ad alterare e modellare le dinamiche di popolazione, influenzando ad esempio la sopravvivenza e il successo riproduttivo degli individui. In questo lavoro di tesi ci si è concentrati sui potenziali impatti di questi fattori sul successo di schiusa delle uova e sull'ambiente di nidificazione delle tartarughe marine.

Per quanto riguarda la contaminazione da metalli pesanti, possiamo sostenere che, in generale, nell'area presa in analisi, ovvero la costa ionica della provincia di Catanzaro, non sono emerse correlazioni dirette tra le concentrazioni di metalli, riscontrate mediante l'analisi all'ICP-OES, e la percentuale di successo di schiusa, calcolata come percentuale del rapporto tra il numero di uova schiuse recuperate al termine delle operazioni di ispezione dei nidi e il numero totale di uova conteggiate durante le operazioni di traslocazione o al termine delle operazioni di digging. Tuttavia, abbiamo evidenziato che in alcuni casi e per alcuni metalli è possibile osservare un'influenza diretta sulla deposizione in quanto questi inquinanti possono andare ad alterare negativamente il numero di uova che vengono deposte e a interferire positivamente sul numero di uova non schiuse e sul numero di uova trovate danneggiate all'interno della camera di incubazione dei nidi. Futuri studi sulla contaminazione da metalli possono interessare l'indagine di livelli soglia di concentrazione oltre i quali lo sviluppo embrionale viene compromesso o completamente bloccato, lo studio specifico sugli impatti dei metalli sullo sviluppo embrionale stesso e l'incremento delle conoscenze relative al trasferimento di questi contaminanti dalla madre all'embrione.

In riferimento, invece, alla contaminazione da microplastiche bisogna tener conto che il presente studio ha valutato solo la presenza di tali materiali nei campioni di sabbia prelevati all'interno della camera di incubazione delle uova durante le procedure di digging. Infatti, la quantificazione di particelle e fibre direttamente adese ai gusci è stata effettuata mediante l'utilizzo delle unità *SMI* e della soluzione di  $ZnCl_2$  con le stesse modalità per le sabbie, ma i risultati ottenuti non sono stati soddisfacenti. Si consiglia a questo scopo di seguire la metodica che prevede la digestione dei campioni biologici con 10% di idrossido di potassio (KOH) a 60°C per 24h, seguita dall'estrazione con acqua a 100°C e acetone e, infine, dalla colorazione con NR, come riportato nello studio di Prata et al. (2021).

I risultati ottenuti sul sedimento ci permettono quindi di affermare che le microplastiche non sembrerebbero avere impatti negativi sul successo di schiusa dei nidi presi in analisi. Nonostante ciò, numerosi studi presenti in letteratura hanno esaminato l'impatto delle microplastiche sulle condizioni ambientali della camera di incubazione delle uova. Ricerche future possono quindi coinvolgere la valutazione delle correlazioni tra i parametri ambientali delle camere di incubazione delle uova, quali ad esempio temperatura e umidità, il successo di schiusa dei nidi e la presenza di microplastiche. Inoltre, è possibile approfondire anche i potenziali impatti diretti delle microplastiche e degli additivi sui livelli ormonali, e di conseguenza sullo sviluppo embrionale, ed effettuare osservazioni mediante stereomicroscopio al fine di descrivere forma e colore delle particelle e delle fibre. Queste informazioni permetterebbero ad esempio di risalire alla tipologia di plastica, e quindi alla tipologia di oggetto, da cui le microplastiche derivano.

Le possibili misure di gestione di queste problematiche sono ancora oggi difficili da mettere in atto, ma per prevenire e ridurre l'ingresso di metalli pesanti e microplastiche in ambiente è necessario innanzitutto identificare le fonti di produzione e di immissione in ambiente e, successivamente, regolamentarle attraverso l'adozione di leggi, restrizioni e regolamenti e mediante controlli serrati da parte di enti e figure professionali competenti e preposte. Creare consapevolezza pubblica attraverso l'istruzione, soprattutto per quanto riguarda la problematica delle microplastiche, mettere in atto strategie di mitigazione efficaci, quali la tempestiva rimozione dalle spiagge dei detriti di plastica più grandi prima che questi siano degradati e frammentati, e finanziare tecnologie e progetti che limitino gli scarichi in ambiente di inquinanti, soprattutto per quanto riguarda la problematica dei metalli pesanti, sono i passi successivi per sperare in un mondo migliore e per spergiurare una nuova estinzione di massa delle specie.

## BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Ali H, Khan E, 2018. What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term 'heavy metals' - proposal of a comprehensive definition. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 100(1): 6-19
- Anan Y, Kunito T, Watanabe I, Sakai H, Tanabe, S., 2001. Trace element accumulation in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) and green turtles (*Chelonia mydas*) from Yaeyama Islands, Japan. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20: 2802-2814
- Andrady AL, 2003. *Plastics and the Environment*. John Wiley & Sons
- Andrady AL, 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62: 1596–1605
- Andreani G, Santoro M, Cottignoli S, Fabbri M, Carpena E, Isani G, 2008. Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *Science of the Total Environment*. 390: 287-294
- Auta HS, Emenike CU, Fauziah SH, 2017. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment international*. 102: 165-176
- Avens L, Snover ML, 2013. Age and age estimation in sea turtles. *The biology of sea turtles*. Vol. 3. Wyneken J, Lohmann KJ, Musick JA (ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp. 97-133
- Bacci E, 1993. Approches to the assessment of the environmental fate of chemical contaminants. *Ecotoxicology of organic contaminants*. Bacci E. Lewis Publishers. pp. 1-76
- Balazs GH, Pooley SG, 1991. Research plan for marine turtle fibropapilloma. NOAA Tech. Mem. 1991. NMFS-SWFSC-156
- Barnes DKA, Galgani F, Thompson RC, Barlaz M, 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*. 364(1526): 1985-1998
- Beckwith VK, Fuentes MM, 2018. Microplastic at nesting grounds used by the northern Gulf of Mexico loggerhead recovery unit. *Marine pollution bulletin*. 131: 32-37

- Bergeron JM, Crews D, McLachlan JA, 1994. PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environmental Health Perspectives*. 102(9): 780-781
- Bjorndal KA, 1997. Foraging ecology and nutrition of sea turtles. *The Biology of Sea Turtles*. Vol. 1. Lutz PL, Musick JA. CRC Press, Boca Raton. pp. 199–232
- Bjorndal KA, Bolten AB, Lagueux CJ, 1994. Ingestion of marine debris by juvenile sea turtles in coastal Florida habitats. *Marine pollution bulletin*. 28(3): 154-158
- Bjorndal KA, Bolten BA, Martins HR, 2000. Somatic growth model of juvenile loggerhead sea turtles *Caretta caretta*: duration of pelagic stage. *Marine Ecol. Prog. Series* 202: 265–272
- Bolten AB, Witherington BE, Eds. 2003. *Loggerhead sea turtles*. Smithsonian Books, Washington, DC. pp. 1–352
- Bull JJ, 1980. Sex determination in reptiles. *Quart. Rev. Biol.* 55: 3-21
- Bull JJ, Vogt RC, Bulmer MG, 1982. Heritability of sex ratio in turtles with environmental sex determination. *Evolution*, 333-341
- Carson HS, Colbert SL, Kaylor MJ, McDermid KJ, 2011. Small plastic debris changes water movement and heat transfer through beach sediments. *Marine Pollution Bulletin*. 62(8): 1708-1713
- Casale P, Tucker AD, 2017. *Caretta caretta*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2017*: e.T3897A119333622.
- <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T3897A119333622.en>
- Charnov EL, Bull JJ, 1977. When is sex environmentally determined? *Nature*. 266: 828-830
- Claessens M, Van Cauwenberghe L, Vandegehuchte MB, Janssen CR, 2013. New Techniques for the Detection of Microplastics in Sediments and Field Organisms. *Marine Pollution Bulletin*. 70: 227–233
- Cole M, Lindeque P, Halsband C, Galloway TS, 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 62: 2588–2597

Coppock RL, Cole M, Lindeque PK, Queirós AM, Galloway TS, 2017. A small-scale, portable method for extracting microplastics from marine sediments. *Environmental Pollution*. 230: 829-837

Cousins RJ, Liuzzi JP, Lichten PLA, 2006. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem*. 281: 24085-24089

Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WP, Anderson DG, Baetcke KP, Hoffmann JL, Morrow MS, Rodier DJ, Schaeffer JE, Touart LW, Zeeman MG, Patel YM, 1998. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environmental health perspectives*. 106: 11-56

Danzo BJ, 1997. Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environmental Health Perspectives*. 105(3): 294-301

Day RD, 2003. Mercury in Loggerhead Sea Turtles, *Caretta Caretta*: Developing Monitoring Strategies, Investigating Factors Affecting Contamination, and Assessing Health Impacts (Doctoral dissertation, College of Charleston (Graduate School))

Day RD, Christopher SJ, Becker PR, Whitaker DW, 2005. Monitoring mercury in the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*. *Environmental science & technology*. 39(2): 437-446

Day RD, Segars AL, Arendt MD, Lee AM, Peden-Adams MM, 2007. Relationship of blood mercury levels to health parameters in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Environmental Health Perspectives*. 115(10): 1421-1428

Di Renzo L, Mascilongo G, Berti M, Bogdanović T, Listeš E, Brkljača M, Di Giacinto F, 2021. Potential impact of microplastics and additives on the health status of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded along the central adriatic coast. *Water, Air, & Soil Pollution*. 232(3): 1-20

Dodd CK Jr, 1988. Synopsis of the biological data on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* (Linnaeus 1758). US Fish Wildlife Service. Biol Rep. 88: 110

Driscoll CT, Mason RP, Chan HM, Jacob DJ, Pirrone N, 2013. Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects. *Environmental science & technology*. 47(10): 4967-4983

Duffus JH, 2002. " Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry*. 74(5): 793-807

- Duncan EM, Arrowsmith J, Bain C, Broderick AC, Lee J, Metcalfe K, Godley BJ, 2018. The true depth of the Mediterranean plastic problem: Extreme microplastic pollution on marine turtle nesting beaches in Cyprus. *Marine pollution bulletin*. 136: 334-340
- Ehsanpour M, Afkhami M, Khoshnood R, Reich KJ, 2014. Determination and maternal transfer of heavy metals (Cd, Cu, Zn, Pb and Hg) in the hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) from a nesting colony of Qeshm Island, Iran. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 92(6): 667-673
- Erni-Cassola G, Gibson MI, Thompson RC, Christie-Oleza JA, 2017. Lost, but found with Nile red: a novel method for detecting and quantifying small microplastics (1 mm to 20  $\mu$ m) in environmental samples. *Environmental science & technology*. 51(23): 13641-13648
- Faust, D. R., Hooper, M. J., Cobb, G. P., Barnes, M., Shaver, D., Ertolacci, S., & Smith, P. N. (2014). Inorganic elements in green sea turtles (*Chelonia mydas*): relationships among external and internal tissues. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(9), 2020-2027
- Fossi MC, Marsili L, Baini M, Giannetti M, Coppola D, Guarranti C, Caliani I, Minutoli R, Lauriano G, Finoia MG, Rubegni F, Panigada S, Bérubé M, Ramirez JU, Panti C, 2016. Fin whales and microplastics: the Mediterranean Sea and the sea of Cortez scenarios. *Environ. Pollut.* 209: 68–78
- Gaetke LM, Chow CK, 2003. Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicol.* 189: 147–63
- Gardner SC, Fitzgerald SL, Vargas BA, Rodriguez LM, 2006. Heavy metal accumulation in four species of sea turtles from the Baja California peninsula, Mexico. *BioMetals*. 19: 91-99
- Gray JS, 2002. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Mar. Pollut. Bull.* 45: 46–52
- Guirlet E, Das K, Girondot M, 2008. Maternal transfer of trace elements in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) of French Guiana. *Aquatic Toxicology*. 88(4): 267-276
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press. pp. 936
- Haynes D, Johnson JE, 2000. Organochlorine, Heavy Metal and Polyaromatic Hydrocarbon Pollutant Concentrations in the Great Barrier Reef (Australia) Environment: a Review. *Marine Pollution Bulletin*. 41: 267-278

Heesemann LM, Day RD, Christopher S, Arendt MD, Maier PP, Segars AL, 2004. Exposure to methylmercury (MeHg) in vitro alters lymphocyte proliferation in loggerhead turtles and bottlenose dolphin blood leukocytes. Proceedings of SETAC 25th Annual Meeting in North America. pp. 14-18

Hendrickson JR, 1980. The ecological strategies of sea turtles. *Amer. Zool.* 20: 597-608

Hirayama R, 1994. Phylogenetic systematics of chelonoid sea turtles. *Island Arc.* 3: 270–284

International Maritime Organization, IMO, 2015. Plastic particles in the ocean may be as harmful as plastic bags, report says. International Maritime Organization Press Briefing Archives. 27/04/2015

Jung MR, Horgen FD, Orski SV, Rodriguez V, Beers KL, Balazs GH, Lynch JM, 2018. Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms. *Marine Pollution Bulletin.* 127: 704-716

Kampalath R, Gardner SC, Méndez-Rodríguez L, Jay JA, 2006. Total and methylmercury in three species of sea turtles of Baja California Sur. *Marine Pollution Bulletin.* 52(12): 1816-1823

Keller JM, Kucklick JR, McClellan-Green PD, 2004a. Organochlorine contaminants in loggerhead sea turtle blood: extraction techniques and distribution among plasma and red blood cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 46(2): 254-264

Keller JM, Kucklick JR, Stamper MA, Harms CA, McClellan-Green PD, 2004b. Associations between organochlorine contaminant concentrations and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, USA. *Environmental health perspectives.* 112(10): 1074-1079

Keller JM, Ngai L, McNeill JB, Wood LD, Stewart KR, O'Connell SG, Kucklick JR, 2012. Perfluoroalkyl contaminants in plasma of five sea turtle species: comparisons in concentration and potential health risks. *Environmental toxicology and chemistry.* 31(6): 1223-1230

Keller JM, Peden-Adams MM, Aguirre AA, 2006. Immunotoxicology and implications for Reprilian Health. *Toxicology of Repriles.* Gaedner SC, Oberdörster E. CRC Press. pp. 199-240

Kraemer JE, Bennett SH, 1981. Utilization of posthatching yolk in loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*. *Copeia.* 1981: 406–411

- Lam JC, Tanabe S, Chan SK, Lam MH, Martin M, Lam PK, 2006. Levels of trace elements in green turtle eggs collected from Hong Kong: evidence of risks due to selenium and nickel. *Environmental Pollution*. 144(3): 790-801
- Lazar B, Gracan R, Zavodnik D, Tvrtkovic N, 2005. Feeding ecology of “pelagic” loggerhead turtles, *Caretta caretta*, in the northern Adriatic Sea: proof of an early ontogenetic habitat shift. Twenty Fifth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation, Savannah, Georgia, 18-22 January. pp.93
- Linder G, Grillitsch B, 2000. Ecotoxicology of Metals. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. Sparling DW, Linder G, Bishop CA. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). pp. 325–459
- Lohmann KJ, Witherington BE, Lohmann CMF, Salmon M, 1997. Orientation, Navigation, and Natal Beach Homing in Sea Turtles. *The Biology of Sea Turtles*. Vol. 1. Lutz PL, Musick JA. CRC Presss, Boca Raton. pp. 108-135
- Maffucci F, Caurant F, Bustamante P, Bentivegna F, 2005. Trace element (Cd, Cu, Hg, Se, Zn) accumulation and tissue distribution in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the Western Mediterranean Sea (southern Italy). *Chemosphere*. 58: 535-542
- Margaritoulis D, Argano R, Baran I, Bentivegna F, Bradai MN, et al., 2003. Loggerhead turtles in the Mediterranean Sea: present knowledge and conservation perspectives. *Loggerhead Sea Turtles*. Bolten AB, Witherington BE. Smithsonian Institution Press, Washington. pp 175–198
- McLachlan JA, 2001. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocrine reviews*. 22(3): 319-341
- Meyers N, Catarino AI, Declercq AM, Brenan A, Devriese L, Vandegheuchte M, Everaert G, 2022. Microplastic detection and identification by Nile red staining: Towards a semi-automated, cost-and time-effective technique. *Science of the Total Environment*. 823: 153441
- Miller DL, Wyneken J, Rajeev S, Perrault J, Mader DR, Weege J, Baldwin CA, 2009. Pathologic findings in hatchling and posthatchling leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) from Florida. *Journal of Wildlife Diseases*. 45(4): 962-971
- Mo G, Montalto F, Serangeli MT, Duprè E, 2013. Linee guida per il recupero, soccorso, affidamento e gestione delle tartarughe marine ai fini della riabilitazione e per la manipolazione a scopi scientifici. ISPRA, Manuali e Linee Guida. 89, 72

- Mrosovsky, 1988. Pivotal temperatures for loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from northern and southern nesting beaches. *Canadian Journal of Zoology*. 66(3): 661-669
- Musick JA, Limpus CJ, 1997. Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. *The Biology of Sea Turtles*. Vol. 1. Lutz PL, Musick JA. CRC Press, Boca Raton. pp. 137–163
- National Marine Fisheries Service (NMFS) and U.S. Fish and Wildlife Service (USFWS), 2008. Recovery Plan for the Northwest Atlantic Population of the Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta*). Second Revision. National Marine Fisheries Service. Silver Spring. MD. [http://www.nmfs.noaa.gov/pr/pdfs/recovery/turtle\\_loggerhead\\_atlantic.pdf](http://www.nmfs.noaa.gov/pr/pdfs/recovery/turtle_loggerhead_atlantic.pdf)
- Nelms SE, Duncan EM, Broderick AC, Galloway TS, Godfrey MH, Hamann M, Lindeque PK, Godley PJ, 2016. Plastic and Marine Turtles: A Review and Call for Research. *ICES Journal of Marine Science*. 73 (2): 165-181
- Novillo-Sanjuan O, Raga JA, Tomás J, 2022. Microdebris in three Spanish Mediterranean beaches located at a sporadic loggerhead turtles (*Caretta caretta*) nesting area. *Regional Studies in Marine Science*. 49: 102116
- Okada S, Yamanaka K, 1994. Induction of lung-specific DNA damage by methylarsenics via the production of free radicals. *Arsenic in the Environment, Part II: Human Health and Ecosystem Effects*. Nriagu JO. New York: John Wiley & Sons, Inc. 143–157
- Páez-Osuna F, Calderón-Campuzano MF, Soto-Jiménez MF, Ruelas-Inzunza JR, 2010. Trace metals (Cd, Cu, Ni, and Zn) in blood and eggs of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* from a nesting colony of Oaxaca, Mexico. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 59(4): 632-641
- Peden-Adams MM, Wang A, Johnson AR, EuDaly J, Smythe J, Heesemann LM, 2003. Relationship of lymphoproliferation and clinical blood parameters to heavy metals in Kemp's ridley sea turtles. *Proceedings of SETAC 24th Annual Meeting in North America*. pp. 9-13
- Pérez-Granados AM, Vaquero MP, 2002. Silicon, aluminium, arsenic and lithium: essentiality and human health implications. *Journal of Nutrition Health and Aging*. 6: 154-162
- Perrault JR, 2012. Assessment of mercury and selenium concentrations in tissues of stranded leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*. 22(3-4): 76-85

- Perrault JR, Miller DL, Garner J, Wyneken J, 2013. Mercury and selenium concentrations in leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*): population comparisons, implications for reproductive success, hazard quotients and directions for future research. *Science of the total environment*. 463: 61-71
- Piovano S, Clusa M, Carreras C, Giacomini C, Pascual M, Cardona L, 2011. Different growth rates between loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) of Mediterranean and Atlantic origin in the Mediterranean Sea. *Mar. Biol.* 158: 2577–2587
- Plotkin P, 2003. Adult migrations and habitat use. *The Biology of Sea Turtles*. Vol. 2. Lutz PL, Musick JA, Wyneken J (ed.). CRC Marine Biology Series, CRC Press, Inc., Boca Raton, London, New York, Washington D.C. pp. 225-241
- Plotkin PT, Wicksten MK, Amos AF, 1993. Feeding ecology of the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* in the northwestern Gulf of Mexico. *Mar. Biol.* 115: 1–5
- Poppenga, 2017. Environmental Contaminants. *Sea Turtle Health and Rehabilitation*. Manire CA, Norton TM, Stacy BA, Innis CJ, Harms CA. J. Ross Publishing. pp. 805-818
- Prata JC, Sequeira IF, Monteiro SS, Silva ALP, Da Costa JP, Dias-Pereira P, Rocha-Santos T, 2021. Preparation of biological samples for microplastic identification by Nile Red. *Science of The Total Environment*. 783: 147065
- Pritchard PCH, Mortimer JA, 1999. Taxonomy, External Morphology, and Species Identification, Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Grobois FA, Donnelly M (Editors). IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication. No. 4
- Rand GM (Ed.), 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. CRC press
- Register AS, Day R, Hamilton A, Ardent M, Schwenter JA, Hayes WK, 2011. Relationships between body size, sex, geographic location, water depth, and heavy metal concentration in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Effects of Heavy Metal Pollution on the Loggerhead Sea Turtle*. Register AL. Loma Linda University Electronic Theses, Dissertations & Projects. <http://scholarsrepository.llu.edu/etd/58>
- Reisser J, Shaw J, Hallegraeff G, Proietti M, Barnes DKA, Thums M, Wilcox C, Hardesty BD, Pattiaratchi C, 2014. Millimeter-sized marine plastics: a new pelagic habitat for

microorganisms and invertebrates. PLoS One 9 (6), e100289.  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0100289>

Rie MT, Lendas KA, Callard IP, 2001. Cadmium: tissue distribution and binding protein induction in the painted turtle, *Chrysemys picta*. Comp Biochem Physiol. 130: 41–51

Saeki K, Sakakibara H, Sakai H, Kunito T, Tanabe S, 2000. Arsenic accumulation in three species of sea turtles. BioMetals. 13: 241-250

Sakai H, Saeki K, Ichihashi H, Suganuma H, Tanabe H, Tatsukawa R, 2000. Species-Specific Distribution of Heavy Metals in Tissues and Organs of Loggerhead Turtle (*Caretta caretta*) and Green Turtle (*Chelonia mydas*) from Japanese Coastal Waters. Marine Pollution Bulletin. 40(8): 701-709

Savoca D, Arculeo M, Vecchioni L, Cambera I, Visconti G, Melfi R, Pace A, 2021. Can phthalates move into the eggs of the loggerhead sea turtle *Caretta caretta*? The case of the nests on the Linosa Island in the Mediterranean Sea. Marine Pollution Bulletin. 168: 112395

Schuyler Q, Hardesty BD, Wilcox C, Townsend K, 2013. Global analysis of anthropogenic debris ingestion by sea turtles. Conservation biology. 28(1): 129-139

Selcer KW, 2006. Reptile Ecotoxicology: Studying the Effects of Contaminants on Populations. Toxicology of Reptiles. Gaedner SC, Oberdörster E. CRC Press. pp. 260-297

Seney EE, Musick JA, 2007. Historical diet analysis of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in Virginia. Copeia 2007: 478–489

Shim WJ, Song YK, Hong SH, Jang M, 2016. Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. Marine pollution bulletin. 113(1-2): 469-476

Shruti VC, Pérez-Guevara F, Roy PD, Kuttralam-Muniasamy G, 2022. Analyzing microplastics with Nile Red: Emerging trends, challenges, and prospects. Journal of Hazardous Materials. 423: 127171

Snover ML, 2002. Growth and ontogeny of sea turtles using skeletochronology: methods, validation and application to conservation. Ph.D. dissertation. Duke University, Durham, North Carolina. 144 pp.

- Speer RM, Wise CF, Young JL, Aboueissa AM, Bras MM, Barandiaran M, Wise JP, 2018. The cytotoxicity and genotoxicity of particulate and soluble hexavalent chromium in leatherback sea turtle lung cells. *Aquatic Toxicology*. 198: 149-157
- Spotila JR, 2004. *Sea Turtles: A Complete Guide to Their Biology, Behavior, and Conservation*. Johns Hopkins University Press, Baltimore. pp. 1–227
- Standora EA, Spotila JR, 1985. Temperature dependent sex determination in sea turtles. *Copeia*. 711-722
- Stewart KR, Keller JM, Templeton R, Kucklick JR, Johnson C, 2011. Monitoring persistent organic pollutants in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) confirms maternal transfer. *Marine Pollution Bulletin*. 62(7): 1396-1409
- Storelli MM, Ceci E, Marcotrigiano GO, 1998a. Distribution of Heavy Metal Residues in Some Tissues of *Caretta caretta* (Linnaeus) Specimen Beached Along the Adriatic Sea (Italy). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 60: 546-552
- Storelli MM, Ceci E, Marcotrigiano GO. 1998b. Comparison of total mercury, methylmercury, and selenium in muscle tissues and in the liver of *Stenella coeruleoalba* (Meyen) and *Caretta caretta* (Linnaeus). *Bull Environ Contam Toxicol*, 61(4):541–547
- Storelli MM, Storelli A, D'Addabbo R, Marano C, Bruno R, Marcotrigiano GO, 2005. Trace elements in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the eastern Mediterranean Sea: overview and evaluation. *Environmental Pollution*. 135: 163-170
- Sutton R, Mason SA, Stanek SK, Willis-Norton E, Wren IF, Box C, 2016. Microplastic Contamination in the San Francisco Bay, California, USA. *Mar. Pollut. Bull.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.077s>
- Swarthout RF, Keller JM, Peden-Adams M, Landry AM, Fair PA, Kucklick JR, 2010. Organohalogen contaminants in blood of Kemp's ridley (*Lepidochelys kempii*) and green sea turtles (*Chelonia mydas*) from the Gulf of Mexico. *Chemosphere*. 78(6): 731-741
- Tapiero H, Tew KD, 2003. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother*. 57: 399–411
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ, 2012. Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, clinical and environmental toxicology*. Springer. pp. 133-164

- Thomas P, Baer KN, White RB, 1994. Isolation and partial characterization of metallothionein in the liver of the red-eared turtle (*Trachemys scripta*) following intraperitoneal administration of cadmium. *Comp Biochem Physiol.* 107: 221–226
- Tiwari M, Bjorndal KA, 2000. Variation in morphology and reproduction in loggerheads, *Caretta caretta*, nesting in the United States, Brazil, and Greece. *Herpetologica.* 56: 343–356
- Uthus EO, 1992. Evidence for arsenic essentiality. *Environmental Geochemistry and Health.* 14: 55-58
- Valente ALS, Ignasi RCVPD, Sanchez M, 2008. Diagnostic imaging of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). Universitat Autònoma de Barcelona
- Vogt RC, Bull JJ, 1982. Temperature controlled sex-determination in turtles: ecological and behavioral aspects. *Herpetologica*, 156-164
- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB, 2006. *Principles of Ecotoxicology*. Boca Raton, FL, CRC Press
- Wallace BP, Di Matteo AD, Hurley BJ, Finkbeiner EM, Bolten AB, et al., 2010. Regional management units for marine turtles: a novel framework for prioritizing conservation and research across multiple scales. *PLoS ONE.* 5: 1–11
- Weeks BA, Anderson DP, DuFour AP, Ann F, Goven AJ, Lahvls GP, Gabriele P, 2018. Immunological biomarkers to assess environmental stress. *Biomarkers*. CRC Press. pp. 211-234
- Willingham E, 2006. Developmental and Reproductive Effects. *Toxicology of Repriles*. Gaedner SC, Oberdörster E. CRC Press. pp. 149-171
- Wise SS, Xie H, Fukuda T, Thompson WD, Wise JP, 2014. Hexavalent chromium is cytotoxic and genotoxic to hawksbill sea turtle cells. *Toxicology and applied pharmacology.* 279(2): 113-118
- Witherington BE, 2002. Ecology of neonate loggerhead turtles inhabiting lines of downwelling near a Gulf Stream front. *Mar. Biol.* 140: 843–853
- Witherington BE, 2017. Sea turtles in context: their life history and conservation. *Sea Turtle Health and Rehabilitation*. Manire CA, Norton TM, Stacy BA, Innis CJ, Harms CA. J. Ross Publishing. pp. 3-24

Witherington BE, Hirama S, Hardy R, 2012. Young sea turtles of the pelagic Sargassum-dominated drift community: habitat use, population density, and threats. Mar. Ecol. Prog. Series 463: 1–22

Yntema CL, Mrosovsky N, 1980. Sexual differentiation in hatching loggerheads (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. Herpetologica 36: 33-36

Yntema CL, Mrosovsky N, 1982. Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtle. Canad. J. Zool. 60: 1012-1016

Yocom CF, Pecoraro VL, 1999. Recent advances in the understanding of the biological chemistry of manganese. Current opinion in Chemical biology. 3: 182-187

<https://www.iucnredlist.org/technical-documents/classification-schemes>

# RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato desidero ringraziare tutte le persone che hanno reso possibile lo svolgimento del lavoro.

Ringrazio la Professoressa Annalisa Zaccaroni e il Professore Antonio Mingozi per i loro preziosi insegnamenti utili alla stesura della tesi e per la loro autorevolezza e competenza professionale, la Dottoressa Marina Silvi per il supporto nella preparazione e nell'analisi dei campioni al microonde e all'ICP-OES, il Dottor Pietro Emmanuele per il suo aiuto nella costruzione delle unità SMI per l'estrazione delle microplastiche, la Dottoressa Giulia Salamanca e il Professor Cristiano Bombardi per il loro sostegno nell'osservazione dei campioni al microscopio a fluorescenza.

Ulteriori ringraziamenti sono rivolti alla Dottoressa Maria Assunta Menniti e a tutto il team CESRAM, in particolar modo al Dottor Pasquale Pipicelli, alla Dottoressa Mariella Grandinetti e al Dottor Pasquale Gariano, per la loro straordinaria accoglienza e disponibilità, per avermi insegnato e arricchito e per avermi aperto i loro cuori e le loro case, sopportandomi per due fantastici mesi.

Un sentito grazie a Erika per il suo importantissimo sostegno e per la sua compagnia durante le ore di laboratorio a Cesenatico e a Elisa per la sua infinita pazienza nell'ascoltarmi nei momenti di sconforto. Vi ringrazio per essermi state vicine sia nei momenti di maggior difficoltà che nei momenti più spensierati e divertenti.

Un grazie di cuore, infine, va ai miei genitori che, facendo sacrifici, mi hanno sempre sostenuta e incoraggiata. Hanno semplicemente permesso tutto ciò. Questo traguardo è anche loro.